gocitos, y el fenómeno se denomina *fagocitosis* (METSCHNIKOFF). Si los microorganismos patógenos, a diferencia de los saprofitos, no son destruídos por las fuerzas defensivas del organismo, es porque tienen a su vez defensas propias que no puede vencer la acción microbicida del organismo. La existencia de defensas bacterianas está comprobada ; consisten, en parte, en substancias solubles llamadas *lisinas* por KRUSE y *agresinas* por BAIL, que neutralizan la acción nociva del suero sanguíneo sobre las bacterias ; en parte también la protección va unida a la substancia propia del germen, y a veces se observa la formación de una cubierta protectora (cápsulas), verdadera modificación de la bacteria, durante su permanencia en el cuerpo del animal, lo cual ha sido llamado por BAIL « estado animal » de los gérmenes patógenos, y de ello nos ocuparemos con frecuencia al tratar de la resistencia que ofrecen contra los anticuerpos de los sueros. La presencia o ausencia de agresinas (lisinas) por una parte y de alexinas por otra, da una explicación de la receptividad o inmunidad naturales. Pero esto es sólo una de las explicaciones posibles ; en otros casos entran en consideración otras causas para la destrucción de microbios en organismos inmunes. Puede suceder, por ejemplo, en animales de sangre fría o en mamíferos que se aletargan en invierno, que el desarrollo de los microparásitos no se verifique por la baja temperatura del cuerpo ; pero pueden desarrollarse tan pronto como desaparece el obstáculo, llevando a la estufa los animales de sangre fría (carbunco en las ranas), o al salir el animal del letargo (bacilos de la peste y tripanosomas en la marmota).

Por el contrario, la inmunidad de las aves contra casi todos los microbios patógenos de los mamíferos parece debida, por lo menos en parte, a su temperatura orgánica más elevada. En otros casos, por ejemplo, la resistencia de las ratas contra el carbunco, parece ser debida a que la elevada alcalinización de su sangre impide el desarrollo de los bacilos de esa infección. Finalmente, las circunstancias que determinan la resistencia natural contra los venenos son completamente distintas. En muchos animales inmunes, como, por ejemplo, la tortuga contra la toxina del tétanos, puede comprobarse que ésta permanece inalterable en la sangre durante mucho tiempo ; en este caso no se trata evidentemente de una destrucción o neutralización del veneno, sino de que la inmunidad depende precisamente de que los tejidos de este animal no demuestran afinidad alguna para la toxina, que por este motivo circula en la sangre como una substancia indiferente.

Como vemos por lo que antecede, los factores que determinan la inmunidad natural contra los microparásitos y toxinas son variadísimos, pero todos ellos tienen una característica común si se les compara con la inmunidad adquirida, y es que la inmunidad natural, al menos por hoy, no es transferible por inyecciones de suero de un animal inmune a otro receptivo. Lo contrario ocurre con la inmunidad adquirida artificialmente, y a esta inmunidad transmitida por la inyección de un suero sanguíneo inmune se la denomina inmunidad pasiva, en contraposición de la inmunidad activa debida a la actividad defensiva del organismo. Sea de origen pasivo o activo, la inmunidad adquirida sirve únicamente contra el agente morboso de la infección sufrida. La ley de especificidad del germen se cumple, por consiguiente, respecto de la inmunidad, lo mismo que respecto de la infección. La inmunidad activa se adquiere, no sólo por haber pasado la infección correspondiente, es decir, por la invasión del organismo por los gérmenes vivos, sino también por inoculación de la substancia corporal de los microbios después de matarlos, procurando que la substancia se altere lo menos posible. Esto confirma lo expuesto en el capítulo anterior, que la acción patógena de los gérmenes se debe, en último término, a los venenos eliminados por ellos.

Las ideas que acabamos de exponer son el fundamento de toda la teoría de la inmunidad y de su práctica. La vacuna preventiva es el fruto práctico de la idea de que la inmunidad se adquiere no solamente por haber sufrido la infección correspondiente, sino también por inoculación de los microparásitos muertos o al menos debilitados. El concepto de la inmunización pasiva sirve igualmente de fundamento a la seroterapia.

Era experiencia popular muy antigua el hecho de que la inmunidad se adquiere también al pasar la infección en forma muy benigna, y sobre esta experiencia se fundaba la variolización practicada ya hace siglos. En relación con esto, el conocimiento etiológico de las enfermedades infecciosas trajo más tarde, como resultado práctico, la vacunación con gérmenes vivos debilitados, por ejemplo, contra el carbunco y la rabia (PASTEUR). Hoy sabemos que a este orden pertenece también la vacuna contra la viruela, establecida científicamente por JENNER hace ya más de un siglo, aunque cuando se descubrió no se conocía todavía la relación biológica entre la viruela y el virus vacinal. El hecho de que también con gérmenes muertos se consigue la vacunación contra las enfermedades infecciosas es una conquista de los últimos treinta años, y este método, practicado primeramente por FERRÁN y luego especialmente por HAFFKINE, recibió una base científica con los trabajos de PFEIFFER y KOLLE, que vinieron a demostrar que, después de la vacuna con gérmenes muertos, las substancias protectoras que se encuentran en la sangre del vacunado son las mismas que aparecen después de sufrir la infección correspondiente. Con esto volvemos a la explicación científica de la inmunidad, cuyo fundamento debe verse en el hecho de que, una vez adquirida la inmunidad, existen en la sangre substancias disueltas, cuyo efecto específico se dirige únicamente contra el germen correspondiente y cuya existencia se prueba de manera indudable por el transporte puramente mecánico de las mismas en la inmunización pasiva. Estos anticuerpos disueltos en la sangre no son sencillos productos de transformación de los venenos introducidos en el organismo por los microparásitos, o proviniendo de otro origen, en el sentido de que el veneno introducido se transforme en el anticuerpo dentro del organismo vivo ; a esto se oponen desde luego las propor-

ciones cuantitativas, puesto que de un caballo inmunizado contra el tétanos se han obtenido cantidades de antitoxinas cien mil veces mayores que las que corresponden al veneno introducido (KNORR). Los anticuerpos son más bien productos de reacción de las células vivas del organismo, y los anticuerpos que se encuentran en el suero sanguíneo representan solamente el exceso de los anticuerpos formados por los tejidos vivos. Esto explica que la falta de anticuerpos diseminados en la sangre, no significa en manera alguna que la inmunidad haya desaparecido ; en la viruela, que deja una inmunidad de decenios, los anticuerpos son demostrables en la sangre poco tiempo ; en el tifus exantemático las circunstancias son muy semejantes. Hay que establecer distinción, por consiguiente, entre la inmunidad duradera de los tejidos (inmunidad histógena) y la inmunidad humoral más o menos pasajera ; sobre todo en la inmunización pasiva, en la que los anticuerpos no son producto de la propia actividad celular, sino que han sido introducidos del exterior, la presencia de anticuerpos persiste solamente algunas semanas, porque ya desde el primer día se inicia su metabolismo y muy pronto se eliminan por completo. La inmunidad pasiva, por consiguiente, a diferencia de la activa, es de carácter pasajero.

Antes de examinar con más detenimiento el origen de los anticuerpos en los tejidos vivos, expuesto ya en principio en el párrafo anterior, vamos a estudiar las diversas clases de estas substancias que se encuentran en la sangre. No de todos los anticuerpos que aparecen en el proceso de inmunización podemos decir con seguridad que tomen parte en la inmunidad adquirida por el organismo contra nuevas invasiones de la misma enfermedad, pero es indudablemente cierto el efecto protector de alguno de estos anticuerpos, cuya acción va directamente contra el germen o sus toxinas. Contamos entre ellos : las *antitoxinas*, que neutralizan los venenos de los gérmenes patógenos ; las *bacteriolisinas*, que disuelven los gérmenes introducidos y los hacen inofensivos ; las *opsoninas* y *bacteriotropinas*, que influyen de una manera específica sobre algunos gérmenes, de modo que después son más fácilmente cogidos y digeridos por los fagocitos. En el suero de la sangre de un organismo inmunizado se encuentran, además, distintas clases de substancias específicas, comprobables por reacciones físicoquímicas con la substancia corporal o los productos de metabolismo de los gérmenes, substancias de las cuales es dudoso, al menos, que representen algún papel en la inmunidad adquirida por el organismo frente a nuevas infecciones, por lo cual, probablemente, debe considerarse su aparición como fenómeno concomitante del verdadero proceso de inmunización. Pertenecen a esta clase de substancias : las *aglutininas*, que precipitan las bacterias ; las *precipitinas*, que dan una reacción análoga con los productos disueltos del metabolismo de los gérmenes ; las *miostagminas*, que dan otra reacción con esos productos disueltos por variación de la tensión superficial, y la disminución que esto determina en el tamaño de las gotas hace visible la reacción. Se encuentran también en el suero de la sangre otras substancias *(anti-*

cuerpos de BORDET, *reaginas)*, cuya presencia no se reconoce directamente, porque no dan ninguna reacción biológica ni físicoquímica perceptible inmediatamente con los microparásitos ni con sus productos libres, y su existencia sólo se deduce de un modo indirecto, porque su combinación con los gérmenes o sus productos fija una tercera substancia llamada complemento, la cual podría comprobarse en el suero fresco por métodos especiales (*V.* más adelante el capítulo FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO). Finalmente, se encuentran en el organismo inmunizado substancias que, muy lejos de servirle de protección, dan, al contrario, motivo para pensar que sean perjudiciales a la salud por aumentar la receptividad para una nueva infección. Por representar este estado, precisamente lo contrario de prevención (profilaxia), se le llama anafilaxia. Las reacciones biológicas con las que el organismo responde a la invasión de microparásitos o sus toxinas no deben considerarse, por consiguiente, en conjunto, como protecciones en sentido teleológico ; por eso la disposición del organismo, después de pasada una infección frente a una nueva del mismo germen, se llama acertadamente *alergia* (V. PIRQUET).

La alergia, que lo mismo comprende la protección que la hipersensibilidad, aparece no sólo frente a los parásitos o sus toxinas, como imaginábamos la inmunidad al principio, sino también contra cualquiera otra albúmina extraña. Todas las substancias que producen anticuerpos en el organismo se llaman *antígenos*, ya sean substancias albuminoideas, gérmenes patógenos vivos o substancias corporales de éstos. Por su sorprendente efecto se han estudiado especialmente los anticuerpos que aparecen después de inyectar glóbulos rojos de la sangre de un animal de otra especie *(hemolisinas)* ; éstas disuelven en el tubo de ensayo los glóbulos rojos de la especie animal a que pertenecía la sangre empleada para la inyección, y sólo éstos, en forma rigurosamente específica ; por ejemplo, el suero de un conejo al que se ha inyectado sangre de carnero disuelve los glóbulos rojos del carnero, pero sólo éstos, no los de un animal de otra especie. La formación de anticuerpos ante substancias albuminoideas puede comprobarse por su efecto precipitante o por la fijación del complemento, que siempre es específica con el antígeno origen de los anticuerpos. El hecho de que cualquier clase de albúmina promueva la formación de anticuerpos, se comprenderá cuando estudiemos las modernas investigaciones sobre la alimentación albuminoidea y la asimilación de las albúminas. El organismo recibe diariamente con la alimentación albúminas extrañas animales o vegetales; pero estas albúminas no son reabsorbidas por la mucosa intestinal tal como entran, sino que primero son descompuestas, y de sus elementos constitutivos (aminoácidos y otros semejantes) forma sintéticamente el organismo su propia albúmina. En circunstancias normales es, pues, la pared intestinal la valla que protege los tejidos contra una inundación de albúmina extraña, que alteraría la naturaleza específica de los mismos. Pero si por vías paraenterales, es decir, mediante un rodeo que evite la protección del intestino, una

inyección intravenosa, por ejemplo, penetra albúmina extraña hasta las células vivas, provocan reacciones en éstas, que no se presentan en circunstancias normales y que producen anticuerpos en el organismo inmunizado. Para hacer comprensibles los fenómenos biológicos que se verifican con este motivo, ha expuesto EHRLICH su ingeniosa «teoría de las cadenas laterales».

Según esta teoría, debemos imaginarnos que cada molécula de albúmina viva, constituída específicamente para cada especie animal, consta de un núcleo, portador de los fenómenos de la vida, y de cadenas laterales a las cuales está encomendada la recepción de substancias nutritivas y la defensa contra substancias extrañas. Estas cadenas laterales tienen que ser desde luego muy numerosas y de naturaleza muy variada, para que sean posibles innumerables reacciones de todas clases; podemos suponer la relación entre las cadenas y el núcleo, a semejanza de las combinaciones de la serie aromática, en las que los grupos químicos substituídos en forma variadísima derivan todos del núcleo de benzol. Cada cadena reacciona solamente con una substancia albuminoidea determinada, en virtud de una propiedad de reacción electiva, conocida ya por la química más sencilla de los azúcares, y comparada por E. FISCHER a la llave que encaja en la cerradura. Y en efecto, así como una cerradura complicada sólo admite la llave que le corresponde y no puede ser abierta con ninguna otra, de la misma manera determinadas albúminas y azúcares sólo reaccionan por fermentos determinados, y en igual forma también, determinadas cadenas laterales sólo son capaces de admitir y transformar aquellas albúminas que les son convenientes. Por eso las cadenas laterales de EHRLICH se denominan también receptores, clasificados en primero, segundo y tercer orden, según que sean capaces de sujetar en uno o varios puntos las albúminas que se les aproximan, de igual manera que en los distintos elementos químicos existe una valencia diferente.

La distinta actitud de los receptores respecto de las substancias nutritivas y de las albúminas extrañas consiste en lo siguiente: la substancias nutritivas, tan pronto como son puestas en circulación en el organismo, son conducidas al núcleo del plasma vivo y allí son asimiladas o transformadas; las albúminas extrañas son fijadas por las cadenas y luego rechazadas en unión del receptor que las fijó por ser inútiles para el plasma vivo. Las cadenas laterales perdidas con este fenómeno, pero sólo las de aquella clase de la rechazada específicamente con la albúmina extraña, son reemplazadas en seguida, y sucede esto en gran escala con arreglo a la ley de la hipertrofia compensadora (WEIGERT), que rige toda regeneración resultante de una excitación permanente, de manera que los receptores formados en abundancia quedan finalmente libres en el torrente circulatorio. Estos receptores, que libres en la sangre fijan en ella misma y hacen inofensivas las nuevas aportaciones de la albúmina extraña que les corresponde específicamente, antes de que pueda llegar siquiera a las células vivas, son los que constituyen las *substancias específicas* o *anticuerpos*.

De la manera de formarse se deduce, desde luego, que obran con todo rigor específico, es decir, únicamente contra el antígeno que motivó su formación, pues sólo los receptores unidos al antígeno correspondiente son producidos en mayor número y liberados a los plasmas orgánicos. Según esta teoría no es difícil explicar la inmunidad histógena persistente aún mucho tiempo después de no existir anticuerpos en el suero. La célula, aun cuando no desprende ya constantemente receptores libres, conserva la capacidad de responder con facilidad a la excitación específica correspondiente, en virtud de la conocida ley fisiológica del ejercicio; el antígeno o el correspondiente microparásito, al penetrar de nuevo en el organismo después de mucho tiempo, no encuentra ciertamente en el suero sanguíneo substancias que le neutralicen inmediatamente, pero es soportado por la célula misma con mucha mayor rapidez que la primera vez que penetró y con menos perjuicio del estado general; estas reacciones abreviadas o «precoces» aparecen notablemente al repetir la vacuna contra la viruela (v. PIRQUET). Es materialmente imposible, dada la reducida extensión de este capítulo, explicar, ni aun con brevedad, todos los detalles relacionados con la inmunidad, que ha llegado a constituir una ciencia independiente, ni cabe tampoco discutir las posibles interpretaciones por medio de la teoría de EHRLICH o de cualquier otra hipótesis; esto queda reservado a tratados especiales, con excepción de los hechos más importantes de significado práctico, que se expondrán en los siguientes capítulos especiales. Sería necesario deducir de las leyes biológicas generales, por una parte, la multiplicidad, no sólo en cuanto a su número, sino en cuanto a su variedad, de los efectos de los anticuerpos, y por otra, la especificidad de los mismos anticuerpos, así como la relación entre la inmunidad de los tejidos y la existencia de substancias específicas disueltas en la sangre. Sólo de una cuestión nos ocuparemos aquí todavía. El enlace entre el antígeno y el receptor no se hace siempre directamente; la unión es directa entre las toxinas y las antitoxinas; pero en otros casos, especialmente por lo que respecta a las bacteriolisinas y hemolisinas, el enlace no es inmediato, sino que se verifica por medio de un tercer cuerpo, el complemento; la presencia o la falta de esta fijación del complemento es, a su vez, el fundamento de un método especial de diagnóstico (fijación del complemento), que expondremos más adelante. La prueba de la existencia del complemento puede hacerse en la forma siguiente: se calienta a 56° durante una media hora un suero específico bacteriolítico o hemolítico, obtenido mediante el tratamiento previo del animal con una bacteria o con glóbulos rojos de una especie animal determinada; al calentarlo pierde el suero su poder específico disolvente de las bacterias o de la sangre, pero el mismo suero «inactivado» recobra su actividad, es decir, es «reactivado» aun cuando se hubiera guardado inactivado meses o años enteros, con sólo añadirle suero normal y reciente de un animal (cobayo). De este experimento se desprende que en el suero inmune había dos substancias diferentes, una de las cuales, de naturaleza termo-

estable, contenía en sí la acción específica, en tanto que la otra, de carácter termolábil, no es específica y existe ya en el suero normal de un animal sin previo tratamiento. El anticuerpo termoestable y específico no puede ejercer por sí su acción disolvente de la sangre o de las bacterias, sino que necesita el auxilio del reactivo inespecífico y termolábil, que, por completar la acción no consumada entre el antígeno y el cuerpo inmune, se denomina *complemento*.

El anticuerpo específico recibe el nombre de *amboceptor*, porque reacciona en dos sentidos, fijando por un lado el antígeno (glóbulo de sangre o bacteria) y por otro el complemento. Si la reacción se mantiene primero a 0° y se la pone luego en la estufa (experimento de separación por el frío de Ehrlich y Morgenroth), se demuestra que a 0° se verifica únicamente la unión específica entre el antígeno y el amboceptor, y después de esto y a temperatura más elevada se realiza la unión no específica del complemento, lo cual constituye una nueva prueba de la existencia independiente del anticuerpo y del complemento.

A continuación nos ocuparemos de las clases de anticuerpos más importantes y de los fenómenos de inmunidad que de ellos se derivan.

2. Antitoxinas

Antes hemos dicho ya, que a las células del organismo humano o animal corresponde la propiedad de responder a la introducción de toxinas de origen bacteriano, así como de ciertas toxinas vegetales o animales, de naturaleza albuminoidea, formando substancias protectoras que hacen inofensiva la toxina. Estas substancias protectoras se llaman *antitoxinas*. Son específicas, es decir, que obran solamente contra la toxina empleada en la inmunización (C. Fraenkel y Brieger, Behring y Roux). Pero también en sueros normales del hombre o de animales puede comprobarse la existencia de antitoxinas diversas. Wassermann llegó a comprobar cantidades considerables de antitoxina diftérica en un 60 % de los niños y en un 80 % de los adultos; se han encontrado, además, antiestafilosinas y antihemolisinas, y Neisser hace resaltar que pueden existir varias antitoxinas al propio tiempo en un mismo individuo. Con la inmunización se consigue una cantidad mucho mayor de antitoxinas. Por inyección, al principio, de pequeñas dosis de toxina y aumentadas luego poco a poco, es posible inmunizar los animales contra grandes cantidades de la misma (Behring). Algunos días después de cada inyección, una vez pasada la fase negativa, particularmente notable después de grandes dosis, aumenta el contenido de antitoxinas en la sangre del animal inmunizado. Inoculando suero que contenga antitoxinas a otros animales *(inmunización pasiva)* se les protege contra una dosis de toxina administrada después, mortal seguramente sin la previa inyección inmunizante *(acción profiláctica)*, y hasta se consigue curar animales con síntomas manifiestos de la enfermedad *(acción curativa)*. También en el tubo de ensayo podemos convencernos de la neutralización de la

acción de la toxina por las antitoxinas, pero ésta requiere algún tiempo para verificarse. De todos modos, este hecho demuestra que la neutralización de las toxinas por las antitoxinas se realiza directamente, tal como una reacción química sencilla, sin intervención del organismo vivo. La combinación de toxina y antitoxina es una substancia indiferente al organismo. Las antitoxinas no se han podido obtener puras y aisladas hasta hoy. Por su composición son parecidas a los cuerpos albuminoideos, y añadiendo sulfato amónico, cloruro de zinc u otros reactivos semejantes se precipitan junto con las albúminas del suero y así se obtienen en concentraciones elevadas. Entre los 55° y 65° de temperatura, las toxinas se destruyen rápidamente y por completo; igualmente, la luz, el aire y los ácidos las alteran.

Al inocular a un individuo sano las antitoxinas, éstas son eliminadas del aparato circulatorio con cierta rapidez; por eso la inmunidad pasiva no es de larga duración; en la inyección profiláctica contra la difteria el efecto dura de dos a tres semanas. En organismos infectados, las antitoxinas se combinan con las toxinas o se fijan a las células del organismo.

Los sueros de gran valor antitóxico sirven, por consiguiente, al doble fin de proteger el organismo sano contra la posible infección, y de curar al enfermo neutralizando las toxinas que circulan en la sangre y, si es posible, separando los venenos ya fijos a las células. Lo último es más difícil de conseguir o no se consigue en absoluto, lo cual explica que el valor curativo de un suero antitóxico (el del tétanos, por ejemplo), puede ser mucho menor que su valor preventivo.

Las antitoxinas con fines terapéuticos se preparan inmunizando caballos, en tal forma, que cada c.c. de suero de caballo contenga la mayor cantidad posible de antitoxinas. Estos sueros de alto poder antitóxico sólo pueden obtenerse cuando se dispone, para el tratamiento previo de los caballos, de una toxina muy activa. La toxina se aplica en inyecciones subcutáneas, primero a pequeñas dosis, que luego se van aumentando con intervalo aproximado de una semana para cada inyección. Los animales, a cada inyección, aparecen con fiebre, reacción local e infiltración en el punto inyectado. Si la reacción es muy intensa, se vuelve a administrar la misma dosis después que aquélla ha cedido; y si la reacción ha sido ligera, se puede aumentar la dosis. En el éxito de la inmunización desempeñan un papel importante las condiciones individuales, las diferencias de raza de los animales, el empleo de toxinas muy enérgicas y el seguir atentamente todo el curso del proceso.

Breve resumen de las antitoxinas más importantes descubiertas hasta la fecha

Antitoxinas contra toxinas bacterianas: Antitoxina diftérica y antitoxina tetánica (Behring), antitoxina del botulismo (Kempner), antitoxina disentérica (Kruse-Shiga), piociánica (Wassermann), de la peste porcina (Grassberger y Schattenfroh), antileucocidina (Denis y van der Velde) y antilisina contra bacteriolisina (Denis y van der Velde, Madsen, Neisser y Wechsberg, Kraus, etc.).

Antitoxinas contra venenos animales: Contra el veneno de las serpientes (Phisalix y Bertrand, Calmette), del escorpión (Calmette), de la araña (Sachs), de la anguila (Camus y H. Kossel), de la salamandra (Phisalix), del sapo (Proscher) y de la sanguijuela (Wendelstadt).

Contravenenos de venenos vegetales: Contra la ricina, abrina y robina (Ehrlich), crotina (Morgenroth) y contra el polen, que causa la fiebre de heno (Dunbar).

Antifermentos: Contra el lab (Morgenroth), pepsina (Sachs), tripsina (Achalme), fibrinfermento (Bordet y Gengou), ureasa (Moll), lactasa (Genard), tirosinasa (Genard), cinarasa (Morgenroth), esteapsina (Schütze) y fermento de los cultivos de bacterias (v. Dungern).

3. Bacteriolisinas

Las bacteriolisinas fueron descubiertas por R. Pfeiffer en el año 1894 con ocasión de sus estudios sobre la inmunidad del cólera. Si inyectamos bacilos del cólera, procedentes de un cultivo puro, en la cavidad peritoneal de un conejillo de Indias inmunizado contra el cólera, los vibriones mueren en el corto plazo de un cuarto de hora a media hora, fenómeno que podemos comprobar por el examen microscópico del líquido peritoneal extraído con una pipeta. En el líquido se ve que los vibriones, al principio con vivo movimiento, se transforman muy pronto en gránulos inmóviles y pálidos, que finalmente se disuelven por completo y desaparecen. Todo este proceso es debido a fuerzas hostiles a las bacterias, existentes en el líquido orgánico claro, libre por completo de elementos celulares, del animal inmunizado y, por consiguiente, se realiza sin la intervención de los fagocitos. El animal conserva la vida, mientras que otro sin inmunizar, inyectado al mismo tiempo para comprobación, muere a consecuencia del desarrollo de los vibriones inyectados. El mismo proceso bacteriolítico se provoca en un animal sin previa inmunización, si al mismo tiempo que los vibriones del cólera se le inyecta una pequeña cantidad de suero anticolérico. El suero contra el cólera por sí solo no ejerce acción bactericida en el tubo de ensayo, como no sea empleándolo completamente fresco, inmediatamente después de obtenerlo del animal vivo; en cambio, la bacteriolisis se verifica también en el tubo de ensayo, si al suero específico se le añade suero reciente de un cobayo. El poder bactericida del suero específico desaparece a los pocos días por sí solo y también se destruye inmediatamente si se le calienta a 55° durante media hora. Todos estos hechos se explican admitiendo la hipótesis de que los anticuerpos bacteriolíticos no producen la disolución de los vibriones directamente, sino que necesitan el auxilio del complemento; éste se encuentra en los líquidos orgánicos del animal vivo, así como durante un tiempo muy breve en el suero reciente, pero es destruído al calentar el suero o pasado algún tiempo. Con fines diagnósticos, la bacteriolisis se realiza experimentando en animales (experimento de Pfeiffer), o experimentando en el tubo de ensayo.

El experimento de Pfeiffer, así como la prueba de aglutinación, es el elemento biológico de más valor que poseemos para determinar la especificidad de un cultivo sospechoso de cólera o fiebre tifoidea. El experimento de Pfeiffer únicamente es posible con cultivos virulentos, porque los no virulentos, como los vulgares saprofitos, perecen desde luego en los líquidos orgánicos normales del animal sin necesidad de suero específico.

Antes del experimento principal se hace otro de control para asegurarse de la virulencia del germen; a este fin se aplica a un cobayo, A, una inyección intraperitoneal de un asa normal (2 mgr.) de cultivo en agar diluída en caldo ordinario, sin ninguna otra substancia; el cultivo debe ser reciente, aproximadamente de 18 horas. Es necesario un segundo control para excluir la posibilidad de que la bacteriolisis se verifique quizá por la acción del suero normal; para ello un segundo cobayo, B, recibe un asa del mismo cultivo con suero normal de conejo en cantidad 50 veces mayor que la titulación del suero bacteriolítico contra el cólera, obtenido también de conejo, que se ha de emplear después en el experimento principal. Si, por ejemplo, la titulación conocida del suero anticolérico es igual a 0·0002, es decir, que bastan 0·2 miligramos de este suero para destruir un asa del cultivo de cólera en la inoculación al animal, en este caso se emplean 10 mgr. de suero normal de conejo para la comprobación del suero normal en el cobayo B. Las inyecciones intraperitoneales se practican con agujas de punta roma para evitar que pueda herirse el intestino, y para que estas agujas penetren fácilmente, antes de la inyección se corta la piel del cobayo con tijeras hasta llegar a la capa muscular; por el mismo, corte más tarde, se pueden introducir tubos capilares muy delgados hasta la cavidad peritoneal, y por este medio se consigue obtener una gotita de exudado para el examen microscópico en gota pendiente. Si, como resultado de este examen, hecho veinte minutos después de practicada la inyección y repetido en caso de duda a los sesenta, se comprueba la existencia de numerosos vibriones con vivo movimiento, quedan confirmados con seguridad la virulencia del germen y el efecto no específico del suero, y se verifica a continuación el experimento principal. Este consiste en inyectar en dos cobayos (C y D), a cada uno, un asa ordinaria del cultivo que se va a investigar empleado ya en los experimentos de comprobación, añadiendo cantidades distintas de suero bacteriolítico anticolérico; al cobayo C, 5 veces la dosis de titulación, que si ésta es la admitida anteriormente supone 1 miligramo, y al cobayo D, 10 veces la dosis, por consiguiente 2 miligramos. Si de estos dos animales C y D recogemos el exudado de la cavidad peritoneal, y a los veinte o lo más tarde a los sesenta minutos de la inyección se observa el fenómeno de Pfeiffer, es decir, formación de gránulos y más tarde completa disolución de los vibriones, el cultivo empleado es un cultivo del cólera; si los vibriones se desarrollan en el suero específico (animales C y D) lo mismo que en suero normal (animal B), esto indica que no se trata del verdadero vibrión del cólera, sino de un vibrión semejante a éste. En igual forma que para el cólera puede ser empleado el experimento de Pfeiffer para diagnosticar la fiebre tifoidea; pero, en este caso, el plazo de observación necesario para que terminen de disolverse los bacilos debe prolongarse hasta dos o tres horas.

Así como en el experimento de PFEIFFER, el empleo de un suero bacteriolítico conocido sirve para confirmar la especie de un cultivo desconocido, puede también servir inversamente, en analogía con la reacción de WIDAL (V. pág. 94), el empleo de un cultivo auténtico para comprobar la existencia de anticuerpos específicos disolventes de bacterias en el suero de un convaleciente y con ello precisar el diagnóstico de una enfermedad pasada. Para esta experiencia se inyectan dos cobayos, cada uno con un asa de cultivo de cólera auténtico, añadiendo a la primera 10 miligramos y a la segunda 50 miligramos de suero del individuo, y a un tercer cobayo, como control, con un asa de cultivo sin suero, observando después la aparición o ausencia del fenómeno de PFEIFFER; el resultado positivo de la bacteriolisis demuestra que el individuo ha sufrido el cólera. De igual manera puede experimentarse respecto al tifus. Merecen citarse todavía algunas reglas técnicas de importancia para realizar la reacción de PFEIFFER. Como suero específico bacteriolítico se usa con preferencia el de conejo, tratando previamente el animal con inyecciones intraperitoneales de cultivo auténtico; los cobayos empleados en el experimento no deben pesar más de 200 gramos; el material de cultivo usado para la inyección debe ser diluído en caldo ordinario y no en suero fisiológico, porque en éste los vibriones del cólera sufren con frecuencia alteraciones. Finalmente, llamamos una vez más la atención sobre el peligro de contagio inherente a la realización del experimento y que algunas veces ha dado lugar a infecciones de laboratorio. Cuantas veces se tome el animal se procederá a la desinfección cuidadosa de las manos: lo mejor es tomarlo con guantes de goma, porque de las incisiones en el vientre de los cobayos sale con facilidad líquido infeccioso; se comprende que las pipetas capilares usadas para extraer el líquido peritoneal no se usarán jamás con la boca, sino unidas a una pequeña pera de goma.

Rara vez se consigue comprobar la bacteriolisis en tubo de ensayo (METSCHNIKOFF y BORDET), pues *in vitro* la mayor parte de las veces sólo se llega a la formación de gránulos, pero no a la disolución completa, siendo frecuente, en cambio, comprobar la acción bactericida del suero específico unido al complemento. Para la prueba bactericida en tubo de ensayo, con siembra inmediata en placas, a fin de contar las colonias desarrolladas, se procede, según M. NEISSER y WECHSBERG, en la forma siguiente: cantidades iguales de bacterias (aproximadamente 1-1000 hasta 1-5000 de asa de cultivo reciente en agar) se diluyen en solución fisiológica con 10 % de caldo y se añaden cantidades progresivamente disminuídas de suero bactericida y cantidades constantes de complemento, después de lo cual se coloca la mezcla en la estufa a 37° durante tres a cinco horas; transcurrido este tiempo se toman partes iguales de cada una de las mezclas (en cada tubo habrá de 2 a 3 c. c.) y mezcladas con agar líquido se vierten en placas de PETRI a fin de contar posteriormente las colonias desarrolladas; como sólo las colonias bien claras tienen valor, basta con la estimación aproximada de su número. Como complemento se emplea, como de costumbre, suero

reciente de cobayo, o mejor todavía de un animal de la misma especie que el que sirvió para preparar el suero específico bactericida; por una serie de pruebas, con cantidades gradualmente disminuídas de complemento solo, nos aseguramos de que en la experiencia fundamental la dosis de complemento empleada es inferior a la que de por sí tiene ya efecto bactericida. Otras comprobaciones de igual orden son precisas con el suero normal y con el líquido en que están diluídas las bacterias, empleando ambos, solos, sin adicionarles substancia alguna. Se observa a veces, usando las concentraciones fuertes del suero específico, que la acción bactericida es menor que con las dosis medias. M. NEISSER y WECHSBERG explican este fenómeno como una desviación del complemento, por la presencia de gran cantidad de amboceptores del suero inmune, ya que el complemento resulta fijado en parte por ellos exclusivamente y no entra ya en funciones en la acción bactericida.

4. Opsoninas y bacteriotropinas

La antigua controversia existente entre METSCHNIKOFF, que opinaba que la inmunidad era debida a los fagocitos, y los sabios alemanes (especialmente EHRLICH y PFEIFFER), que atribuían la inmunidad a las substancias específicas de la sangre o a las producidas por los tejidos en el momento de la infección, ha sido resuelta, en cierto modo, por las investigaciones realizadas en estos últimos años por WRIGHT y NEUFELD, que dieron como resultado el conocimiento de que los fagocitos comienzan a desarrollar su actividad contra los gérmenes de algunas infecciones, cuando estos gérmenes han sido modificados por determinadas substancias existentes en el suero de la sangre, de tal manera que resultan apropiados para ser digeridos por las células. WRIGHT comprobó la existencia de estas substancias en el suero de la sangre de sanos y enfermos y les dió el nombre de *opsoninas*. NEUFELD encontró en el suero sanguíneo de animales inmunizados substancias parecidas a las opsoninas, pero no idénticas, ya que resisten temperaturas de 56°, punto en que las opsoninas son destruídas, y a las cuales llamó *bacteriotropinas*. La comprobación de las opsoninas puede utilizarse, según WRIGHT, para el diagnóstico, porque el poder de las opsoninas, con relación al germen específico correspondiente medido por el índice opsónico, es menor en los enfermos que en los sanos, probablemente a consecuencia de la fijación de anticuerpos por parte de los gérmenes. El índice opsónico se determina, según WRIGHT, calculando, por una parte en el enfermo y por otra en el sano, el número de bacterias englobadas por un número determinado de leucocitos de la sangre; a ese número de bacterias se le denomina *cifra fagocitaria*, y la relación de ambas al dividir la obtenida en el enfermo por la correspondiente al individuo sano, dará el *índice opsónico*. La práctica de esta determinación es como sigue: para obtener los leucocitos se mezcla la sangre de un hombre sano, inmediatamente después de extraída, con un volumen doble de una solución anticoagulante (citrato de sosa al 1'5 %); se somete la mezcla a la centrifugación, y una vez lavada con suero fisiológico se

obtienen los glóbulos sanguíneos; la experiencia puede realizarse aunque existan hematíes mezclados con los leucocitos. Las bacterias necesarias para el experimento se obtienen diluyendo un asa de cultivo reciente de agar en suero fisiológico; si la experiencia se hace con bacilos de la tuberculosis se usará una emulsión de los mismos bacilos muertos que vende la casa Hochster. Para verificar la reacción se aspiran sucesivamente con una misma pipeta capilar graduada, cantidades iguales de suero, glóbulos y emulsión bacteriana, depositando y mezclando el conjunto sobre un portaobjetos bien limpio; la gota resultante se aspira y se expulsa de la pipeta repetidas veces para realizar bien la mezcla, y recogida finalmente en la pipeta, se cierra ésta a la lámpara y se la deja en la estufa a 37° durante veinte minutos; después se lleva de nuevo la gota al portaobjetos, se la extiende con el borde de otro, y después de seca, se fija durante tres minutos con una disolución saturada de sublimado. Una vez coloreada se contará en la preparación el número de bacterias contenidas en 100 leucocitos. Todo esto se hará, una vez con suero de un hombre sano y otra con el suero del enfermo objeto de la investigación. La cifra resultante de dividir el número obtenido en el enfermo por el encontrado en el sano es lo que constituye el índice opsónico.

La investigación de las bacteriotropinas, según Neufeld, no demuestra la cifra de los gérmenes fagocitados, sino la máxima dilución del suero en que aún se percibe la fagocitosis, en tanto que en el suero normal que nos sirve de control no se observa, lo cual demuestra que en el primero está aumentada la fagocitosis que normalmente existe en todos los sueros. Los leucocitos se obtienen de abscesos humanos y de la sangre o del líquido peritoneal de cobayos o de conejos que días antes habrían recibido una inyección intraperitoneal de dilución de aleurona en caldo; los leucocitos quedarán desprovistos del suero por medio de lavados repetidos y cuidadosa centrifugación. El suero que se va a investigar después de inactivado se mezcla con cantidades progresivamente disminuídas de partes iguales de la emulsión de bacterias y de la emulsión de leucocitos; la mezcla se hace en pequeños tubos de ensayo. Transcurrido un plazo, que varía según la especie de bacteria examinada, desde quince a treinta minutos para el vibrión del cólera hasta varias horas para los neumococos, el suero se separa por centrifugación y del sedimento se hace una preparación teñida. Por comparación con un suero normal y un control de leucocitos se determina cuál es la dilución más tenue de suero en la que se favorece aun de manera perceptible la fagocitosis y se obtiene así la titulación del suero investigado. En las experiencias con suero poco diluído, lo mejor es emplear leucocitos de la misma especie, porque el suero heterólogo puede ejercer una acción perjudicial.

Vacunando al paciente con pequeñas cantidades exactamente dosificadas de una emulsión de gérmenes específicos muertos (bacterioterapia) se refuerza la proporción de opsoninas después de transcurridos los primeros días, en los cuales disminuye (fase negativa).

5. Aglutininas

Al mezclar un suero específico con una emulsión de cultivos homólogos, ocurre un fenómeno particular, que al examen microscópico, consiste en un apelotonamiento de las bacterias y que a simple vista o con la lupa parece una formación de copos o grumos en el líquido, antes uniformemente turbio y lechoso, hasta que por fin las bacterias aglutinadas se precipitan y determinan en el fondo del tubo un sedimento, a la vez que se clarifica el líquido que está por encima de ellas. Este fenómeno se denomina *aglutinación* o *aglomeración*, y las substancias del suero que lo producen reciben el nombre de *aglutininas*.

Las aglutininas fueron descritas en 1896 por Gruber y Durham e independientemente de ellos por R. Pfeiffer y Kolle. Se forman probablemente en los órganos hematopoyéticos (bazo, médula y ganglios linfáticos). La acción aglutinante del suero específico no disminuye la capacidad de desarrollo de las bacterias.

La reacción de aglutinación puede verificarse en tubos de ensayo o en gota pendiente. Valiéndose de este último procedimiento puede verse directamente al microscopio, cómo las bacterias de la fiebre tifoidea, vivamente móviles al principio, se mueven después más lentamente y permanecen quietas más tarde, uniéndose unas a otras en pequeños copos, que van aumentando de tamaño, y caen por fin al fondo. En el tubo de ensayo puede seguirse a simple vista el proceso de la aglutinación. Si una vez depositados los copos en el fondo se agita el tubo, se esparcen de nuevo, pero inmediatamente se observa la repetición de la aglutinación, mientras que en el tubo control, en el cual falta el suero específico, no se forma precipitado alguno, y si se forma, al agitar el tubo se reconstituye por largo tiempo el aspecto turbio de la emulsión.

La aglutinación depende de la dilución mayor o menor del suero específico. En sueros sin diluir, el fenómeno de la aglutinación se verifica rápidamente; en diluciones débiles, próximas al límite de titulación, tarda mucho en aparecer; para los bacilos tíficos una o dos horas; con bacilos de la disentería, hasta veinticuatro horas. En la estufa a 37° se acelera la reacción; para algunas bacterias pueden emplearse temperaturas hasta de 50° y 55°.

Acerca del fenómeno de la aglutinación hay varias hipótesis sin que ninguna llegue a explicarlo satisfactoriamente y en todos sus detalles. La hipótesis de Gruber, según la cual se trata de una hinchazón de la cubierta de las bacterias producida por la acción específica del suero y seguida de la reunión de los gérmenes, está rechazada por la exacta observación microscópica de las bacterias aglutinadas, en las que no se ha podido percibir hinchazón alguna ni cambios de forma, así como tampoco alteraciones de coloración. Kraus y Paltauf explican la aglutinación como consecuencia de una precipitación por la cual las bacterias son arrastradas al fondo. Pero la experiencia de su separación por el calor demuestra que las aglutininas y las precipitinas no son idénticas. Calentando a 60° desaparecen las precipitinas de un suero

aglutinante sin que disminuya su poder de aglutinación. Las aglutininas mismas sólo son destruídas a los 70°, y son también bastante resistentes respecto de otras influencias exteriores (luz, desecación, etc.) Merece notarse que la aglutinación sólo se verifica *in vitro*, pero no en el organismo vivo, por ejemplo: por la inyección intravenosa de bacterias en un animal inmunizado respecto a ellas.

En los sueros normales se encuentran con frecuencia aglutininas naturales, que a diferencia de las aglutininas del suero específico pierden su propiedad ya a las pocas diluciones. De ningún modo puede considerarse como específica la acción de las aglutininas normales. Asimismo puede ocurrir que el suero de un animal inmunizado esté dotado de una reacción no específica, sobre todo si se emplea puro o poco diluído. Sólo puede hablarse de especificidad de las aglutininas cuando las diluciones elevadas del suero (1 : 1000 hasta 1 : 10000) aglutinan las bacterias homólogas y no las heterólogas.

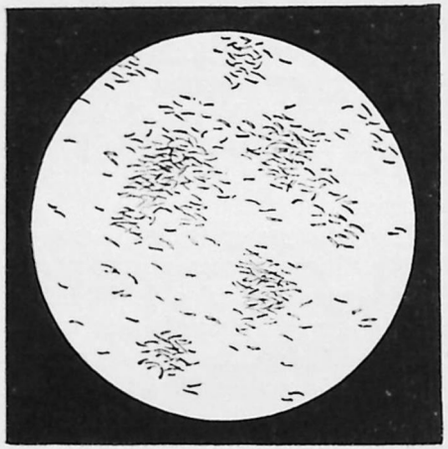


Fig. 39. Bacilo tífico (aglutinación) aumento 1:500

Los sueros de alto valor específico pueden contener, además de las aglutininas principales, otras secundarias o parciales y, por consiguiente, coaglutinar especies próximas a la bacteria específica; así, por ejemplo, un suero antitífico aglutina hasta cierto grado, además del agente específico, otros bacilos pertenecientes al grupo tifus-coli. Por eso en la aplicación práctica al diagnóstico es preciso siempre graduar exactamente la dilución del suero hasta alcanzar el límite de titulación, porque los grupos de bacterias de especies afines no son aglutinados por un suero específico extremadamente diluído.

Para obtener pequeñas cantidades de suero aglutinante se prefieren los conejos entre los pequeños animales de laboratorio, porque los sueros de este animal alcanzan una acción específica muy alta, y en cambio, la aglutinación de grupo es poco elevada. Con 3 ó 4 inyecciones intravenosas, con intervalos de ocho a diez días, empezando por un cuarto de asa y progresando hasta 1 ó 2 asas de cultivo de veinticuatro horas en agar, se obtiene un suero de valor elevado con una titulación de 1 : 1000 a 1 : 10000, según la especie del germen. Con cultivos de gran poder tóxico (disentería Kruse-Shiga) es conveniente aplicar las primeras inyecciones con gérmenes muertos. Para la obtención de grandes cantidades de suero se inmunizan caballos o asnos.

De la misma manera que en los animales inmunizados artificialmente, existen en el suero sanguíneo del hombre aglutininas específicas durante o después del curso de una enfermedad infecciosa, cuya demostración tiene grandes aplicaciones para el diagnóstico clínico. Sin embargo, como se forman en cantidades menores que por la inmunización artificial, los resultados negativos de la aglutinación no contradicen la existencia de una infección determinada.

Rara vez se ha comprobado la formación de aglutininas en los portadores de bacilos.

La apreciación de si existe aglutinación o no, se logra con mayor acierto por la observación a simple vista o con lupa (aglutinoscopio)

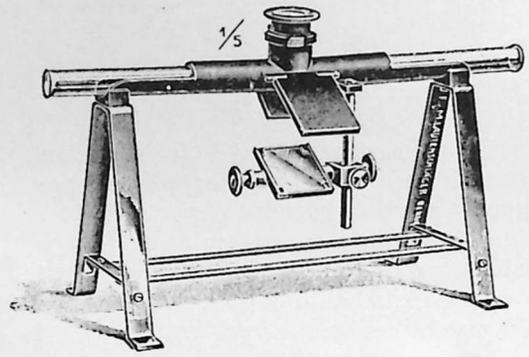


Fig. 40. Aglutinoscopio de Kuhn-Woithe

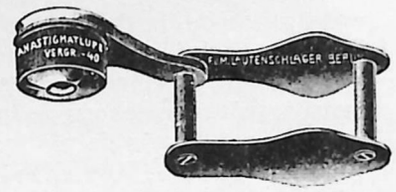


Fig. 41. Lupa

o con el microscopio a débil aumento ; no es aconsejable el empleo de grandes aumentos, y menos aún de la lente de inmersión, porque entonces, pequeñas agrupaciones como las que aparecen en gota pendiente, si las bacterias no están bien repartidas, pueden tomarse erróneamente por aglutinación. Es característico de la verdadera aglutinación específica el desarrollo progresivo del proceso, así como la proporción del sedimento según las cantidades de suero específico empleado.

La reacción de aglutinación según la técnica indicada por Pfeiffer y Kolle se verifica del modo siguiente :

Se preparan diluciones de suero al 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500, etc.; se vierte 1 c. c. de cada dilución en un tubo, y a cada uno de éstos se añade una porción igual (un asa o sea 2 mg.) de cultivo sobre agar, de diez y ocho a veinte horas, agitándolo con la aguja de platino hasta que la emulsión sea homogénea, es decir, que no haya partículas de cultivo sin separar, porque, de lo contrario, sobre todo en las concentraciones fuertes, comienza a precipitarse la masa de cultivo desde el primer momento. No debe prescindirse de comprobaciones con suero normal y solución fisiológica. Tampoco debe emplearse para esta investigación cultivos que, por ser demasiado recientes o demasiado viejos, presenten aglutinación espontánea en la solución fisiológica. La aglutinación puede considerarse como específica únicamente cuando se produce con diluciones de suero específico de 10 a 20 veces más elevadas que las de suero normal de un animal de la misma especie. Los tubos se mantienen en la estufa a 37° más o menos tiempo, según la especie del germen (el bacilo de la fiebre tifoidea y del cólera, dos horas ; el de la disentería, veinticuatro), y después de este tiempo se observan a simple vista o con pocos aumentos (lupa o aglutinoscopio) y con preferencia a la luz del día reflejada por el techo de la habitación.

En lugar de la emulsión de cultivos sólidos puede emplearse una emulsión homogénea de bacterias procedentes de cultivos en caldo vivos, que presentan siempre un enturbiamiento regular, o también bacterias muertas que pueden mantenerse en la cámara frigorífica en emulsiones utilizables durante meses. Estas emulsiones se preparan como sigue :

Cultivos de veinticuatro horas en caldo se mezclan con soluciones de fenol al 0'5 % o de formalina al 1 %. La mezcla de cultivo tífico y formalina permanece dos días a 37° en probetas graduadas, para que las bacterias que aglutinan espontáneamente caigan lentamente al fondo y no puedan perturbar después las pruebas de aglutinación. El líquido de la parte superior se distribuye en tubitos estériles y se conserva en la cámara frigorífica. La emulsión de bacterias debe agitarse fuertemente antes de usarla.

En este principio se funda el preparado de von Ficker expendido por la casa E. Merck, de Darmstadt, con el nombre de « Tiphus-Diagnosticum ».

En lugar de la exacta determinación cuantitativa de la titulación según antecede, basta a veces para formar juicio sobre colonias sospechosas la « *aglutinación de orientación* » realizada sobre el portaobjetos. Por ejemplo, si en una placa de Endo aparece una colonia clara y transparente, sospechosa de bacilo tífico, se toma una pequeña porción de ella con la aguja de platino y se deshace en una gota de suero antífico diluído al 1 : 50 y al 1 : 100, y se coloca sobre el portaobjetos o en gota pendiente. Inmediatamente y de la misma manera se preparan las comprobaciones en suero fisiológico y suero normal. Si la sospecha de fiebre tifoidea es fundada, se percibirá a simple vista o con pocos aumentos una formación grumosa, mientras que los controles seguirán con su aspecto lechoso uniformemente turbio. Para el diagnóstico definitivo, especialmente cuando se trata de un primer caso, no basta esta prueba. Es preciso entonces practicar la prueba de la aglutinación cuantitativa con determinación del límite de titulación. Esto es indispensable, porque puede presentarse una aglutinación incompleta muy por debajo de la titulación del suero empleado, lo cual no significa otra cosa que una paraaglutinación o reacción de grupo no específica (Ph. Kuhn).

La diferencia entre la reacción de grupo (coaglutinación) y la paraglutinación consiste en lo siguiente: en la última se trata de una cierta tendencia de aglutinación, pasajera en la mayor parte de los casos, adquirida por bacterias, que en nada se parecen al germen específico, ya que ni siquiera tienen parentesco biológico con él, a consecuencia de la vida en común sostenida en los cultivos o en el contenido intestinal (por ejemplo, el colibacilo con el de la disentería). Los cultivos y los caracteres morfológicos, además de la prueba de la fermentación de la glucosa y la movilidad del germen, permiten la distinción en estos casos. En la coaglutinación se trata, por el contrario, de una reacción positiva en mayor o menor grado con especies afines al germen (por ejemplo, entre los bacilos tíficos y paratíficos) ; si la aglutinación cuantitativa y comparada, empleando diversas clases de sueros (tíficos y

paratíficos), no nos da en estos casos la solución indudable, como puede ocurrir dentro del grupo paratífico mismo, nos quedan aún dos métodos que emplear ; a saber ; la prueba de saturación de Castellani, descrita más adelante, y la inmunización activa de conejos realizada con los cultivos dudosos, a fin de obtener un suero, cuya especificidad comprobaremos con cultivos auténticos bien conocidos. Como la sero-reacción tiene un valor específico no sólo entre un suero conocido y el cultivo que se investiga, sino también en sentido inverso, entre el suero obtenido con un cultivo dudoso y un germen de laboratorio auténtico, de

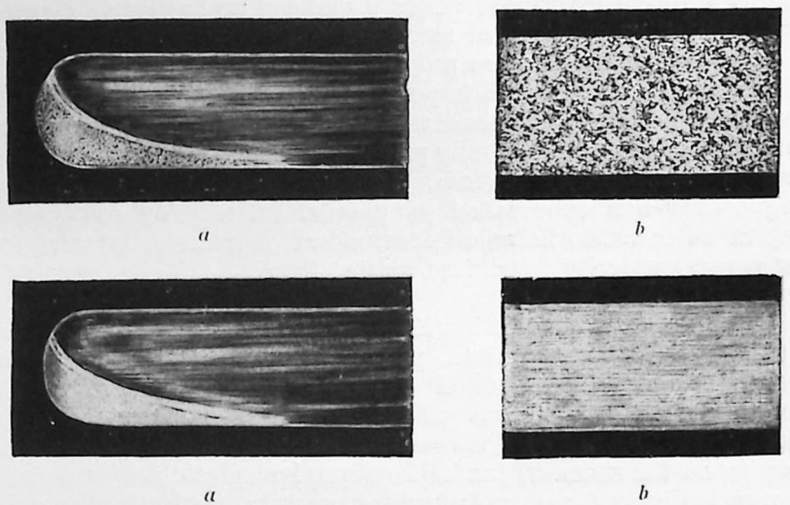


Fig. 42. I. Aglutinación positiva con bacilos de fiebre tifoidea y suero antitífico : *a*, observación a simple vista ; *b*, con lupa o aglutinoscopio. II. Resultado negativo de la aglutinación con suero normal y bacilos de la fiebre tifoidea : *a*, observación a simple vista ; *b*, con lupa

aquí que, si obtenemos, por ejemplo, un suero específico con un germen que sospechamos paratifus B, este suero debe de aglutinar fuertemente el paratifus B auténtico de la colección del laboratorio.

Estos dos últimos procedimientos nos resolverán también la cuestión en los casos en que se trate de gérmenes « sero-resistentes » como algunos bacilos de la fiebre tifoidea que presentan todas las propiedades morfológicas y de cultivo del bacilo tífico, y, sin embargo no son aglutinados, o se aglutinan con gran dificultad por el suero antitífico. Estas razas inaglutinables recobran su aglutinación normal por siembras diarias en medios recientemente preparados.

Se refiere todo lo anterior al empleo de un suero de gran poder aglutinante para el diagnóstico indudable de un cultivo (*V.* capítulos especiales del cólera, tifoidea y disentería) y de su distinción de especies afines. Para ello hemos partido siempre de un suero conocido que nos sirve para definir un cultivo dudoso, pero es posible también seguir una

marcha inversa y emplear la aglutinación para identificar los anticuerpos de un suero desconocido con ayuda de bacterias conocidas (reacción de GRUBER-WIDAL), lo cual tendrá aplicación al diagnóstico diferencial. Si queremos saber, por ejemplo, si un suero procede de una fiebre tifoidea o de disentería, primero procuraremos fijar cuantitativamente, aumentando cada vez más la dilución del suero, su contenido en aglutininas tíficas o disentéricas. Preparadas las diluciones, se añaden cantidades iguales de emulsión de bacilos de disentería o fiebre tifoidea y se disponen también controles de suero normal. Si después de permanecer dos horas en la estufa a 37°, observamos que el suero muy diluído aglutina los bacilos tíficos y que con los bacilos de disentería produce efectos análogos al suero normal, podremos afirmar ya que el suero dudoso es un suero procedente de una fiebre tifoidea.

Esta reacción tiene una importancia práctica muy grande; pues por una parte sirve para diagnosticar la enfermedad en sus comienzos, porque el organismo responde muy pronto a la infección (en la segunda semana) produciendo aglutininas, y, por otra parte, sirve también para diagnosticar una enfermedad ya pasada. La reacción de WIDAL se emplea en casos de fiebre tifoidea, cólera, disentería, intoxicaciones por carnes, enteritis, paratifus, peste, fiebre de Malta, meningitis, muermo, etc.

En la prueba de aglutinación con sueros humanos, especialmente cuando la infección es mixta, podemos tropezar con dificultades al precisar el diagnóstico, si el suero aglutina en grados próximamente iguales dos cultivos diferentes, por ejemplo, de fiebre tifoidea y paratifus. En estos casos debe recurrirse a la *prueba de saturación* de CASTELLANI, fundada en que las aglutininas en presencia de mezclas bacterianas son retenidas cuantitativamente por las bacterias homólogas. Así, por ejemplo, si el suero de un enfermo dudoso aglutina en altas diluciones bacilos de paratifus y de fiebre tifoidea, al ponerle sólo en presencia de bacilos de esta enfermedad quedarán saturadas por completo las aglutininas de la misma. Si el líquido centrifugado aglutina todavía bacilos de paratifus en diluciones del mismo grado, entonces se trata de una infección mixta de paratifus y fiebre tifoidea ; pero si la propiedad de aglutinación ha desaparecido para los bacilos paratíficos, es prueba de que se trataba únicamente de una coaglutinación (véase anteriormente).

Otro fenómeno curioso puede presentarse en la práctica de la reacción de WIDAL. El fenómeno se llama «*aglutinación paradójica*» y consiste en que la aglutinación, al contrario de lo normal, es más débil con el suero muy concentrado (hasta cesar por completo) que con el suero muy diluído; se trata en estos casos, de una perturbación causada por substancias contrarias a la aglutinación y producida por las aglutininas en determinadas circunstancias.

Con arreglo a las mismas leyes establecidas para las aglutininas bacterianas, pueden aparecer y ejercer su acción las hemoaglutininas formadas al tratar previamente los animales de laboratorio con sangre

heteróloga y que tienen la propiedad de aglomerar los glóbulos rojos de las especies animales cuya sangre se utilizó para la inmunización.

6. Precipitinas

En 1897 descubrió KRAUS que, al mezclar filtrados de cultivos bacterianos con suero específico homólogo, el filtrado se enturbiaba y aparecía en él un precipitado. Esta precipitación es específica y no se produce con suero normal. Las substancias existentes en el suero específico, que producen la precipitación de los cuerpos disueltos en el cultivo filtrado, se denominan *precipitinas*. Según opiniones modernas, este fenómeno consiste en la sedimentación de substancias coloidales que se encontraban en estado de soles, y no de precipitación de cristaloides verdaderamente disueltos. Se trataría, pues, en la precipitación, de un paso de soles coloidales a geles.

Las precipitinas son poco resistentes al calor ; a los 60° pierden ya su eficacia, aunque conservan indudablemente su poder de afinidad respecto del precipitinógeno (transformación en precipitoides). Por su composición química se incluyen entre las globulinas o seudoglobulinas con las que guardan estrecho parentesco. El precipitado amorfo y muy voluminoso es una substancia albuminosa, formada en gran parte por el suero específico, extraordinariamente fina y que pasa por los filtros más perfectos ; es soluble en los álcalis y ácidos diluídos (1).

La producción de precipitinas se verifica no sólo después de inyectar bacterias u otros elementos formes, sino que representa un fenómeno de reacción general del organismo al inyectarle por vía parenteral albúminas solubles ya sean de origen animal, vegetal o bacteriano. Estas últimas substancias inmunes se llaman «*albúminoprecipitinas*» (TSCHISTOWITSCH y BORDET) para diferenciarlas de las precipitinas bacterianas. La substancia existente en el filtrado del cultivo de bacterias o en la disolución de albúminas se denomina *substancia precipitable*, y por su propiedad de llenar funciones antígenas, es decir, por ser capaz de formar anticuerpos, se conoce también con el nombre de *substancia precipitinógena*.

Para obtener sueros precipitantes se somete a los animales a repetidas inyecciones intravenosas o intraperitoneales de bacterias, de filtrados de cultivos o de extractos de bacterias que contengan albúmina microbiana. El suero transparente y estéril, al hacer la experiencia, se mezcla en cantidades cada vez menores, con otra cantidad fija estéril y completamente clara de precipitinógeno o viceversa. El resultado de la reacción depende, en gran parte, de las graduaciones cuantitativas.

El cuadro de la página siguiente pone de manifiesto la manera de ejecutar la reacción :

(1) Cuando el suero contiene también otras substancias específicas como antitoxinas, por ejemplo, éstas se precipitan al mismo tiempo.

Filtrado de cultivo de peste en caldo (precipitinógeno)	Suero antipestoso (precipitina)	Solución de NaCl al 0'85 %	Resultado a las 3 horas	Resultado a las 24 horas
5 c. c.	0'5	0'5	muy turbio	sedimento abundante. El líquido de encima claro.
5 »	0'1	0'9	turbio	escaso sedimento; el líquido de encima claro.
5 »	0'05	0'95	claro	no hay sedimento, claro.
Control 5 c. c.	—	1'0	claro	claro
—	0'5	5'5	claro	claro
—	0'1	5'9	»	»
—	0'05	5'95	»	»
5 c. c.	Suero normal 0'5	0'5	claro	claro

Además de este procedimiento se ha generalizado también otro, el de Ascoli, que se dispone en capas o en anillo :

En tubos de 4 a 5 mm. de anchura por 6 cm. de longitud se vierten pequeñas cantidades de suero específico, manteniendo el tubo inclinado, y sobre el suero se vierte una pequeña cantidad de antígeno, haciéndolo con sumo cuidado para que no se mezclen ambos líquidos, que deben quedar superpuestos.

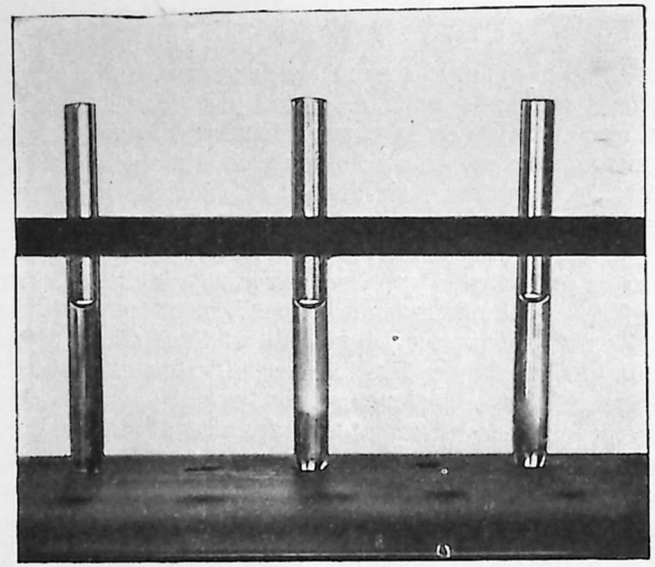
Si la reacción es positiva aparece en la superficie de contacto de ambos líquidos un anillo blanco grisáceo.

La precipitación se emplea únicamente en casos especiales para afirmar el diagnóstico, por ejemplo, cuando se trata de substancias bacterianas disueltas en exudados o líquidos orgánicos.

La precipitación ha alcanzado, en cambio, una gran importancia práctica en la diferenciación de albúminas. Los experimentos fundamentales se deben a Bordet y Tschistowitsch (1899). Estos autores observaron que el suero de conejos, tratados previamente con sangre de anguila o de caballo, producía un precipitado en las soluciones de sangre homólogas, pero no en las demás. Más tarde, Wassermann, Uhlenhut y Schutze, inyectando en conejos leche de distintos animales, consiguieron producir sueros rigurosamente específicos para las distintas clases de leche empleadas en las inyecciones, de tal manera que, por ejemplo, el suero de un conejo inyectado con leche de vaca actuaba como precipitante sobre la leche de vaca, pero no sobre la de mujer. Uhlenhut consiguió también diferenciar por este método biológico las distintas clases de albúmina contenidas en huevos de aves diferentes y determinar que por la reacción de precipitinas puede comprobarse la albúmina aun en diluciones de 1 : 100000, en la investigación de las cuales fracasan con frecuencia los métodos químicos. Estos descubrimientos tienen una importancia grande en medicina forense porque permiten distinguir la albúmina humana de la de los animales (diferenciación forense de la sangre). La diferenciación se consigue aun cuando el material sospechoso (mancha de albúmina sanguínea) esté ya seco, aun después de haber transcurrido algunos años.

La precipitación ha llegado a ser un factor importante para el examen de substancias alimenticias. Se emplea para descubrir adulteraciones en clases de carne poco estimadas, como la de caballo o la de perro. También se usa este método para el reconocimiento de las carnes saladas, ahumadas, secas o congeladas, que se importan del extranjero, para comprobar su calidad. Puede también comprobarse la pureza y origen de otros alimentos, tales como huevos, preparados de leche, miel natural y artificial. De igual manera sirve para examinar los alimentos de origen vegetal, porque con este método biológico no sólo pueden distinguirse las diferentes albúminas vegetales entre sí, sino también las de origen animal.

Pero no sólo en la práctica, sino también para resolver cuestiones teóricas resulta importante la reacción de precipitinas. Sirve



a *b* *c*

Fig. 43. Reacción de precipitinas
a, control; *b* y *c*, reacción positiva

para demostrar las relaciones de parentesco entre las distintas especies animales, por ejemplo, entre el hombre y el mono; la gallina y la paloma; el caballo y el asno; la liebre y el conejo; la zorra y el perro; la cabra, la oveja y la vaca (Uhlenhuth). Por este mismo método se descubrió el interesante hecho ontogénico y filogénico de que, si bien cada animal tiene el suero sanguíneo constituído específicamente, en cambio la albúmina del cristalino es un mismo cuerpo para todos los animales y no es posible diferenciarlo en las distintas especies.

Expondremos brevemente la técnica de la diferenciación biológica de las albúminas.

Para la inmunización, el animal más apropiado es el conejo. Deben inmunizarse al mismo tiempo varios de estos animales, porque puede perderse alguno por anafilaxia, fenómeno que suele presentarse después de la tercera inyección y que, de no

tenerlo en cuenta, puede originar retrasos inesperados. Como material de inyección se emplea suero, jugo de carne filtrado, albúmina o leche. Con intervalos de seis días se aplican a los animales inyecciones intravenosas, subcutáneas o intraperitoneales de 1 c. c. de los líquidos enumerados. Transcurridos seis días después de la última inyección se empieza por examinar la calidad del suero. Si éste es de gran poder precipitante (según UHLENHUTH, los sueros de gran valor son los preferibles en la práctica forense), se sangra el animal por completo, y el suero perfectamente claro se guarda estéril.

La titulación del suero se determina preparando diversas diluciones de 1 : 10, 100, 1000, etc., de la albúmina que se ha de analizar y de la albúmina utilizada para la inmunización (precipitinógeno), y a cada centímetro cúbico de las diluciones se añade 0'1 c. c. del suero cuya titulación vamos a fijar. Se observará la formación de enturbiamiento y precipitados ; eventualmente se hará la observación después de una hora de permanencia en la estufa, a 37°. La dilución de albúmina, en la que se perciba todavía de una manera clara el precipitado, determina la titulación del suero.

El material examinado puede tener, según hemos dicho, las procedencias más diversas. Con todas ellas hay que preparar una disolución clara como el agua. Las manchas de sangre, esperma, etc., que se hallen en las prendas de vestir, se cortan y dividen en partículas muy pequeñas, que se dejan en la cámara frigorífica, durante veinticuatro horas, sumergidas en solución fisiológica. Si el material está seco, sobre madera, etc., se rasparán las manchas cuidadosamente sirviéndose de instrumentos esterilizados, y las raspaduras se colocan también en solución fisiológica. Los extractos se clarifican completamente por filtración. Está demostrado que es conveniente emplear en el experimento el material examinado en diluciones considerables (generalmente al 1 : 1000) y el suero precipitante sin diluir. Para la determinación aproximada del grado de dilución necesario en el material testigo, nos serviremos de las reacciones siguientes :

1. Formación de espuma, que aparece al agitar una solución que contiene albúmina ;

2. Prueba de ebullición, que se practica añadiendo a la solución una gota de ácido nítrico al 25 %, con lo cual, si el líquido contiene albúmina en proporción de 1 : 1000, se pondrá turbio y opalescente.

Antes de realizar el experimento principal debemos comprobar si el suero precipitante provoca efectivamente la reacción con el líquido testigo, por ejemplo, un extracto de manchas antiguas sobre tela de sangre humana, de vaca, de cerdo, de caballo, etc.

La disposición de esta experiencia preliminar se muestra en el cuadro siguiente :

N.°	Suero precipitante de conejo	Suero normal de conejo	Líquido testigo al 1 : 1000	Solución de NaCl al 0'85 %	Resultado	
1	0'1	—	1'0	—	Enturbiamiento ligero a los cinco minutos.	Formación de copos y sedimento a los veinte minutos.
2	—	0'1	1'0	—	Líquido claro	Líquido claro
3	0'1	—	—	1'0	Líquido claro	Líquido claro

Los tubos no deben agitarse.

A la temperatura ambiente la reacción debe presentarse lo más tarde a los veinte minutos; el enturbiamiento que aparezca después no tiene valor positivo. Para distinguir con más facilidad el enturbiamiento es conveniente colocar una pantalla negra entre la luz y el tubo de precipitación.

Para comprobar si una mancha antigua sobre tela es de sangre humana o no, se dispone el análisis con los controles necesarios, según UHLENHUTH y WEIDANZ, en la forma siguiente :

		Resultado
Tubo I	Solución de la sangre en cuestión 0'9 c. c. + 0'1 de antisuero (hombre)	Enturbiamiento, copos, sedimento
» II	Solución de la sangre en cuestión 0'9 c. c. + 0'1 de suero normal de conejo	Líquido claro
» III	Solución de sangre homóloga (hombre) 0'9 c. c. + 0'1 antisuero (hombre)	Enturbiamiento, copos, sedimento
» IV	Solución de sangre heteróloga (cerdo) 0'9 c. c. + 0'1 antisuero (hombre)	Líquido claro
» V	Solución de sangre heteróloga (vaca) 0'9 c. c. + 0'1 antisuero (hombre)	»
» VI	Solución fisiológica 0'9 c. c. + 0'1 antisuero (hombre)	»
» VII	Extracto de un trozo limpio del mismo material en que radique la mancha 0'9 c. c. + 0'1 antisuero (hombre)	»

El precipitado específico del tubo I, de acuerdo con la comprobación positiva del III, y el resultado negativo en todos los demás tubos, demuestra que la solución sanguínea en cuestión investigada en el tubo I es de la misma especie que la empleada en el tubo III, es decir, de sangre humana.

Apéndice : Termoprecipitación

La termoprecipitación sirve para demostrar la existencia de antígenos bacterianos termoestables, que se encuentran en los órganos y secreciones del hombre y de los animales. Fué practicada la primera vez por ASCOLI y VALENTI en 1911 con el carbunco ; estos autores observaron que el suero anticarbuncoso determinaba precipitados específicos con extractos obtenidos por ebullición de órganos de animales enfermos de carbunco ; mientras que al emplear sueros normales y otros heterólogos específicos de tétanos, neumococia, etc., no se produjo precipitado alguno.

La preparación de extractos de órganos se hace en la forma siguiente :

Los órganos de un animal muerto de carbunco se dividen y se machacan en un mortero ; para que el extracto quede incoloro se les mezcla con 10 c. c. de cloroformo y se les deja cinco horas a la temperatura ambiente. Después de separar el cloroformo se añaden a la pulpa 5 c. c. de solución fisiológica, y al cabo de dos horas se filtra por papel o amianto. El extracto debe quedar completamente claro.

Para realizar la prueba ordinaria de precipitación, se vierte en un tubo suero anticarbuncoso perfectamente claro, y luego se añade con cuidado el extracto para que forme una capa sobre el suero. Como control se dispone otro tubo con suero normal y extracto. Si el resultado es positivo, aparece en el primer tubo, en la superficie de contacto entre ambos líquidos, un anillo blanco grisáceo, mientras que el tubo de control permanece invariable.

El procedimiento se puede simplificar considerablemente para el clínico aprovechando la termo-resistencia de las substancias precipitables. Después de emulsionar los órganos bien triturados en solución fisiológica (5 a 10 veces el volumen), se hierve la emulsión durante dos minutos, se filtra por papel o amianto y después que está fría se hace la prueba.

Este método de precipitación ha producido siempre resultados concordantes con el examen microscópico y ha servido para descubrir una infección pasada, aun en aquellos casos en que nada se resolvió con los cultivos (por predominio de los gérmenes de la putrefacción). Las pruebas de control con órganos normales dan siempre resultados negativos.

Para diagnosticar el carbunco, Ascoli ha preparado un «Diagnosticum» que vende la casa Gans, de Oberursel.

La reacción de termoprecipitinas se ha ensayado también en la infección paratífica, la tuberculosis, la fiebre de Malta, la peste, el tifus exantemático, el carbunco sintomático y el mal rojo del cerdo, y ha sido empleada con éxito (Schürmann) en las infecciones neumocócicas.

7. Hemolisinas

Fueron descubiertas por Bordet en 1898, y son substancias (amboceptores) que se encuentran en el suero normal de muchas especies animales e individuos de otras, teniendo la propiedad de disolver los eritrocitos, es decir, alterar el estroma globular, de manera que la hemoglobina queda libre y se disuelve en el suero; la sangre se vuelve transparente. Este proceso de disolución de los glóbulos rojos, llamado *hemolisis*, requiere una temperatura mínima de 15°, siéndole más favorable la de 37°. Las substancias que originan el fenómeno se denominan *hemolisinas*, que pueden ser normales si se encuentran en los animales sin tratamiento previo, o específicas si se producen artificialmente. Si a un animal de ensayo se le inyectan glóbulos rojos de sangre de otra especie, el organismo responde a este ataque formando anticuerpos rigurosamente específicos que disuelven los eritrocitos de la especie inyectada. Cuanto mayor sea la separación entre la especie del animal inyectado y la del que proporcionó la sangre que se inyectó, con mayor abundancia se producen las hemolitinas.

Estas son termoestables, soportan temperaturas de 56° a 58° sin alterarse y necesitan de complemento para el desarrollo de sus propiedades hemolíticas.

La preparación de hemolisinas de acción intensa o de amboceptores hemolíticos se verifica en la forma siguiente:

Para evitar la coagulación de la sangre, que sirve de antígeno, se la desfibrina agitándola con perlas de cristal dentro de un matraz de Erlenmeyer. El suero se separa por centrifugación, y los eritrocitos así obtenidos se limpian por completo del resto de suero por lavados y centrifugaciones repetidas con solución fisiológica. Después del último lavado se separa el líquido, se le substituye por un volumen de suero fisiológico igual al primitivo de la sangre y así resultan los eritrocitos en una concentración igual a la de la sangre, pero completamente libre de suero sanguíneo.

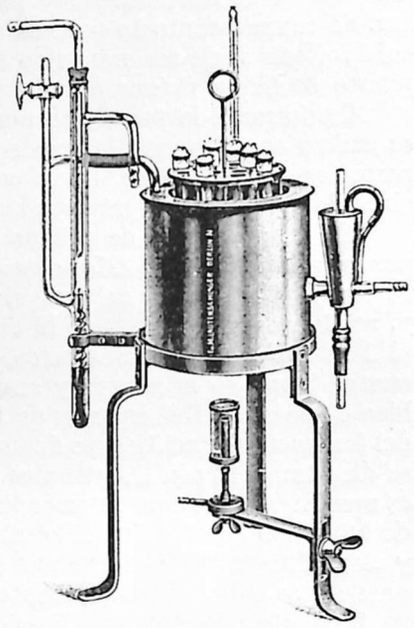


Fig. 44. Baño maría de temperatura constante para inactivaciones

En la preparación del amboceptor hemolítico pueden emplearse varios métodos de inmunización, a saber:

1. La inyección intraperitoneal de 5, 10 y 15 c. c. de glóbulos rojos lavados, en tres días consecutivos (método rápido).

2. La inyección intraperitoneal de 20 a 30 c. c. de eritrocitos lavados, dejando pasar de cuatro a ocho días entre una inyección y la siguiente.

3. Lo más sencillo es la inyección intravenosa de 1'5 a 2'5 c. c. de eritrocitos lavados, dejando pasar de cuatro a seis días entre las inyecciones, que se repiten dos o tres veces.

Las dos primeras inyecciones se soportan bien casi siempre, pero a partir de la tercera no están exentas de peligro, porque pueden presentarse fenómenos de anafilaxia (véase más adelante el capítulo correspondiente).

A los seis días después de la segunda o de la tercera inyección, según los casos, se extraerá sangre diariamente para determinar la proporción de amboceptores. Cuando la titulación es elevada, se sangra el animal.

Como mejor se consigue la conservación del amboceptor es por inactivación, calentando el suero al baño maría a 56°, con lo cual se destruye el complemento, y añadiendo después fenol, 0'5 %.

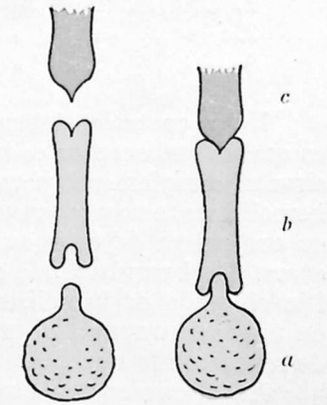


Fig. 45. Esquema del sistema hemolítico
a. Antígeno (eritrocitos)
b. Amboceptor
c. Complemento

¿Cómo se hará la titulación del am-

boceptor hemolítico? Cantidades cada vez menores de amboceptor hemolítico inactivado se mezclan con una cantidad constante de complemento y de hematíes de la especie animal utilizada para inmunizar. El complemento lo proporciona, de ordinario, el suero reciente de cobayo, que suele ser muy rico en complemento. El sistema así compuesto se llama *sistema hemolítico.*

Conforme a lo propuesto por BORDET y GENGOU, como antígeno se utiliza comúnmente la emulsión al 5 % de glóbulos rojos de carnero, frescos y lavados. Como vehículo para la emulsión es imprescindible emplear siempre la solución fisiológica al 0'85 %.

El complemento de cobayo se obtiene por sangría del animal o por punción cardíaca (MORGENROTH). Después se deja que el suero se separe por sí solo del coágulo o se le obtiene por centrifugación, y, por lo general, se emplea la dosis constante de 1 c. c. de la dilución al 1 : 20. El complemento se conserva perfectamente durante veinticuatro horas en la nevera y semanas enteras en cámaras frigoríficas bien dispuestas. Del examen de la fig. 45, que facilita la comprensión del fenómeno hemolítico, se deduce que el complemento no puede unirse directamente con los glóbulos rojos ; para que la unión se verifique es menester un cuerpo intermedio, el amboceptor, el cual, por medio de un grupo complementófilo, sirve de eslabón entre el complemento y el glóbulo rojo. Unicamente después de unido con el amboceptor puede desarrollar el complemento su acción disolvente a la manera de un fermento digestivo.

De cada una de las substancias enumeradas (véase el cuadro de la página siguiente) se vierte 1 c. c. en un tubo, se mezclan perfectamente y se añaden 2 c. c. de solución fisiológica, con lo que se obtiene un total de 5 c. c. Como controles se disponen :

1. Una emulsión de eritrocitos al 5 % + amboceptor
2. » » » » » + complemento
3. » » » » » + suero fisiológico

Estos controles deben permanecer inalterables ; en caso contrario, es que el amboceptor es inaplicable por insuficiente inactividad, o no sirve el complemento porque el suero de cobayo contiene casualmente hemolisinas, o no pueden utilizarse los eritrocitos por fragilidad anormal: en cualquiera de estos casos es necesario substituir los reactivos por otros. Si el resultado de este experimento preliminar es favorable, se fija el grado de hemolisinas por medio de otro experimento, después de una permanencia de una hora en la estufa a 37° y de doce horas de reposo en la nevera.

En el cuadro de la pág. 103 puede verse que 1 c. c. de dilución de amboceptor al 1 : 2000 es la dosis mínima indispensable para que la hemolisis sea completa; en la práctica, al realizar la reacción de WASSERMANN, por ejemplo, se tomará 1 c. c. de dilución al 1 : 1000 hasta 1 : 500, es decir, del doble al cuádruple de la dosis mínima.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE AMBOCEPTOR

Tubos	Antígeno	Amboceptor	Complemento	Suero fisiológico al 0'85 %		Resultado
1	1 c. c. de emulsión de eritrocitos de carnero al 5 %	1 c. c. $^1/_{100}$	1 c. c. de suero de cobayo al 5 %	2 c. c.	1 hora en la estufa a 37°	+ + +
2	»	1 c. c. $^1/_{600}$	»	2 »		+ + +
3	»	1 » $^1/_{800}$	»	2 »		+ + +
4	»	1 » $^1/_{1000}$	»	2 »		+ + +
5	»	1 » $^1/_{1500}$	»	2 »		+ + +
6	»	1 » $^1/_{2000}$	»	2 »		+ + +
7	»	1 » $^1/_{2500}$	»	2 »		+ +
8	»	1 » $^1/_{3000}$	»	2 »		+
9	»	1 » $^1/_{4000}$	»	2 »		0
10	»	1 » $^1/_{5000}$	»	2 »		0
11 Controles	»	—	»	3 »		0
12 Controles	»	1 » $^1/_{200}$	—	3 »		0
13 Controles	»	—	—	4 »		0

Resultado :
1 c. c. de amboceptor al $^1/_{2000}$ = dosis mínima indispensable para que la hemolisis sea completa.

Respecto a la interpretación de la reacción, es decir, acerca del grado de la hemolisis, se admiten las denominaciones siguientes :

	Sedimento :	*Líquido :*
+ + + = hemolisis completa	falta	coloreado y transparente por completo
+ + = hemolisis intensa	escaso, apenas perceptible	coloreado, pero con menor transparencia
+ = hemolisis incompleta	bastante perceptible	más o menos rojo, pero turbio
0 = hemolisis negativa	abundante (máximo)	incoloro

Para completar el tema, añadiremos que la hemolisis puede ser provocada por otras muchas substancias, tales como álcalis y ácidos; por venenos vegetales, tales como la ricina, la abrina, la crotina, la robina, la falina, y por venenos de bacterias, tales como la tetanolisina, la estafilolisina, cultivos en caldo de vibriones del cólera, estreptococos, etc., y, finalmente, por ciertos venenos animales, como venenos de serpiente y de escorpión.

En las pruebas de hemolisis es necesario conocer exactamente la eficacia del complemento, es decir, titular el contenido en complemento del suero de cobayo. La titulación del complemento se verifica mezclando 1 c. c. de emulsión de glóbulos rojos de carnero con una dosis constante de amboceptor hemolítico, que es la determinada en el experimento anterior, y dosis decrecientes de complemento y añadiendo

a la mezcla suero fisiológico (0'85 %) hasta que el volumen total en cada tubo sea de 5 c. c. (véase el siguiente cuadro).

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE COMPLEMENTO

Tubos	Antígeno	Amboceptor	Complemento	Suero fisiológico 0'85 %		Resultado
1	1 c. c. de emulsión de glóbulos rojos de carnero al 5 %	1 c. c. $^1/_{100}$	1 c. c. de suero de cobayo al 5 %	2 c. c.	Una hora en la estufa a 37°	+ + +
2	»	1 » »	0'8 c. c. »	2'2 »		+ + +
3	»	1 » »	0'7 » »	2'3 »		+ + +
4	»	1 » »	0'5 » »	2'5 »		+ + +
5	»	1 » »	0'3 » »	2'7 »		+ +
6	»	1 » »	0'2 » »	2'8 »		+
7	»	1 » »	1 » 1 %	2'0 »		0
8	»	1 » »	0'8 » »	2'2 »		0
9	»	1 » »	0'6 » »	2'4 »		0
10	»	1 » »	0'4 » »	2'6 »		0
11	»	1 » »	0'2 » »	2'8 »		0
12 Controles	»	1 » »	—	3'0 »		0
13 Controles	»	—	1 c. c. al 10 %	3'0 »		0
14 Controles	»	—	—	4'0 »		0

Significado de los signos : *V.* anteriormente, pág. 103.
Resultado : 0'025 c. c. de suero de cobayo = dosis hemolítica mínima.
Dosis que debe emplearse : 0'05 o sea 1 c. c. de suero de cobayo al 5 %.

8. Fijación del complemento y reacción de Wassermann

Los fenómenos de hemolisis que acabamos de exponer facilitan la comprensión de la fijación del complemento expuesta a continuación. El fenómeno de la hemolisis fué utilizado por primera vez por BORDET y GENGOU para demostrar la fijación del complemento.

En el experimento clásico de los mencionados autores para demostrar la unidad del complemento, mezclaron en un tubo de ensayo bacterias (bacilos de la fiebre tifoidea, por ejemplo), con suero específico homólogo inactivado (amboceptor) y complemento. Las bacterias se unieron con el complemento por medio de los amboceptores y en su consecuencia se produjo la bacteriolisis ; el complemento se gastó con ello. Añadiendo algún tiempo después a esta mezcla eritrocitos lavados y hemolisina homóloga, para comprobar si, además del bacteriolítico, hay algún complemento especial hemolítico, se demuestra, por no verificarse la hemolisis, que todo el complemento existente al comenzar la experiencia se « fijó » por la bacteriolisis y, por consiguiente, que no hay dos clases de complemento, sino uno solo, el cual actúa lo mismo en la bacteriolisis que en la hemolisis. Aparte de esta importante conclusión teórica pronto adquirió el método de fijación del complemento un valor para el diagnóstico. Conocido el antígeno, es posible determinar los amboceptores específicos en el suero examinado, y recíprocamente, conocido el suero se puede determinar la presencia y naturaleza de un antígeno

determinado y definir, por lo tanto, la naturaleza específica de una especie bacteriana.

El siguiente esquema en colores (fig. 46) permite comprender cómo se verifica la unión del complemento.

La letra A de la figura 46 comprende el sistema hemolítico : eritrocitos (carnero) rojo, amboceptor verde, complemento azul ; a la derecha y sobre la letra A tenemos un antígeno *t* (bacilo de la fiebre tifoidea, por ejemplo) violeta, y un amboceptor que no le corresponde (suero anticolérico), amarillo.

El complemento no se ha fijado a este último grupo porque el antígeno *t* y el suero específico *c* no se corresponden, lo cual hace imposible la unión ; el complemento ha quedado libre y se fijará en el sistema hemolítico añadido después. La hemolisis se verificará, por consiguiente.

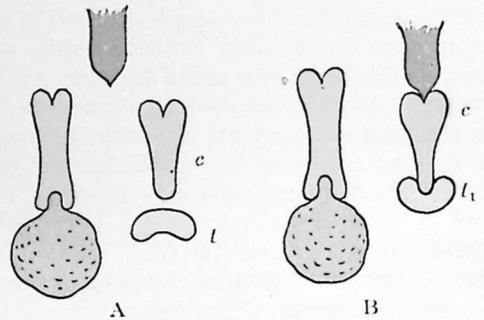


FIG. 46. Esquema de la fijación del complemento

Pero si se trata, como en la letra B de la misma figura 46, de un antígeno t_1 con el amboceptor que le pertenece, de vibriones del cólera, por ejemplo, y de suero anticolérico *c*, se realizará la unión de estos cuerpos con el complemento, y al añadir después el sistema hemolítico, la hemolisis no se verificará, porque ya se ha consumido el complemento necesario para completar el sistema hemolítico.

El sistema hemolítico sirve, por consiguiente, de indicador para hacer visible el fenómeno de la unión del antígeno con el anticuerpo específico, que no puede percibirse directamente.

El método de fijación del complemento es de gran aplicación para el diagnóstico. Es aplicable en todas las infecciones bacterianas, en las que se trate de averiguar, mediante extractos del germen, la existencia de anticuerpos en la sangre del enfermo o del sano, una vez pasada la enfermedad. Por las dificultades técnicas que ofrece este método sólo alcanzó importancia práctica en la meningitis (SCHURMANN), el rinoescleroma y el muermo de los caballos. También puede emplearse para el diagnóstico diferencial de bacterias afines.

WASSERMANN y BRUCK dieron un paso más al descubrir que también se pueden producir amboceptores con extractos de bacterias, es

decir, con substancias bacterianas disueltas, y que luego se puede comprobar la existencia de aquellos amboceptores por la fijación del complemento (fiebre tifoidea). También consiguieron, mediante ensayos de este orden, comprobar la existencia de antituberculinas en órganos de tuberculosos y en sueros de estos enfermos tratados previamente con tuberculinas. De una importancia práctica mucho mayor fué lo conseguido en 1906 por WASSERMANN, A. NEISSER y BRUCK, aplicando al diagnóstico de la sífilis el método de BORDET y GENGOU de la fijación del complemento. Los investigadores citados encontraron anticuerpos sifilíticos, primero en el suero sanguíneo de monos inoculados experimentalmente de sífilis y curados después, y más tarde encontraron los mismos anticuerpos en la sangre de enfermos sifilíticos y en el líquido céfalo-raquídeo de paralíticos (PLAUT).

El serodiagnóstico de la sífilis no sólo presta grandes servicios para comprobar la enfermedad en casos dudosos, sino que es siempre un dato indispensable para su acertado tratamiento; en tanto que el resultado de la reacción sea positivo, el virus sifilítico existe en el organismo y ha de contarse con la posibilidad de recaídas; sólo el resultado constantemente negativo de la reacción garantiza la curación.

La reacción de WASSERMANN (R. WA.), denominación abreviada de este método, requiere una técnica complicada; no es una de esas pruebas que pueda practicar el clínico en las horas de consulta. A ser posible debe ser realizada en Institutos especiales que disponen de personal especializado y pueden practicarla con las comprobaciones necesarias.

En esta reacción intervienen 5 substancias, de las cuales nos ocupamos a continuación por separado.

I. Como *antígeno* se utiliza un extracto de hígado de feto sifilítico o también de órganos normales, tales como corazón de cobayo o hígado humano. Respecto de la significación teórica del empleo de extractos de órganos normales para el resultado de la R. WA., véase lo que exponemos más adelante.

El extracto de hígado sifilítico se prepara en la forma siguiente: Lo primero que debe hacerse es examinar al microscopio para ver si contiene espiroquetos; en caso afirmativo, se divide el hígado y, mezclado con arena de mar, se machaca cuidadosamente en un mortero. La masa se pone en frascos de litro, y por cada gramo de hígado se añaden 50 c. c. de alcohol de 96°; después se deja reposar el extracto durante cuarenta y ocho horas, dejándolo en la estufa por la noche; al día siguiente se le agita, a ser posible continuamente, por medio de un aparato agitador, y puede dejársele aún otra noche en la estufa. Después se filtra hasta que quede completamente claro.

Según otro método, el hígado desmenuzado se seca al vacío y se le pulveriza en un mortero. Después se añaden 50 c. c. de alcohol de 96° por cada gramo de hígado en polvo y se continúa la preparación del extracto como antecede.

El filtrado es un líquido claro ligeramente amarillento; se conserva largo tiempo en frascos obscuros y bien tapados, guardados en armarios frigoríficos. Antes de emplearlo en la reacción se diluye convenientemente en suero fisiológico.

II. *Suero*, líquido cerebroespinal o ascítico, etc. La sangre del enfermo sospechoso se centrifuga y se recoge el suero claro con una

pipeta. Una parte del suero se inactiva a la temperatura de 56° durante media hora, y de este modo, inactivado y estéril, se conserva, en caso necesario, durante algunos días en sitio fresco. El resto del suero se conserva por si conviene practicar la modificación introducida por STERN al método original de WASSERMANN. Al líquido cerebroespinal no es preciso inactivarlo, pues carece de complemento. Siempre son necesarios, por lo menos, dos sueros de control, uno de ellos de un individuo indudablemente no sifilítico y otro de sifilítico indudable, para las comprobaciones negativa y positiva, respectivamente.

III. *Complemento.* Como suero portador del complemento se emplea el suero fresco de cobayo. Este suero se extrae el mismo día del experimento por aspiración directa del corazón del animal mediante una jeringuilla o desangrado por la yugular, recogiendo la sangre, en este caso, con un embudo limpio que sólo se emplea para estos fines. El suero se obtiene por centrifugación; debe emplearse reciente y no debe estar expuesto ni a la luz ni al calor antes de usarlo en la reacción. Si, por cualquier retraso, fuese preciso conservar el suero, puede hacerse guardándolo en la cámara frigorífica. En la reacción se emplea 1 c. c. de una dilución al 1/20 en solución fisiológica al 0'85 %.

IV. *Amboceptor hemolítico*; véase el capítulo HEMOLISINAS.

Antes de emplear en la R. WA. el suero de conejo, como amboceptor hemolítico, debe inactivarse durante media hora a 56° para destruir el complemento que pudiera aún contener. En sitio fresco y obscuro se puede conservar largo tiempo el amboceptor, pero antes de usarlo hay que comprobar siempre el grado de su eficacia.

V. *Glóbulos rojos* (sangre de carnero).

La sangre se extrae de la yugular el día del experimento o la tarde anterior; se agita para separar la fibrina y se centrifuga, teniendo antes el cuidado de señalar el nivel de la sangre en los tubos de centrifugación. Después de algunos minutos de centrifugación se separa el suero y se substituye por solución fisiológica. Se vuelve a centrifugar, se separa de nuevo la solución fisiológica, hasta renovarla tres veces, para que el lavado de la sangre sea perfecto y quede completamente libre de suero. Finalmente se vuelve a verter solución fisiológica hasta la marca señalada. En la reacción se emplean los glóbulos rojos así obtenidos, en emulsión con suero fisiológico al 5 %, es decir, 5 partes de glóbulos por 95 partes de solución fisiológica al 0'85 %.

La práctica de la reacción de WASSERMANN es como sigue:

Ensayo previo. Antes de la reacción se realiza un previo ensayo en el cual son titulados el amboceptor, el complemento y el efecto anticomplementario del extracto.

1. *Determinación de las dosis de amboceptor* (V. HEMOLISINAS). Por experimentos anteriores se conoce, aproximadamente, la titulación del amboceptor. Si en el experimento último, la dosis mínima de amboceptor que hemolizaba por completo era 0'0006 c. c., pueden ensayarse las siguientes dosis: 0'0008, 0'0006, 0'0004, 0'0002. En cada tubo se añade, además, 0'1 c. c. de complemento y la cantidad de solución fisiológica necesaria para que el volumen total sea de 4 c. c., añadiendo, por último, 1 c. c. de solución de glóbulos rojos de carnero al 5 %. Se agita ligeramente el tubo y se le deja una hora en la estufa a 37°. Si

en este caso sucede, por ejemplo, que la sangre se ha disuelto por completo en los dos primeros tubos, en tanto que en los últimos la hemolisis es parcial, se emplea entonces para la reacción principal el triple o cuádruple de la dosis mínima; por consiguiente, en nuestro ejemplo, debe emplearse 0'0006 × 3 = 0'0018 c. c.

2. *Determinación de la dosis de complemento* (V. HEMOLISINAS). A dosis decrecientes de suero normal de cobayo, por ejemplo, 0'07, 0'06, 0'05, 0'04, 0'03, se añade la dosis de amboceptor que debe emplearse en la reacción principal, 0'0018, en nuestro ejemplo; se completan 4 c. c. de volumen con solución fisiológica y se añade, por último, 1 c. c. de emulsión de glóbulos rojos de carnero. La mezcla se deja una hora en la estufa a 37°. Si al cabo de este tiempo se observa que la dosis mínima disolvente es, por ejemplo, 0'05 c. c. de complemento, debe emplearse el doble o triple de esta dosis.

3. *Determinación de la dosis de antígeno*, es decir, determinación de la cantidad de extracto de hígado de feto sifilítico o de extracto de órganos normales. En el extracto preparado como se indicó anteriormente, hay que probar su acción disolvente y el grado de resistencia que ofrece a la hemolisis. En la prueba preliminar de resistencia se mezclan dosis decrecientes del extracto con el sistema hemolítico y se observa si el extracto opone alguna dificultad a la hemolisis. En la reacción principal se emplea la dosis mayor de antígeno que no llegue a ofrecer obstáculo a la hemolisis.

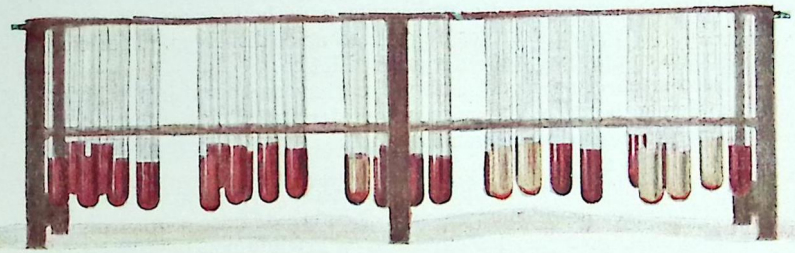
En la prueba de su acción disolvente sobre la sangre se disponen dosis decrecientes de antígeno y se añade a cada una 1 c. c. de una emulsión al 5 % de glóbulos rojos de carnero. La dosis mayor no disolvente es la que se emplea en la reacción principal.

REACCIÓN PRINCIPAL

a) *Método original de Wassermann* con suero inactivado de enfermo y complemento de cobayo. Las dosis determinadas en las experiencias preliminares se mezclan en la forma siguiente :

Antígeno I	0'1	0'05	0'02	0'01	Estos reactivos están contenidos siempre cada uno en 1 c. c. de solución fisiológica.
Antígeno II	0'15	0'1	0'05	0'02	
Suero del enfermo, inactivado media hora a 56°	0'2	0'2	0'2	0'2	
Complemento	0'05	0'05	0'05	0'05	
Estufa a 37° C. : 45-60 minutos					
Amboceptor, titulación triple	0'0005	0'0005	0'0005	0'0005	
Glóbulos rojos de carnero en emulsión al 5 %.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	
45-60 minutos en la estufa a 37° C.					

Como se ve en el cuadro, a las dosis decrecientes de antígeno se añaden el complemento y el suero del enfermo en el que se ha de investigar la existencia de anticuerpos sifilíticos. Estos tres elementos se mantienen durante tres cuartos de hora en la estufa a 37° para que se unan. Procediendo de este modo, prescindimos del contenido en



R.WA. negativa | R.WA. dudosa | R.WA. positiva débil | R.WA. positiva intensa | R.WA. positiva muy intensa

Controles en segunda fila

FIG. 47. Diferentes grados del resultado de la reacción de WASSERMANN reunidos en una gradilla

complemento variable en el suero investigado y trabajamos con factores conocidos.

Las diferentes diluciones de antígeno, de complemento y de suero del enfermo se hacen previamente en 1 c. c. de solución fisiológica. La



FIG. 48. R.WA. positiva intensa

FIG. 49. R.WA. positiva débil | R.WA. dudosa | R.WA. negativa

solución de amboceptor se mezcla previamente con los glóbulos rojos y se deja la mezcla un cuarto de hora a 37° para facilitar la unión (sensibilización). Reunidos todos los componentes vuelven a dejarse los tubos en la estufa a 37° por espacio de cuarenta y cinco a sesenta minutos. En cada tubo, el volumen total de líquido debe ser de 5 c. c., pero por razones de economía se puede hacer la reacción con la mitad

de cada una de las dosis indicadas, de manera que el volumen total de líquido sea 2'5 c. c. para cada tubo.

Si el suero del enfermo contiene amboceptores sifilíticos, el complemento se une al sistema sifilítico (antígeno + amboceptor sifilítico), y no quedará complemento disponible para la función del sistema hemolítico; los glóbulos rojos de carnero no se disuelven. En este caso la reacción es positiva y el enfermo es sifilítico.

Pero si en el suero del enfermo no hay amboceptores sifilíticos, el complemento queda libre y se une posteriormente al sistema hemolítico, con lo cual se disuelven los glóbulos rojos de carnero; la reacción es negativa.

Lo mismo que el suero de la sangre pueden emplearse también para la reacción otros líquidos orgánicos del enfermo, tales como el líquido cerebroespinal, la leche, los exudados y los líquidos pleuríticos, del pericardio, del peritoneo y de hidrocele.

En las afecciones del sistema nervioso central, el empleo del líquido cerebroespinal puede ofrecer ventajas sobre el suero sanguíneo. Como en muchos casos el líquido cerebroespinal no puede neutralizar el efecto disolvente del antígeno con las dosis de 0'1 empleadas para el suero, para conseguir este efecto se aumentan las dosis de líquido cerebroespinal a 0'2, 0'4, y hasta 0'8, aunque desde luego no debemos emplear dosis tan elevadas, que por su parte dificulten la reacción. En los controles se emplearán dosis dobles de líquido cerebroespinal sin antígeno.

Es recomendable emplear siempre varios antígenos. Después de una hora en la estufa a 37° se añade hemolisina anticarnero y glóbulos rojos homólogos mezclados entre sí media hora antes. Los tubos se introducen de nuevo en la estufa durante una hora más. La observación del resultado definitivo se hace después de permanecer los tubos de doce a veinticuatro horas en la nevera. Para formular juicio sólo son decisivas la hemolisis completa o la falta absoluta de ella. La hemolisis incompleta tiene también valor cuando guarda relación con las cantidades de antígeno empleadas. El resultado negativo de una sola reacción por sí solo no significa nada en contra de la sífilis.

En igual forma y como comprobación se examinan dos sueros, el uno positivo y el otro negativo, bien conocidos por el resultado de las reacciones hechas anteriormente.

Los demás controles son:

1. Control del antígeno; prueba del antígeno solo para reconocer el obstáculo que opone a la hemolisis.

2. Controles del suero; uno para comprobar si el suero hemoliza en unión del antígeno, amboceptor y eritrocitos, pero sin complemento; y otro para probar si ofrece obstáculo a la hemolisis, usado en dosis dobles.

3. Controles del sistema hemolítico (*V.* Hemolisinas).

En una reacción de Wassermann con controles, los tres primeros tubos son los que corresponden a la reacción propiamente dicha y con-

tienen los elementos propios de la reacción, es decir, suero del paciente, complemento, y dosis decrecientes de antígeno: además, deben prepararse otros tres tubos (serie número 1*a* — número 3 *a*) lo mismo que los anteriores, pero con otro antígeno. Los números 4 a 6 son los

Controles	I	II	III	IV	V	VI	VII
Antígeno	0'2 ó 0'3	0'1 ó 0'15	—	—	0'1	—	—
Suero del enfermo inactivado media hora a 56°	—	—	0'4	0'2	0'2	—	—
Complemento	0'05	00'5	0'05	0'05	—	—	0'05
45 a 60 minutos en la estufa a 37° C.							
Amboceptor, dosis triple de su titulación.	0'0005	0'0005	0'0005	0'0005	0'0005	0'0005	—
Glóbulos de carnero al 5 %	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
45 a 60 minutos en la estufa a 37° C.							
Resultado	hemolisis	hemolisis	hemolisis	hemolisis	no hay hemolisis	no hay hemolisis	no hay hemolisis

Ejemplo de una reacción de Wassermann positiva con controles

Tubos	1	2	3	4	5	5*a*	6	7	8	9
Antígeno	0'1	0'05	0'01	—	0'1	0'1	—	—	—	—
Suero del enfermo	0'1	0'1	0'1	0'2	—	0'1 Suero sifilítico positivo indudable	—	—	—	—
Suero normal.	—	—	—	—	0'1	—	0'2	—	—	—
Complemento	0'05	0'05	0'05	0'05	0'05	0'05	0'05	0'05	0'05	—
Amboceptor	0'004	0'004	0'004	0'004	0'004	0'004	0'004	0'004	—	—
45 a 60 minutos en la estufa a 37° C.										
Emulsión de eritrocitos al 5 %	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
NaCl al 0'85 %	—	—	—	—	—	—	—	1 c.c.	1 c.c.	2 c.c.
45 a 60 minutos en la estufa a 37° C.										
Resultado	no hay hemolisis			hemolisis		no hay hemolisis	hemolisis	hemolisis	no hay hemolisis	

controles del obstáculo que pueden ofrecer a la hemolisis el presunto suero sifilítico y el normal. El número 5 es un control completo con suero normal. El número 5*a* es el control con suero sifilítico. El número 7 es un control del sistema hemolítico. Los números 8 y 9 son controles para demostrar el buen estado de los glóbulos rojos.

b) *Modificación de Stern* con suero humano activo sin añadir complemento de cobayo. Las dosis de antígeno serán $^1/_5$ y $^2/_5$ de las empleadas en el método original de Wassermann. Se emplea el suero humano aprovechando su complemento, y por eso no se inactiva el suero del enfermo. Después de unir al antígeno una dosis de 0'2 c. c. de suero del enfermo, se dejan los tubos tres cuartos de hora en la estufa, se añade luego 1 c. c. de emulsión de glóbulos de carnero al 1 : 40 y una dosis de amboceptor nueve veces mayor que la determinada en el ensayo previo y diluída en 1 c. c.; después de lo cual se vuelve a dejar los tubos durante una hora en la estufa. Como control sin antígeno se pone suero de enfermo 0'2 + 9 veces la dosis de amboceptor + emulsión de glóbulos de carnero al 1 : 40 (*V.* el cuadro siguiente):

Suero activo de enfermo....	0'2	0'2	0'2
Antígeno	0'05	0'02	—
Una hora en la estufa, a 37°			
Amboceptor, 9 veces la dosis de su titulación	0'0015	0'0015	0'0015
Emulsión de glóbulos de carnero al $2\,^1/_2$%.....	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Completar hasta 4 c. c. con solución fisiológica			

Con el líquido cerebroespinal, que no tiene complemento alguno por estar libre de albúmina, no puede emplearse este método.

La modificación de Stern es de más sencilla práctica y da resultados positivos con más frecuencia que el método original de Wassermann, porque, según Busila, en algunos sueros sólo existen anticuerpos termolábiles, pero el resultado positivo en la reacción de Stern no tiene el mismo valor que en el procedimiento de Wassermann; cuando el resultado de ambas es contradictorio, no se puede establecer el diagnóstico de sífilis únicamente por el que nos da la de Stern; la falta de hemolisis en la reacción de Stern da solamente motivo de sospecha. Por eso, si es posible, debe repetirse la reacción pasado algún tiempo para aclarar el diagnóstico. En la modificación de Stern ha de tenerse en cuenta el defecto original de que el contenido de complemento en el suero humano, aun siendo fresco, es variable e inconstante.

La hipótesis admitida primeramente de que en la reacción de Wassermann, en analogía con las otras de inmunidad, se trataba de una reacción específica entre antígeno y anticuerpo, es decir, del antígeno sifilítico con su anticuerpo, ha sido abandonada desde que se ha conseguido promover la misma reacción empleando extracto de órganos normales, lecitinas, jabones u oleatos de sosa, en lugar del extracto de hígado sifilítico. Las investigaciones de Porges, Friedemann, Elias y P. Schmidt indican que la reacción positiva es producida por una transformación de las albúminas del suero sifilítico, que no ocurre en el suero normal, que podría explicarse admitiendo que las globulinas, transformadas cualitativa o cuantitativamente, por su afinidad a los lipoides y extractos coloides se precipitan en partículas

pequeñísimas que absorben el complemento, reacción que impide la albúmina en el suero normal. Klaussner, añadiendo 3 partes de agua al suero sifilítico, produjo una precipitación en el mismo basada también en una alteración de las globulinas.

La R. Wa. no depende estrictamente de la unión específica entre el antígeno y el anticuerpo, sino que, por lo menos en parte, es una reacción lipoide no específica, lo cual no altera en lo más mínimo su valor diagnóstico en la práctica. El no ser rigurosamente específica puede explicarnos que la R. Wa. dé resultado positivo en una serie de enfermedades en las que existen evidentemente modificaciones de proporción o calidad entre globulinas y lipoides, semejantes a las ocasionadas por la sífilis. En este caso está la lepra, la frambesia de los trópicos, algunos estados febriles y caquécticos, la escarlatina, el paludismo, la fiebre recurrente, el tifus exantemático, la peste y el beriberi, enfermedades que, o no aparecen en nuestras latitudes, o se diferencian claramente de la sífilis por el cuadro clínico. Además, la R. Wa. positiva en estas enfermedades es, en la mayor parte de los casos, completamente pasajera, y en el tifus exantemático se observa sólo con suero activo, pero no en el inactivado. Por la misma razón es comprensible que, después de la anestesia, que trae consigo una alteración de los lipoides, sea positiva algunas veces la R. Wa.

Investigaciones modernas han demostrado que también los helmintos pueden producir en el organismo atacado anticuerpos comprobables por la fijación del complemento. Esta reacción ha sido especialmente estudiada en las infecciones de equinococos, en las cuales tiene significación práctica para el diagnóstico diferencial. Como antígeno se utiliza el líquido obtenido por punción de un quiste hidatídico (preferible de carnero) empleando directamente el líquido, un extracto alcohólico del mismo o el extracto alcohólico de las paredes del quiste.

La reacción se verifica en la siguiente forma:

Tubos	Líquido hidatídico	Suero inactivado del enfermo	Dilución del complemento al 5 %	NaCl		Emulsión de glóbulos de carnero al 5 %	Amboceptor, titulación triple	Resultado de la hemolisis
1	0'4	0'5	1'0	1'1	45 a 60 minutos en la estufa a 37°	1'0	1'0	0
2	0'4	0'4	1'0	1'2		1'0	1'0	0
3	0'4	0'3	1'0	1'3		1'0	1'0	0
4	0'4	0'2	1'0	1'4		1'0	1'0	0
5	0'4	—	1'0	1'6		1'0	1'0	+ + +
6	—	0'5	1'0	1'5		1'0	1'0	+ + +
7	—	0'4	1'0	1'6		1'0	1'0	+ + +
8	—	0'3	1'0	1'7		1'0	1'0	+ + +
9	—	0'2	1'0	1'8		1'0	1'0	+ + +

La fijación del complemento puede emplearse también en lugar de la reacción de precipitinas para diferenciar las albúminas, especialmente

en los análisis forenses de sangre, porque es más sensible (M. Neisser, Sachs, Moreschi). Como anticuerpo, se emplea suero antihumano obtenido de conejos por previo tratamiento con sangre humana. Si la sangre analizada procediese del hombre, se unirá como antígeno específico con el suero testigo y fijará el complemento, según se demuestra añadiendo después el sistema hemolítico.

9. Hipersensibilidad (Anafilaxia)

El estudio de la anafilaxia ha constituído, por su desarrollo en los últimos años, una rama independiente de la investigación científica de la inmunidad. Se entiende por anafilaxia el estado de hipersensibilidad adquirido por el organismo animal con la inyección parenteral de albúmina heteróloga, ya sea de procedencia animal, vegetal, o bacteriana. Si al organismo de un animal de sangre caliente se le aporta albúmina heteróloga, al cabo de algún tiempo se desarrolla en aquél una hipersensibilidad específica, es decir, que un animal tratado en esa forma reacciona contra una segunda inyección de la misma albúmina heteróloga, que puede no ser tóxica en sí, con síntomas de aguda enfermedad y perece con frecuencia rápidamente.

Behring fué el primero que describió en el año 1893 las manifestaciones de hipersensibilidad con toxina diftérica. Las verdaderas investigaciones fundamentales de la anafilaxia contra las albúminas se deben a Richet. Este autor, al inmunizar en 1898, perros, con suero venenoso de anguila, en lugar de inmunidad les produjo hipersensibilidad, y observó que, repitiendo las inyecciones, morían los animales inyectados. Recientemente se han descubierto estudios muy anteriores que Magendie realizó en 1839 sobre la muerte de animales a consecuencia de repetidas inyecciones intravenosas de albúmina. Richet trabajó, sin embargo, con una albúmina tóxica, cuando la anafilaxia debe ser promovida precisamente por albúminas no venenosas, que producen, no obstante, graves efectos tóxicos después de repetidas inyecciones; la substancia empleada por Richet carecía, además, de importancia práctica. Solamente después que se determinó con certeza que la inyección de cualquier substancia albuminoidea extraña (suero, órganos, bacterias) produce anafilaxia, nació la idea de establecer las leyes biológicas que rigen estos fenómenos. Pirquet, en sus estudios acerca de la enfermedad del suero, la revacunación y la reacción cutánea, dió una descripción precisa del cuadro clínico de la anafilaxia. Entretanto, las experiencias de Arthus sirvieron de base para el conocimiento exacto de las condiciones en que se pueden producir los fenómenos de anafilaxia en los experimentos con animales. Arthus inyectó suero de caballo en conejos por vía subcutánea intraperitoneal e intravenosa sin causarles alteraciones. Sin embargo, repitiendo las inyecciones aparecieron síntomas morbosos en los animales; así, de este modo, los conejos tratados por inyecciones subcutáneas de suero de caballo, a los que se repetía luego la inyección por la vena auricular, presentaron inmediatamente

síntomas graves. Los animales se pusieron intranquilos y amilanados; la respiración subió hasta 200 y 250, evacuaron heces, se echaron sobre un costado y perecieron. Con leche de vaca logró también Arthus producir hipersensibilidad. Casi al mismo tiempo que Arthus, v. Pirquet y Schick publicaron una comunicación en la que expusieron como principio que «el organismo tratado por substancias patógenas conserva largo tiempo la propiedad de responder rápidamente con síntomas morbosos a una nueva acción del mismo agente». El suero heterólogo es considerado por ellos especialmente entre esas substancias patógenas. Pirquet y Schick hicieron sus estudios en individuos tratados repetidas veces por suero de caballo. Estos investigadores comprendieron todas las manifestaciones morbosas debidas a la inyección de suero extraño bajo el nombre de «enfermedad del suero».

La anafilaxia puede ser *natural* y *artificial*.

Entre las anafilaxias naturales, innatas o constitucionales, se comprenden las idiosincrasias que aparecen en algunos individuos después de comer ciertos alimentos como carne de cerdo, cangrejos, fresas, etc.

De mayor interés para nosotros es la anafilaxia artificial originada por tratamiento con albúminas extrañas y que puede considerarse específica, puesto que sólo es provocada por la inyección repetida de la misma clase de albúmina. Los distintos sueros de caballo, vaca, anguila; la albúmina de huevo, leche, extractos orgánicos, espermatozoos, eritrocitos, cristalino triturado, albúminas vegetales o bacterianas y levaduras pueden emplearse como antígeno capaz de producir anafilaxia.

Como animal de ensayo se utiliza el conejillo de Indias, porque de todos los animales es el que demuestra mayor sensibilidad a los venenos anafilácticos, aunque las particularidades individuales y las diferencias de raza pueden trastornar con frecuencia los ensayos. Sin entrar en detalles de la técnica de experimentación, indicaremos únicamente que lo primero es sensibilizar el animal con inyecciones de cantidades de suero muy pequeñas, de 0·001 c. c., por ejemplo. Después ha de transcurrir cierto tiempo para que se pueda demostrar la anafilaxia. Próximamente, el día 11.° después de la primera inyección, se hace la reinyección con la misma dilución de albúmina. En las reinyecciones subcutáneas se aplican de 5 a 6 c. c. de solución; en las intravenosas, intracardíacas o intracerebrales bastan cantidades menores, 0·25 c. c. Si el animal reacciona con anafilaxia, aparecen los síntomas característicos: inquietud, asfixia, tos, dolor al oprimirles el vientre inflamado, vértigo, respiración frecuente, debilidad de los latidos cardíacos, evacuación espontánea de excremento y orina, y muerte. Con frecuencia sucede que algunos animales se reponen después del grave coma. Los cobayos mueren asfixiados a consecuencia de la contracción tetánica de la musculatura bronquial. Según Kraus y Biedl, la causa de la rigidez y del enfisema pulmonar agudo es debida a la convulsión intensa de los músculos bronquiales. Los pulmones de los ani-

males muertos por *shock* anafiláctico están distendidos y se hallan desprovistos de sangre. Examinados al microscopio, los alvéolos están dilatados, sus paredes adelgazadas y los vasos vacíos.

La reacción anafiláctica debe considerarse como estrictamente específica. Los animales tratados con leche de vaca reaccionan únicamente a la reinyección de la misma leche, pero no a la de cabra, y viceversa.

También la inyección de células y extractos orgánicos provoca una anafilaxia específica. Sólo los extractos de cristalino difieren en este punto y ofrecen la particularidad de contener un sensibilinógeno especial (anafilactógeno) común a todas las especies animales.

A diferencia de la anafilaxia activa descrita anteriormente, la anafilaxia pasiva se produce inyectando a un animal (B) el suero de otro (A), al que se ha tratado previamente con albúmina, produciéndose en el primero síntomas de anafilaxia al reinyectarle después la solución de la misma albúmina.

De innumerables experimentos se deduce que es posible la transmisión pasiva de la hipersensibilidad. La transmisión se consigue de un cobayo o de un conejo hipersensibles a un cobayo normal (Otto, Dörr y Raubitschek); pero, en cambio, no puede transmitirse del cobayo al conejo. Por lo común, para producir experimentalmente la anafilaxia pasiva se trata previamente a los conejos, y su suero se inyecta después a los cobayos. Los conejos son los productores de suero, y los cobayos los verdaderos animales de experimento.

También es posible la transmisión de la anafilaxia por herencia. Según las investigaciones de v. Rosenau y Anderson, la hipersensibilidad pasa de la hembra a su descendencia independientemente de que la madre adquiera la anafilaxia antes o después de la concepción. Por la leche no se transmite la hipersensibilidad.

Acerca de lo que sea la anafilaxia existen las más diversas teorías. De la posibilidad de transmisión pasiva se deduce que en la sangre de los animales anafilácticos circulan substancias, que llamamos « cuerpos de reacción anafiláctica » o « anticuerpos anafilácticos » (sensibilisina de Besredka). Según este bacteriólogo, estos anticuerpos residen principalmente en las células nerviosas, y parte de ellos circulan libremente en la sangre. Para que aparezcan fenómenos de anafilaxia es necesario, además, otro cuerpo, el antígeno, anafilactógeno o sensibilinógeno. Así, pues, si inyectamos a un animal, tratado previamente, el antígeno correspondiente, al ponerse éste en contacto con los cuerpos de reacción anafiláctica provocaremos los fenómenos de hipersensibilidad.

Se forma en estos casos un veneno que ataca el sistema nervioso central. Friedberger consiguió preparar *in vitro* este veneno, que denominó anafilatoxina, mezclando anafilactógeno y cuerpos anafilácticos y añadiendo, además, complemento. Este se consume en la fijación de los anticuerpos anafilácticos con el antígeno, según pudieron probar Friedberger y Hartoch en animales sensibilizados activa y pasivamente, y Friedberger en experimentos *in vitro*.

Muy recientemente, los experimentos de P. Schmidt permitieron deducir la posibilidad de una explicación completamente distinta de la anafilaxia, fundada en principios físicoquímicos. Consiguió P. Schmidt producir el ataque típico de anafilaxia sin el concurso de albúmina extraña, por inyección de suero homólogo tratado *in vitro* con engrudo de almidón libre de albúmina, y como el suero preparado en esta forma y filtrado por filtro Berkefeld deja de ser venenoso, se trata visiblemente de una absorción de las partículas que anteriormente contenía el suero, en fina suspensión, las cuales, más tarde, se precipitan en los capilares del pulmón. El trastorno que esto origina en los cambios respiratorios es la causa del edema pulmonar y de los demás síntomas graves del choque anafiláctico.

Cuando un animal sobrevive al choque anafiláctico se forman en su organismo antianafilaxinas, esto es, substancias que neutralizan la anafilaxia que se produce por nuevas inyecciones de suero. Estos animales son, por consiguiente, inmunes y, según Otto, este estado antianafiláctico es pasajero, ya que en realidad, según sus observaciones, la inmunidad absoluta subsiste sólo durante 17 días.

Recientemente se ha conseguido producir también con albúminas bacterianas ataques de anafilaxia completamente análogos a los causados con los sueros. Estos ataques de anafilaxia han sido producidos con bacilos de la fiebre tifoidea y de la disentería y con vibriones del cólera, así como con filtrados de cultivos de fiebre tifoidea, cólera, fiebre del heno, tuberculosis, carbunco y levaduras.

La reacción anafiláctica es el auxiliar más sensible para la diferenciación y comprobación de albúminas diversas animales o vegetales, y considerablemente superior, en este sentido, a la reacción de precipitinas.

Apéndice : Vacunación y Bacterioterapia

La posibilidad de la **vacunación** contra las enfermedades infecciosas se funda en el conocimiento de que los mismos fenómenos biológicos que constituyen la esencia de la inmunidad, después de sufrir una infección, pueden también provocarse, sin sufrir la enfermedad, mediante la inoculación de la propia materia o de productos metabólicos del agente morboso. La vacunación puede hacerse:

1. *Con gérmenes virulentos vivos :* Esto es posible, naturalmente, sólo cuando el germen causa la enfermedad típica al entrar en el organismo por una puerta determinada, mientras que su inoculación por otra vía no trae perturbaciones notables en la salud. Esta condición, que rara vez se cumple, aparece, por ejemplo, en el vibrión del cólera, de acción patógena sólo por vía intestinal, pero no por vía sanguínea en el hombre, y por esta circunstancia pudo Ferrán realizar las primeras vacunaciones contra el cólera sin daño para las personas vacunadas aplicándoles inyecciones subcutáneas de cultivos vivos. A este orden de vacunas pertenece también la variolización aplicada antiguamente. El virus de la viruela inoculado en la piel no es capaz

de producir una infección general tan grave como por la vía natural de infección, constituída por la parte superior del aparato respiratorio, porque el proceso local desarrollado con la inoculación en la piel inicia a tiempo una inmunización parcial del organismo, suficiente para imposibilitar o hacer más leve la infección general. Es muy difícil, sin embargo, aceptar la responsabilidad del empleo de gérmenes virulentos vivos, y nunca será este método el más apropiado para practicarlo en gran extensión, porque el manejo de material infeccioso vivo lleva siempre consigo el peligro de la extensión de la epidemia.

2. *Con gérmenes vivos atenuados:* La atenuación puede realizarse por medios fisicoquímicos, como sucede en la vacunación contra el carbunco practicada con gérmenes vivos sometidos previamente al calor (Pasteur), y en los ensayos de vacuna contra la peste realizados por Strong con bacilos atenuados por la acción del alcohol. Mucho más importante, por ser completamente seguro e inofensivo, es el empleo de razas biológicas debilitadas en forma permanente, como las que se obtienen por el paso en animales. A esta clase pertenece, en primer término, la vacunación con linfa de ternera, pues las pústulas de este animal vienen a ser una variedad degenerada del verdadero virus variólico inyectado previamente. Completamente análoga es la vacunación antirrábica practicada con el virus fijo, obtenido por Pasteur, mediante el paso por conejos, del virus de la calle, infeccioso en alto grado.

3. *Con gérmenes muertos*, con los cuales, prescindiendo de las reacciones inespecíficas locales y generales, tales como inflamación, fiebre, cefalalgia, se excluye desde luego la posibilidad de una enfermedad aun en la forma más benigna y, además, ofrece la ventaja de administrar la substancia corporal del germen en cantidades perfectamente dosificadas. A esta clase pertenecen las vacunas contra el cólera y la fiebre tifoidea, preparadas con cultivos muertos de estos bacilos y aplicadas en grande escala en los ejércitos en la pasada guerra mundial. Sin embargo, este método no es aplicable en todos los casos, por ejemplo, contra la disentería, pues el verdadero bacilo de esta enfermedad (Kruse-Shiga) produce un veneno muy activo en los cultivos, que podría acarrear graves trastornos nerviosos en el hombre, aun inyectándole los gérmenes muertos.

4. Mientras que en los procedimientos expuestos se trata en todos de una inmunidad puramente activa (*V.* pág. 78), para cuya adquisición son inevitables las reacciones del organismo con trastornos morbosos más o menos intensos, se ha intentado proporcionar una inmunidad activa permanente, mediante un *método combinado*, por la *inyección simultánea del virus* y de las substancias protectoras *del suero* de un animal inmunizado previamente, consiguiendo así evitar o disminuir los fenómenos de reacción por la acción del suero curativo administrado. Representa un gran éxito en este sentido la vacunación combinada de R. Koch y Kolle contra la peste del ganado vacuno, llevada a cabo con sangre virulenta y suero curativo.

En la patología humana quizá esté llamado a generalizarse el método de Behring, el cual se propone conseguir la inmunización permanente contra la difteria por la inyección simultánea de toxina de esta enfermedad y suero curativo de la misma. Finalmente, se ha intentado también evitar la reacción producida por la vacuna de cultivos muertos, tratando previamente la materia inyectada con antisuero específico para privarla de su poder irritante. La cuestión de estas vacunas sensibilizadas (Besredka) se encuentra aún en período de ensayo.

Por cualquier procedimiento que se aplique la vacuna, su protección no aparece hasta pasado un cierto plazo (una o dos semanas), porque siempre se trata de una inmunización activa que ha de elaborarse el organismo. La seroterapia, en cambio, protege inmediatamente porque proporciona substancias protectoras completamente dispuestas a obrar. Inmediatamente después de la inyección de virus vivos o muertos aparece disminuído el contenido de anticuerpos en la sangre. Según todas las experiencias, esta «fase negativa» no tiene importancia práctica, puesto que, mientras dura, no aumenta la receptividad de manera perceptible, y no representa, por consiguiente, una contraindicación de la vacuna. La cantidad de substancias protectoras contenidas en el suero no está precisamente en razón directa del grado de inmunidad, porque ésta sólo depende parcialmente de la existencia de anticuerpos en la sangre, debiéndose principalmente a la inmunidad de los tejidos, debida a su vez a una disposición específica del metabolismo celular (*V.* pág. 79). La disminución pasajera de anticuerpos en el suero sanguíneo se explica, de acuerdo con la teoría de las cadenas laterales de Ehrlich, porque estas substancias son fijadas por el antígeno inyectado. Después de algunos días, cuando los tejidos han aumentado la producción de substancias protectoras, cesa la fase negativa para dar lugar a otra positiva, caracterizada por el aumento de defensas debido a la vacuna. En esto se funda el resultado favorable de la repetición de la vacuna, confirmado experimentalmente, razón por la que, contra el cólera, se practican dos inyecciones y contra la fiebre tifoidea tres, con dosis ascendentes e intervalos de unos ocho días.

Respecto al valor de la vacuna sólo puede ser decisiva, en último término, la estadística epidemiológica, como ocurre ya, de manera indudable, respecto de las vacunas contra la viruela y la rabia, es decir, después de la observación de sus resultados durante muchos años; también se conocen numerosos experimentos favorables del resultado de vacunas preparadas con cultivos muertos, que abonan su empleo contra la peste, el cólera y la fiebre tifoidea, pero esta cuestión no ha sido todavía completamente dilucidada La dificultad de trasladar la experiencia del laboratorio a las circunstancias de la realidad consiste principalmente en que la infección natural deja, evidentemente, no sólo la inmunidad general de todo el organismo, sino también una defensa local en la puerta de entrada, mientras que esta defensa no aparece después de la inoculación artificial.

En la preparación técnica de vacunas de cultivos muertos han de tenerse en cuenta los puntos siguientes, particularmente si se preparan en grandes cantidades :

a) Examen de la pureza de los cultivos empleados, acción antígena y ausencia de efectos irritantes especiales : a este fin, es necesario emplear únicamente ciertos cultivos cuidadosamente examinados por Institutos de gran crédito, respecto de su acción antígena y, hasta donde sea posible, de su carencia de efectos secundarios desagradables. Para que su aplicación sea lo más general posible ha de procurarse, además, la preparación de una vacuna polivalente compuesta de varias razas, como se hace ya con la vacuna de fiebre tifoidea. Para obtener cultivos en gran cantidad se hacen siembras en grandes superficies, sobre agar, en placas Drigalski y mejor aún en frascos de Kolle, porque éstos hacen más difícil la contaminación. Los cultivos en caldo en gran escala empleados antiguamente por Haffkine, sólo se aplican en la obtención de vacunas solubles, que han de filtrarse para librarlas de gérmenes (toxina de la difteria y tuberculina), pero no se utilizan para obtener substancias corporales bacterianas, porque en cultivos recientes la cosecha es escasa, y en cultivos antiguos aparecen productos derivados de acción no específica e inesperada, y además es mucho más difícil descubrir y aislar los gérmenes extraños, particularmente los anaerobios. En los cultivos superficiales sobre agar la pureza del cultivo se comprueba fácilmente por una preparación microscópica, y, si es preciso, por siembra en placas.

b) Los cultivos han de matarse por medio del calor, con gran cuidado, porque las altas temperaturas determinan la producción de substancias resultantes de la destrucción de las bacterias con efecto excitante no específico y molesto. La experiencia enseña que una hora en el baño maría a 53° es suficiente para matar los vibriones del cólera y los bacilos de la fiebre tifoidea, aun en emulsiones muy concentradas. La emulsión de cada cultivo se vierte por separado en un tubo y se expone a dicha temperatura en un baño con termo-regulador. Ha de tenerse especial cuidado en destruir a la llama las gotas que hayan podido quedar en la parte superior del tubo no cubierta por el agua ; el nivel de ésta en el baño debe exceder en 2 cm. del de la emulsión en el tubo.

c) La esterilidad se comprueba, a continuación, por siembra en agar de una gota de cada tubo. Los tubos se numeran previamente, para desechar luego el contenido de los que no resulten estériles.

d) Después de probar la esterilidad, se diluye la emulsión de los cultivos en solución fisiológica al 0'85 % con 0'5 % de fenol o tricresol, para que se conserve mejor. La dilución se prepara de tal manera, que cada centímetro cúbico de vacuna contenga la dosis de cultivo determinada como más conveniente por la experiencia, que suele ser $^1/_2$ de asa normal de cultivo por cada centímetro cúbico de dilución. Esta dosis se fija primero, aproximadamente, por el volumen del cultivo, calculando que un cultivo en tubo de agar inclinado corresponde a diez asas normales aproximadamente. La dosificación exacta se hace después de diversas maneras: la más corriente es comparar la transparencia de la vacuna con la de otra que sirve de modelo. Este procedimiento es práctico cuando ambas vacunas son recientes, pero las emulsiones de cultivos guardadas largo tiempo se van clarificando poco a poco por autolisis. Más exacta es la dosificación contando los gérmenes al microscopio en el cuentaglóbulos de Thoma-Zeiss o en otro semejante, el de Liebreich por ejemplo. No es aplicable en este caso el procedimiento de contar más usual en bacteriología, que consiste en la siembra en medios apropiados, porque el número de colonias nacidas corresponden naturalmente al de gérmenes vivos, y para la acción antígena entran también en consideración los microbios muertos, muy numerosos hasta en cultivos recientes. Un método aproximado para contar directamente al microscopio, debido a Wright, consiste en mezclar cuidadosamente la emulsión de bacterias que se va a contar con una cantidad igual de sangre : de la mezcla se hace una preparación y se determina la proporción de bacterias y de glóbulos rojos en un gran número de campos ; del número conocido de glóbulos rojos por centímetro cúbico, calculado aproximadamente en cinco millones para la sangre del hombre, se deduce la cifra aproximada de gérmenes contenidos en la emulsión, aunque puede ocurrir, desde luego, que no se tengan en cuenta los gérmenes cubiertos por glóbulos.

De la vacunación a la **bacterioterapia**, o sea el empleo de substancias corporales de agentes morbosos en el tratamiento de las infecciones, no hay más que un paso, como se deduce con sólo pensar que

los fenómenos, que constituyen la esencia de la inmunidad después de pasada la infección, son los mismos que durante la enfermedad encaminan el proceso patológico a la curación natural. Si esta tendencia natural a la curación queda casi siempre incompleta en algunos padecimientos crónicos, como la tuberculosis y la lepra, esto se basa precisamente en que también los procesos de inmunización son incompletos en estas enfermedades, y parece racional favorecer la tendencia curativa del organismo apresurando el proceso de la inmunidad por la aportación de substancias antígenas del germen, excluyendo en lo posible las puramente tóxicas. Este fué el punto de partida de R. Koch, cuando estudió el efecto de los productos solubles del bacilo de la tuberculosis en el organismo infectado de esta enfermedad, y así resultó el empleo de la tuberculina, el primero de los tratamientos racionales por productos bacterianos aplicados a la curación específica de la infección correspondiente. Como bacterioterapia en sentido estricto, es decir, empleo de toda la substancia corporal del germen muerto en lugar de un extracto soluble, debe considerarse el tratamiento por la tuberculina, puesto que Koch pasó de la tuberculina soluble antigua a la nueva tuberculina (T. R.) contenida en los cuerpos de bacilos de la tuberculosis. Beumer y Peiper habían intentado ya la curación de la fiebre tifoidea por inoculación de pequeñas cantidades de cultivos muertos. El empleo de la bacterioterapia se generalizó hace unos diez años por Wright al estudiar las opsoninas con motivo del empleo de bacterias, especialmente de gérmenes del pus, en el tratamiento de infecciones crónicas. Wright partió del hecho de que el índice opsónico de la sangre, con relación al agente morboso específico, desciende durante la infección correspondiente, y trató de aumentar este índice por inoculación de pequeñas cantidades de gérmenes muertos. Después de un descenso pasajero en el día o los dos días siguientes a la inyección (fase negativa) asciende efectivamente el índice opsónico, y a la subida corresponde con frecuencia una mejoría local y general en las manifestaciones morbosas. La inyección no debe repetirse hasta después de pasada la fase negativa. Mientras que Wright se sirve siempre del índice opsónico para determinar esta circunstancia, puede prescindirse de procedimiento tan complicado y determinar la dosis y el momento del tratamiento bacterioterápico por el cese de la reacción provocada cada vez y por el estado genera ldel enfermo, a semejanza de lo que se hace en el tratamiento por tuberculina. En general, puede aplicarse el principio de que en las infecciones agudas está indicado el empleo circunspecto de dosis pequeñas y en las infecciones crónicas son aplicables dosis mayores.

La preparación de la substancia inyectable o antígeno se verifica esencialmente del mismo modo que hemos descrito para la vacunación. El contenido de antígeno se da en una cifra que expresa el número de bacterias contenidas en un centímetro cúbico ; 200 millones para la vacuna de estafilococos. La vacuna puede ser polivalente cuando se prepara con una mezcla de razas del germen correspon

diente, o monovalente, si está preparada con una sola, generalmente extraída del propio enfermo ; el tratamiento con estas « autovacunas » da, en algunos casos, resultados particularmente favorables.

VI. Circunstancias que determinan la muerte de los microorganismos (Desinfección)

Hemos visto en uno de los capítulos precedentes las condiciones necesarias para la vida de los microorganismos ; si estas condiciones faltan total o parcialmente, o las circunstancias se alejan mucho de las óptimas para el desarrollo, éste disminuye inmediatamente y llega a paralizarse en absoluto. La vida queda entonces en estado latente, y puede mantenerse así más o menos tiempo para reaparecer, si se restablecen las circunstancias favorables, o cesar, sin haber salido del estado latente, si las condiciones desfavorables perduran.

Además de esta desviación de las condiciones biológicas normales, existen otros factores directamente perjudiciales a los gérmenes, que desarrollan su acción nociva contra los microorganismos, aunque subsistan en otros órdenes las condiciones favorables del cultivo.

El conocimiento de las condiciones que determinan la muerte de los agentes morbosos es de gran importancia teórica y especialmente práctica para la lucha contra las infecciones. Según su intensidad, la acción nociva actúa sobre los gérmenes de dos maneras : en la primera, se obra solamente determinando una disminución de su capacidad de desarrollarse, pero los gérmenes se sostienen con vida largo tiempo, y al trasladarlos a condiciones más favorables son todavía capaces de desarrollarse con intensidad : en la segunda, la destrucción de los gérmenes es completa y, aunque se les ponga luego en las condiciones favorables, no vuelven a dar señales de vida. Especialmente para las substancias químicas se establece la diferencia entre los antisépticos, que detienen el desarrollo de los gérmenes, y los desinfectantes cuyo efecto debe serles mortal. Respecto a las bacterias que forman esporos hay que distinguir las soluciones bactericidas y las esporicidas; éstas son mucho más concentradas por ser mayor la resistencia de los esporos. En las distintas formas bacterianas no esporuladas varía mucho la capacidad de resistencia, según las distintas especies ; así, por ejemplo, los bacilos de la tuberculosis y los gérmenes afines ácido-resistentes protegidos por su cubierta están dotados de mayor resistencia que otros bacilos, y entre los cocos se distingue también por esta propiedad el estafilococo piógeno dorado. Los protozoarios son casi siempre menos resistentes que las bacterias, y también, como todas las células animales, perecen bajo la acción de venenos específicos (cianuros, saponina) que apenas producen efecto en las bacterias. Tanto entre las bacterias como entre los protozoarios hay algunas especies a las que perjudican ciertos desinfectantes, aun a concentraciones muy débiles, ante las cuales

permanecen indemnes las demás. Esta acción electiva se encuentra únicamente en substancias de composición química muy complicada. Por ejemplo, el verde malaquita tiene acción electiva contra el vibrión del cólera; el naftol-β tribromado contra los cocos del pus, contra los bacilos de la difteria y hasta contra los esporos del carbunco, los cuales siendo muy resistentes frente a otros medios, mueren a las dos horas de someterlos a una disolución al 1 % de dicho desinfectante, el cual es ineficaz, en cambio, contra los bacilos de la tuberculosis y el bacilo piociánico. Según sea la forma de esta acción electiva, se habla de « acción desinfectante semiespecífica » (Bechhold) o « específica » ; la modalidad más intensa de esta última se muestra en los medios empleados en la quimioterapia (véase el final de este capítulo) y en las bactericidinas que se forman al inmunizar los organismos animales (véase el capítulo Inmunidad).

El método de examinar la acción que un factor físico o una substancia química oponen al desarrollo de un germen es relativamente sencillo. Sobre el germen empleado para el examen, que se obtendrá cultivando en medios adecuados, se hacen actuar dosis de eficacia decreciente, por ejemplo, concentraciones cada vez menores de una substancia química o diversos grados de temperatura, y se observa la dosis o el grado en que el crecimiento se paraliza por completo. Al hacer el experimento se nota, en términos generales, que la resistencia de los microorganismos ante las substancias o factores empleados es tanto mayor cuanto más favorables sean las demás condiciones de vida; así, por ejemplo, para detener el crecimiento de un germen cultivado en suero sanguíneo ha de usarse el sublimado en concentraciones mucho más elevadas que contra el mismo germen cultivado en caldo ; de igual manera, es mucho más difícil paralizar por completo el desarrollo en la estufa que a la temperatura de la habitación.

Para comprobar experimentalmente el efecto mortal sobre los gérmenes debe disponerse el experimento del modo siguiente: Primeramente, los gérmenes han de exponerse durante un cierto tiempo a la acción nociva del agente correspondiente, y más tarde se les traslada al medio que más les convenga, procurando rodearlos de las condiciones más favorables a su desarrollo con el fin de comprobar si son aún capaces de vida o están muertos ; en algunos casos conviene hacer la inoculación en animales para probar su virulencia y vitalidad. Al ensayar los desinfectantes químicos, la mayor dificultad consiste en la eliminación completa del desinfectante al dar por terminada su acción, pues claro está que los residuos del veneno que aun quedan con el cultivo, al hacer la siembra de comprobación, seguirán ejerciendo su efecto sobre los gérmenes ya actuados, pudiéndonos inducir al error de creer que ya están muertos, cuando aun viven, aunque no llegan a desarrollarse en el nuevo medio por continuar aquella acción perjudicial de los residuos del desinfectante. Se ha intentado eliminar este motivo de error de diversas maneras. En el procedimiento más antiguo, debido a R. Koch, se empleaban como testigo gérmenes desecados sobre

una hebra de seda (esporos de carbunco), y terminado el tiempo de la desinfección no se hacía más que lavar la hebra con todo cuidado. Experiencias comparativas de GEPPERT, empleando substancias químicas neutralizantes del veneno, como sulfuro de amonio para el sublimado, ácidos débiles para los álcalis o viceversa y agua bromada para el fenol, demostraron que, a pesar de los lavados, quedaban substancias tóxicas en los testigos y que, después de neutralizar el veneno, los gérmenes que parecían muertos eran en parte capaces de vida. Otros investigadores emplearon para la desecación de los gérmenes, en lugar de hebras de seda, perlas de vidrio (PAUL y KRÖNIG), cuya superficie lisa facilita el lavado de los desinfectantes; también se sometieron los gérmenes a la acción del desinfectante en soluciones acuosas, y terminado el tiempo de acción del desinfectante se procuraba separarlos de él, vertiendo la solución y renovando el agua. Este método es, naturalmente, el único aplicable a gérmenes que no resisten la desecación. Tiene desde luego el inconveniente de que es muy difícil preparar en gran cantidad emulsiones en que la distribución de las bacterias sea uniforme con objeto de realizar investigaciones comparadas y seriadas, y que esas emulsiones se alteran pronto. En los ensayos para desinfecciones de aplicación práctica, lo que importa es imitar fielmente las condiciones que haya de tener luego la desinfección al practicarla en la realidad; así, en los ensayos de desinfección de ropas se matan los gérmenes existentes en las prendas, sin preocuparse de que los residuos del desinfectante puedan continuar ejerciendo su efecto, porque esto también ocurrirá en la práctica, y por igual motivo, las esterilizaciones de agua o de leche deben practicarse siempre en las circunstancias correspondientes a la realidad. Una condición que no puede olvidarse, es, como se comprende, comprobar primero la utilidad del material testigo, probándolo con un desinfectante de efecto conocido (hebras con esporos de carbunco sometidas al vapor circulante); esto es tanto más necesario cuanto que distintas razas de la misma especie, y aun individuos aislados de un mismo cultivo, ofrecen resistencia diferente. El resultado de los ensayos de desinfección depende no sólo de la reacción entre el desinfectante y el microorganismo, sino también de otra serie de condiciones. A éstas pertenece, en primer término, la influencia de la temperatura, que se manifiesta inversamente que respecto a la paralización del desarrollo de gérmenes, porque la muerte de éstos en la estufa, a semejanza de otros procesos químicos, es más general y rápida. De gran importancia es también la influencia del disolvente, pues hay desinfectantes químicos que son ineficaces, si se emplean disueltos en alcohol o en aceite. Determinadas substancias añadidas al desinfectante — jabón al cresol — aumentan el poder de desinfección, y varios desinfectantes aplicados al mismo tiempo pueden sumar o restar sus efectos (BURGI).

Los fenómenos biológicos relacionados con los daños sufridos por los microorganismos por la acción de agentes físicos y químicos pueden ser de naturaleza muy distinta. Algunos consisten en alteraciones radicales tales como la desecación, cremación, coagulación, hinchazón y disolución del protoplasma vivo; otros, en cambio, representan acciones tóxicas específicas. A ello contribuye en diversas substancias, por una parte, el grado de desdoblamiento en iones activos, y, por otra, la solubilidad lipoide de las mismas substancias; no es nuestro objeto examinar de cerca las leyes de estos complicados fenómenos físicoquímicos. Algunas substancias, como el cobre, manifiestan su acción tóxica en diluciones extraordinariamente tenues hasta de 1 : 1 000 000; estas acciones tóxicas se denominan *oligodinámicas*.

Entre los *factores físicos*, la presión y el frío, aun a las temperaturas más bajas, como la del aire líquido, apenas ejercen efecto en la mayor parte de los microorganismos; sólo algunos agentes morbosos estrictamente adaptados a la vida parasitaria, como los bacilos de la gripe, mueren rápidamente a temperaturas inferiores a las de la estufa. Tampoco las corrientes o descargas eléctricas les perjudican de una manera directa, sino indirectamente por los procesos electrolíticos, por desarrollo de ozono, por elevación de temperatura, etc. En cambio, las distintas formas de la radioactividad perjudican considerablemente a los microorganismos; los rayos X, las irradiaciones del radio, y especialmente la luz por su riqueza en rayos ultravioleta, ejercen una acción nociva sobre los gérmenes. Se puede hacer visible el efecto mortífero de la luz, de una manera atractiva, con cultivos en medios transparentes, expuestos en parte a la luz y en parte protegidos por pantallas opacas; las partes protegidas crecen, mientras que las otras no se desarrollan; se pueden obtener de este modo sobre las placas de cultivo, letras y figuras, como sobre una placa fotográfica. El efecto de la luz es, en parte, directo y, en parte, indirecto, como se deduce del hecho de que, sembrando en medios expuestos previamente a la luz, el desarrollo es deficiente o falta en absoluto; probablemente, la acción de la luz da origen a la formación de substancias perjudiciales para los gérmenes, como H_2O_2 y otras.

Entre los *agentes físicos*, el de efectos más perjudiciales a los gérmenes es el calor. En general, las bacterias no esporuladas mueren a los diez minutos de estar sometidas a una temperatura de 50° a 60°: algunos cocos purulentos, los bacilos de la tuberculosis y los de la fiebre tifoidea son algo más resistentes. La resistencia es mucho mayor en las formas de resistencia o esporos. Existe una gran diferencia entre la eficacia del aire seco caliente y la del vapor de agua, al cual corresponden efectos mucho más intensos para el mismo grado de temperatura. Los esporos de carbunco, por ejemplo, mueren a los quince minutos de hallarse en una atmósfera saturada de vapor de agua a 100°, y, en cambio, tardan en morir hasta tres horas bajo la acción del aire caliente seco a la temperatura de 140°. Si, por exceso de temperatura o por presencia de aire, se acercan las condiciones del vapor de agua a las del aire seco, disminuye su poder desinfectante, aun cuando la temperatura exceda considerablemente de los 100°. Por el contrario, el vapor concentrado y sometido a alta presión tiene aún mayor poder

desinfectante que el vapor de agua a la temperatura ordinaria de 100° y a una atmósfera de presión ; los esporos más resistentes, como ciertas bacterias de la patata y del suelo, que conservan la vida horas enteras sometidas al vapor de agua sin presión, mueren, lo más tarde, a los quince minutos en vapor comprimido y a 120° de temperatura.

Para la práctica de la desinfección en gran escala, también es de importancia el conocimiento debido a R. KOCH respecto a la diferencia entre el poder desinfectante del aire caliente y del aire saturado de vapor de agua. En los aparatos de desinfección se emplea siempre, en lugar de aire caliente, vapor de agua, a ser posible a una presión reducida de 0'2 de atmósfera, y se evita, por la construcción y manejo de los aparatos, todo exceso de temperatura y la mezcla de aire con el vapor. En algunos casos de desinfección pueden emplearse vapores que, con presión negativa, hierven a menos de 100° ; aunque su eficacia es menor, pueden ser preferibles en ocasiones, precisamente por su acción más moderada ; en los aparatos debidos a RUBNER, la menor eficacia desinfectante del vapor con punto de ebullición más bajo se compensa añadiendo vapores de formalina al vapor de agua.

Los experimentos de desinfección bacteriológica son también de gran importancia para el examen y comprobación de los aparatos de desinfección. Esta prueba se realiza de la manera más segura, envolviendo, junto con las prendas que han de desinfectarse, hebras con esporos de carbunco introducidas en tubos de ensayo ocluídos con algodón y con las que, después de sometidas a la acción del vapor, se hacen siembras para comprobar el resultado.

La gran diferencia entre los efectos del vapor y del calor seco se explica, en parte, por fenómenos biológicos, porque el protoplasma de las bacterias, y en particular el de los esporos, se coagula más fácilmente por efecto del calor húmedo, y en parte físicamente, por la mayor fuerza de penetración del vapor ; si se elimina esta circunstancia desfavorable moviendo artificialmente el aire caliente, como ocurre en el aparato de VONDRAN, podrá emplearse con ventaja en bastantes casos de desinfección.

Entre los agentes físicos merece mencionarse, finalmente, la desecación, que es un medio bactericida muy eficaz, utilizado también por la naturaleza. Muchos agentes morbosos, tales como los bacilos de la peste, de la gripe, del cólera y los meningococos mueren rápidamente por desecación, por lo cual las infecciones correspondientes no pueden ser difundidas por el polvo (*V.* Capítulo VII); en cambio, algunas bacterias, tales como los gérmenes del pus, el bacilo de la fiebre tifoidea y el de la tuberculosis son muy resistentes a la desecación, y lo son mucho más todavía los esporos de las bacterias, de los hifomicetos y de los blastomicetos, así como las formas enquistadas de algunos protozoarios. En el examen de la resistencia a la desecación hemos de fijarnos con cuidado en que ésta se verifique en capas muy delgadas para que todos los gérmenes estén por igual expuestos a la falta de agua ; si la desecación se realiza en capas espesas y, sobre todo, si es rápida,

quedan gérmenes en el interior de las masas mucilaginosas perfectamente protegidos contra la carencia de agua, de tal modo, que gérmenes bastante sensibles, como los neumococos, pueden conservarse así largo tiempo.

Entre la multitud de desinfectantes químicos citaremos solamente aquí los más importantes desde el punto de vista práctico o biológico, cuyas particularidades se detallan en textos especiales. Las sales metálicas desempeñan un papel de singular importancia. Los metales puros, por ejemplo, las laminillas de oro o de plata colocadas sobre el medio de cultivo, impiden el desarrollo de gérmenes en su proximidad. También los metales coloidales paralizan notablemente el desarrollo de los gérmenes, pero su acción bactericida es muy débil. Las sales metálicas disueltas, en especial las de mercurio y de plata, poseen gran poder bactericida. El sublimado en disoluciones al 1 : 10 000 paraliza por completo el desarrollo de gérmenes en el suero sanguíneo, y en las soluciones usadas ordinariamente al 1 : 1000 mata casi todas las formas no esporuladas en pocos minutos ; en cambio, tarda horas enteras en matar los bacilos de la tuberculosis y los esporos del carbunco. En la mayor parte de las pastillas usadas se añade sal común al sublimado, para facilitar su disolución y para evitar la producción de precipitados de albuminato de mercurio en las soluciones albuminoideas. Los substitutivos del sublimado, tales como el oxicianuro de mercurio y la sublamina, son inferiores a él como desinfectantes, pero, en cambio, no determinan los desagradables efectos secundarios del sublimado, derivados de su acción cáustica sobre la piel y de su efecto corrosivo sobre los objetos de metal. Entre las demás sales metálicas, la de mayor importancia como desinfectante es el nitrato de plata (piedra infernal) ; también en éste se ha intentado remediar la acción cáustica de la sal metálica pura, con éxito, mediante el empleo de complejas combinaciones orgánicas de plata tales como la argentamina, la argonina, el protargol, el ictargán y otros. Las sales de cobre empleadas antiguamente se usan mucho menos en la actualidad por su menor eficacia desinfectante.

Entre las sales neutras, la sal común paraliza el desarrollo de gérmenes, pero solamente en salmueras muy concentradas con más de un 25 % de sal. Este conocimiento tiene importancia práctica, porque, si se emplean soluciones débiles de sal para curar las carnes, éstas pueden alterarse con facilidad y, lo que es más temible, pueden originarse envenenamientos por el *bacillus botulinus* (*V.* el capítulo especial correspondiente)

Los ácidos pueden emplearse como desinfectantes en soluciones concentradas e impuras para matar esporos y desinfectar materiales sin valor, como pisos sucios y estiércol. Con igual objeto se usa la cal viva en forma de lechada de cal al 20 %, recientemente preparada. Las disoluciones de jabón y de sosa, sobre todo calientes, son un buen desinfectante, usado especialmente para la desinfección de las manos y de los instrumentos quirúrgicos. El jabón ordinario es un desinfectante

barato, eficaz y apropiado para ser empleado en grande escala ; en soluciones al 10 % y a 80° de temperatura mata los esporos de carbunco a la media hora. Entre los medios oxidantes, los permanganatos, los persulfatos, el cloro, el yodo, el bromo, el ozono y el agua oxigenada, son también desinfectantes muy activos. Más adelante volveremos a tratar del empleo de estos cuerpos en estado gaseoso por las circunstancias especiales que son comunes a todos los gases desinfectantes. Los halógenos en soluciones acuosas, aunque la dilución sea muy tenue, desarrollan propiedades desinfectantes muy intensas ; los esporos del carbunco mueren en pocos minutos en soluciones al 0'03 % de agua de cloro, lo mismo que en solución de LUGOL al 0'05 %. En la práctica de la desinfección la forma más adecuada de aplicar el cloro es en una disolución combinada de 1 % de permanganato potásico y 1 % de ácido clorhídrico, que supera en poder desinfectante a una solución de sublimado al 5 %; para destruir la vitalidad de las formas bacterianas no esporuladas bastan soluciones de cloruro de calcio al 0'1 ó 0'2 %. Citaremos también en este lugar la «antiformina» (una mezcla de lejía de sosa e hipoclorito sódico), que disuelve sin dejar residuos todas las células animales y los microorganismos, con excepción de los bacilos de la tuberculosis y los esporos protegidos por cubiertas de gran resistencia ; la antiformina, merced a esta propiedad, se emplea ventajosamente en la técnica de investigación bacteriológica (UHLENHUTH) (*V.* en la parte especial BACILO DE LA TUBERCULOSIS).

Entre las combinaciones orgánicas citaremos los siguientes desinfectantes: el alcohol etílico ordinario ofrece la particularidad de que su mayor eficacia como desinfectante la tiene en concentraciones al 50%, mientras que el alcohol absoluto no produce efecto ninguno al menos obre gérmenes secos; la causa de esto radica en las mismas circunstancias físicoquímicas, que determinan también la ineficacia de otros desinfectantes disueltos en alcohol puro y la de las materias colorantes en soluciones alcohólicas saturadas. El alcohol a la temperatura ordinaria carece de acción sobre los esporos, pero en estado de ebullición, el alcohol posee un poder esporicida considerable, empleado también en este caso en soluciones no concentradas y nunca en estado absoluto.

El alcohol se usa para desinfectar las manos en forma de jabón líquido oficinal, que destruye los gérmenes en pocos minutos. El cloroformo se emplea en la práctica de laboratorio, porque mata moderadamente sin descomposiciones químicas exageradas, por lo cual está indicado cuando se desea matar los gérmenes y recoger sus toxinas, así como para la conservación de líquidos de cultivo que contienen albúmina (suero sanguíneo). El yodoformo, muy usado en cirugía, tiene muy escasas propiedades desinfectantes, pero su acción paralizante es considerable ; su benéfica influencia en el tratamiento de las heridas se basa en el desprendimiento de yodo libre. El formaldehido (conocido con el nombre de «formalina» en soluciones acuosas al 40 %) tiene un poder de paralización muy marcado ya en soluciones de 1 : 5000 a de 1 : 20000,

según las especies de bacterias. Se ha recomendado por eso para la conservación de substancias alimenticias, pero a su aplicación hay que oponer reparos higiénicos, pues la acción tóxica de la formalina no es despreciable, y aun en pequeñas cantidades puede ser peligrosa si su uso es continuado. Frente a esta propiedad paralizante en alto grado, su eficacia en la desinfección es muy reducida, por lo cual la formalina se usa muy poco en la práctica ; mucho mayor es la importancia del formaldehido gaseoso para la desinfección de habitaciones (véase más adelante).

Los desinfectantes más preconizados entre las combinaciones orgánicas son los derivados del fenol (ácido fénico). El fenol mismo, en soluciones del 3 al 5 %, se usa con buen resultado contra las formas no esporuladas, y es tanto más útil, prácticamente, cuanto que su acción desinfectante no está dificultada, como ocurre con las sales metálicas, por la presencia de sales o de cuerpos albuminoideos; su efecto, sin embargo, no llega a ser esporicida ni aun en soluciones muy concentradas. Por su precio relativamente elevado y por su efecto cáustico en soluciones concentradas, más que el fenol mismo, se emplean sus derivados por metalización, los cresoles. La utilización de estos cresoles, contenidos en gran cantidad en el «ácido fénico impuro», se obtiene mediante el empleo de las soluciones alcalinas en la desinfección quirúrgica (solución de jabón de cresol, de lisol, de creolina) o por medio de ácidos o de mezclas con petróleo, cuando se trata de desinfecciones en gran escala, como cuadras o retretes. La mezcla con petróleo «saprol» es muy apropiada para la desinfección de letrinas, porque, como es más ligera que el agua, flota en la superficie del contenido de las alcantarillas y permite así un cierre inodoro, mientras que el desprendimiento lento del cresol desinfecta la letrina. Muy recientemente se han descubierto desinfectantes de gran valor entre los derivados del cresol, o sea los substitutivos halógenos expendidos con los nombres de fobrol, grotán y sagrotán (LAUBENHEIMER y otros), de acción desinfectante especial sobre los esputos tuberculosos. Igualmente, BECHHOLD ha descubierto, entre los substitutivos halógenos del naftol, desinfectantes muy activos (providoformo), por su eficacia electiva semiespecífica contra determinadas bacterias, de los cuales hemos hablado anteriormente.

Los *desinfectantes gaseosos* merecen una descripción aparte de los anteriores, pero que los comprenda en conjunto, porque, sea cual fuere su naturaleza química, presentan particularidades y dificultades en su empleo comunes a todos, debidas a su estado gaseoso. Estas dificultades consisten, principalmente, en la desigual repartición del gas en el local desinfectado, a causa del distinto peso específico del aire y del gas, lo cual es causa de que el desinfectante no penetre lo suficiente por todas partes. Cuando baste una desinfección en la superficie, como la de las habitaciones, si se emplea el formaldehido, se ha de procurar la mezcla íntima de gases en los locales desinfectados y la penetración posible de la mezcla, desarrollándola en cantidad con-

siderable y agitando el aire mecánicamente, como se logra con los aparatos modernos de desinfección por medio de ácido sulfuroso (aparatos Hya y Clayton). La gran importancia práctica de la desinfección por medio del formaldehido, especialmente de las habitaciones, es debida a los trabajos de Flugge y sus discípulos ; no se trata, sin embargo, de una desinfección por el gas propiamente, sino de una condensación de formaldehido en forma de finísimas gotas sobre la superficie de los objetos desinfectados. Por esta razón, y con el fin de evitar la polimerización del formaldehido en paraformo, al vaporizar las soluciones acuosas de formalina, es indispensable saturar de vapor de agua la pieza desinfectada, para que el formaldehido unido al vapor se condense en forma líquida de gotas muy finas y uniformemente repartidas sobre todos los objetos desinfectados ; por eso, sin menoscabo del resultado práctico, se puede substituir la gasificación de la formalina por su pulverización en soluciones acuosas simplemente o glicerinadas.

Para terminar diremos algo acerca de la desinfección de las manos, relacionado, principalmente, con los métodos de investigación.

Si hasta hoy no ha sido posible descubrir un método seguro que garantice en todo caso la supresión de los gérmenes de la mano, ello consiste en que, si las bacterias llegan a penetrar en las capas profundas de la piel, es muy difícil luego alcanzarlas con los desinfectantes, porque las capas córneas e impregnadas de grasa de la epidermis oponen gran resistencia a la penetración del desinfectante. Para probar la eficacia de un desinfectante de las manos no basta, por consiguiente, como antiguamente se creía, con imprimir la huella de un dedo sobre un medio estéril y considerar la ausencia de gérmenes en esa huella como prueba de la desinfección de la piel ; es necesario comprobar por un masaje intenso de la mano, si también las capas profundas de la piel han quedado libres de gérmenes; hemos de fijarnos, sobre todo, en la ranura y en el ángulo de las uñas, puntos en que las bacterias se sostienen con mayor facilidad. Paul y Sarwey han inventado una caja cerrada por todos sus lados, dentro de la cual pueden hacerse todas estas manipulaciones de la mano a cubierto de las bacterias del exterior. Citaremos dos ejemplos para demostrar la importancia del examen de las capas profundas de la piel y poder así formar juicio sobre los procedimientos de desinfección de la mano. Si introducimos la mano desinfectada en la caja de aire caliente o protegiéndola con un guante de goma esterilizado provocamos la sudación, el número de gérmenes que antes podía demostrarse en la superficie aumenta con el de los que se encontraban en las capas profundas de la piel y son acarreados por el sudor. Por otra parte, puede producirse un resultado ficticio de desinfección de la piel mediante un desinfectante que endurezca y contraiga su superficie, con lo cual los gérmenes se fijan en las capas profundas; esta es, por lo menos en parte, la causa del efecto perfecto en apariencia de algunos métodos de desinfección con alcohol, que no carecen, sin embargo, de acción desinfectante.

Apéndice al cap. VI : **Quimioterapia**

Ya hemos dicho anteriormente que algunos desinfectantes muestran una acción electiva frente a determinadas especies de microorganismos. La idea de utilizar la acción específica de estos desinfectantes para matar los gérmenes en el organismo enfermo y determinar la curación de la enfermedad provocada por ellos, era tanto más natural, cuanto que medicamentos específicos empíricamente conocidos se empleaban con éxito satisfactorio desde mucho tiempo en diversas enfermedades, tal como ocurría con el mercurio en la sífilis, el ácido salicílico en el reumatismo articular agudo y la quinina en el paludismo. La muerte del hematozoario por efecto de la quinina se puede comprobar directamente al microscopio. La cuestión universalmente planteada consistía en descubrir desinfectantes de gran poder específico contra determinados agentes morbosos, y con el menor perjuicio posible para las células del organismo humano, o, como Behring se expresa, con una toxicidad relativa lo más reducida posible. El problema ha alcanzado desde entonces una doble solución ; primero, por la seroterapia, que emplea los anticuerpo específicos formados por el organismo vivo contra los microparásitos y sus toxinas, y segundo, por la quimioterapia, que intenta conseguir el mismo fin curativo, administrando substancias químicas específicamente eficaces.

En los dos últimos decenios se ha conseguido, principalmente por los trabajos de Uhlenhuth y de Paul Ehrlich, que abrieron camino en este sentido, proveer a la terapéutica de cuerpos químicos eficaces para combatir las enfermedades producidas por protozoarios y espiroquetos patógenos (sífilis, tripanosomiasis).

Según Ehrlich, para los fines terapéuticos únicamente son aplicables aquellos productos químicos que tienen mayor afinidad con el organismo de los parásitos que con el del huésped. Estas substancias se llaman *parasitotropas*, a diferencia de las *organotropas*, que demuestran mayor afinidad para las células de órganos de importancia funcional que para las células protozoarias.

Los preparados químicos eficaces contra el tripanosoma se hallan en los grupos siguientes :

1. Grupo de las substancias colorantes básicas del trifenilmetano: fucsina, parafucsina, violeta de metilo y otros.
2. Grupo de las substancias colorantes del algodón: benzopurpurina, rojo tripán y azul tripán.
3. Arsenicales : ácido arsenioso, atoxil, arsenofenilglicina y dioxidiamidoarsenobenzol (« 606 » o « salvarsán »).
4. De los preparados de antimonio : el trióxido de antimonio.

Si administramos a un ratón infectado de tripanosomas una dosis elevada de un preparado eficaz, fucsina por ejemplo, todos los parásitos mueren a la primera inyección sin daño para el animal (*sterilisatio magna*). Con una dosis pequeña, el animal recae. Con varias inyecciones

de pequeñas dosis sobrevienen siempre nuevas recaídas y, más tarde, grandes cantidades de fucsina no ejercen ya efecto alguno sobre los tripanosomas, porque se han vuelto « fucsino-resistentes ». En cambio, estos gérmenes fucsino-resistentes son aún sensibles a otra substancia química eficaz, por ejemplo, el atoxil, en igual grado que otros tripanosomas no tratados por medicamento alguno. La inmunidad tóxica adquirida por los tripanosomas es, por consiguiente, específica, como la inmunidad sérica. Según Ehrlich, debemos suponer que en el protoplasma de los tripanosomas existen receptores especiales, « quimioreceptores », dotados de singular afinidad para determinados grupos de substancias químicas, en virtud de lo cual poseen la facultad de fijar éstas a las células.

La quimioterapia tiene su punto de partida en el descubrimiento de Laveran y Mesnil, es decir, que el ácido arsenioso puede despejar de parásitos la sangre de un ratón infectado de tripanosomas. En el tripanosoma produjeron aún mayor efecto los ensayos con rojo tripán, azul tripán, parafucsina, triparosán, tripasafrol, atoxil, arsacetina y arsenofenilglicina, así como los preparados de antimonio obtenidos en igual forma que los de arsénico (Uhlenhuth, Mulzer y Hugel). De estas combinaciones fueron especialmente eficaces el benzolsulfón y el derivado de uretano del paraaminofenilantimoniato de sodio.

Kolle, Hartoch y Schurmann introdujeron el trióxido de antimonio en la terapéutica de las enfermedades producidas por los tripanosomas, consiguiéndose curar radicalmente, con una o dos inyecciones de dosis relativamente reducidas de trióxido de antimonio, animales infectados de nagana y también de durina. La utilidad terapéutica del trióxido de antimonio, especialmente en inyección intravenosa, ha sido comprobada recientemente por Hoffmann.

De las innumerables preparaciones recomendadas hasta hoy, los derivados de arsénico, sobre todo, han conseguido una gran importancia práctica, y entre ellos el atoxil (ácido arsanílico), que posee una acción profiláctica y curativa en la espirilosis de las gallinas y otras espiroquetosis; la arsacetina, la arsenofenilglicina y el salvarsán (dioxidiamidoarsenobenzol) o 606 (Ehrlich y Hata). Con una sola inyección de este medicamento se ha observado la curación completa de las espirilosis de las gallinas y de los gansos, de la fiebre recurrente, de la frambesia, de la forma terciana del paludismo y de la neumonía infecciosa del caballo. Un resultado verdaderamente brillante de este medicamento se ha obtenido en el tratamiento de la sífilis. Los espiroquetos desaparecen casi siempre, a las veinticuatro o cuarenta y ocho horas, de las lesiones primarias y condilomas, en los que se podían comprobar muy numerosos antes de la inyección del medicamento. No cabe en la extensión de este resumen examinar detalladamente los resultados del salvarsán en el tratamiento de la sífilis.

También se han realizado ensayos recientemente para emplear el mercurio, conocido de muy antiguo como específico contra la sífilis, en combinaciones que carezcan de acción irritante. Schilling, van Krogh, Schrauth y Schuller encontraron estas combinaciones en los fenoles mercuriales; Rothermundt, Dale y Peschic en una combinación mercurial derivada de la pirazolona.

La quinina ejerce, como se sabe hace mucho tiempo, una acción electiva sobre el paludismo; véase el capítulo especial correspondiente. Entre otros preparados de eficacia quimioterápica contra el paludismo, merecen citarse el azul de metileno, el salvarsán y el neosalvarsán pero estos dos últimos sólo son eficaces contra las tercianas, pero no contra las otras dos formas del paludismo.

También en las infecciones bacterianas ha tenido la quimioterapia, en estos últimos años, éxitos de consideración. Merecen consignarse, en primer término, los efectos específicos de la quinina en las infecciones neumocócicas (Morgenroth y Halberstadter). La acción de la quinina es mayor en determinados derivados del alcaloide. Es singularmente eficaz la etilhidrocupreína, producto alcaloide secundario de la corteza de quina, substitutivo de la cupreína. Más tarde, se dió al preparado el nombre de optoquina. Este se puede obtener en el comercio en forma de clorhidrato y de optoquina básica (Zimmer & C.°, Frankfurt).

Es indiscutible que la quimioterapia se encuentra hoy en la fase inicial de su desarrollo, y es de esperar que alcance un porvenir aún más brillante y que, gracias a ella, se consiga ejercer tal influencia terapéutica en enfermedades conceptuadas como incurables, que pueda hablarse de su curación definitiva.

VII. Existencia de los microparásitos y su comprobación en la naturaleza inanimada

Antiguamente se buscaba la causa de las enfermedades infecciosas principalmente en el mundo exterior inanimado y, en especial, en los suelos apestados, emanaciones maléficas, etc. Actualmente, el conocimiento más perfecto de los microorganismos como agentes morbosos ha cambiado considerablemente tal opinión. Hoy sabemos que el hombre enfermo, y para las enfermedades animales transmisibles al hombre, también el animal enfermo, son por sus secreciones y excreciones el origen más importante de contagio. Este es el caso especialmente para los microparásitos obligados, que no son capaces de existir largo tiempo, ni de reproducirse fuera de un organismo huésped. Actualmente, debemos pensar en la posibilidad de que estos microparásitos obligados, y con mayor razón los parásitos facultativos, se sostengan vivos y capaces de contagio en el mundo exterior, aun cuando fuera de un organismo atacado no puedan crecer ni multiplicarse. Esta posibilidad es tanto más natural, cuanto que hemos visto que microparásitos obligados (como el bacilo de la tuberculosis) pueden acomodarse en los cultivos a condiciones de existen-

cia, que son muy diferentes de las que se encuentran en el organismo del hombre y hasta son capaces de crecer en abundancia en medios desprovistos por completo de albúmina. Por otra parte, las secreciones del organismo enfermo difunden constantemente agentes morbosos, y con ello se plantean las importantes cuestiones de si esos microorganismos son capaces de mantenerse vivos en el mundo exterior, cuánto tiempo pueden conservar la vida, qué condiciones les favorecen y en virtud de qué causas y en cuánto tiempo ocurre la muerte de los microorganismos en los diferentes medios exteriores.

En los capítulos precedentes hemos visto, de una parte, que para el crecimiento de los microorganismos es necesario la presencia de determinadas substancias nutritivas y un cierto grado de humedad y temperatura, determinadas reacciones químicas del medio nutritivo, según las especies de microbios, así como la presencia o la ausencia de oxígeno del aire. Por otra parte, hemos estudiado también que la influencia de la luz solar y de la desecación, así como la concurrencia de especies saprofíticas, son factores naturales que dificultan el desarrollo o llegan a matar los gérmenes. Ahora estudiaremos brevemente, a continuación, la influencia favorable o nociva al desarrollo de los gérmenes que ejercen los principales medios exteriores que nos rodean, en relación con la especie y naturaleza del agente morboso.

Aire. Es evidente que en el aire, por la ausencia de substancias nutritivas indispensables, queda excluída en absoluto la multiplicación de los microorganismos. También el sostenimiento de la vida en este medio, durante largo tiempo, habrá de chocar con grandes dificultades, porque la desecación y la luz pueden ejercer sin obstáculo su acción desfavorable al desarrollo. Está excluída en absoluto la infección del aire por los agentes morbosos que no soportan la desecación, tales como los gonococos, meningococos, bacilos de la peste, de la disentería, de la gripe y del cólera. Para las demás especies que durante algún tiempo conservan la vida en un medio seco, como los cocos del pus, bacilos de la tuberculosis, difteria, fiebre tifoidea y gérmenes con esporos, la cuestión de que infecten el aire depende de que estos gérmenes sean proyectados a la atmósfera como partículas de polvo secas, capaces de flotar en el aire. Esto ocurrirá muy rara vez, o quizá nunca, con los neumococos, los bacilos de la difteria y los de la tuberculosis, porque estos gérmenes son lanzados al exterior contenidos siempre en masas mucosas, y es muy difícil que de las costras mucosas desecadas llegue a formarse polvo si no se reúnen circunstancias muy particulares. Por esta razón es muy raro hallar bacilos tuberculosos en el polvo del aire, aun en las habitaciones ocupadas por los tísicos. A Flügge y sus discípulos debemos principalmente la explicación de los detalles más importantes acerca de las infecciones por el aire; de sus investigaciones se deduce que en el aire de las habitaciones, junto al enfermo, pueden existir agentes morbosos, no sólo en las partículas de polvo, sino en forma de pequeñísimas gotas expulsadas al toser y aun al hablar en tono corriente. Pero la existencia de los microparásitos en esta forma es muy limitada en tiempo y espacio; la experiencia enseña que el estar a un metro de distancia del enfermo cuando tose es una protección suficiente contra las partículas de saliva que puedan contener el bacilo tuberculoso. Asimismo, la posibilidad de infección por estas gotas es muy breve, pues se secan con rapidez y el residuo cae al suelo. En conjunto, el peligro de infección por tal medio puede considerarse como una ampliación del contagio por contacto, puesto que en espacio y tiempo está limitada a la proximidad inmediata al enfermo. Dentro de estos límites estrechos, la infección por partículas de saliva puede ser muy importante, y hasta desempeñar el papel más principal dentro de las condiciones epidemiológicas en la extensión de algunas enfermedades, tales como la tuberculosis pulmonar, la gripe, la peste pulmonar y el coriza. Debemos hacer notar que la contaminación del aire por gotitas infectadas es independiente en absoluto de la resistencia de los gérmenes a la desecación; depende mucho más de que las circunstancias de eliminación de gérmenes por el organismo enfermo sean de tal naturaleza, que la formación y expulsión de partículas líquidas que las contengan sea muy abundante, como suele ocurrir al toser, estornudar y hablar; pero, en cambio, no ocurre sino por excepción con otras excreciones, como las heces y la orina.

En todo caso, la infección del aire por partículas de polvo o líquidas, portadores de gérmenes, sólo es de temer en el interior de las viviendas; la infección al aire libre es de una rareza extraordinaria, y de ocurrir (fiebre tifoidea, viruela), apenas puede excluirse la intervención de otro medio, como los insectos, en la transmisión del contagio.

La comprobación de microorganismos en el aire se verifica de la manera más sencilla, exponiendo placas de cultivo al aire libre. El análisis cuantitativo de gérmenes se practica recogiendo una cantidad determinada de aire por medio de una bomba aspirante o por cualquier otro procedimiento, y haciéndolo pasar luego por un filtro que retiene los gérmenes; se siembra después el material recogido en el filtro en un medio apropiado, y contando el número de colonias desarrolladas, se tendrá el contenido de gérmenes en el aire. Para filtrar el aire, Petri usó primeramente arena, substituída más tarde por vidrio triturado, en un filtro construído a este propósito por Ficker, porque la arena, por ser opaca, impide después contar los gérmenes. Esta determinación carece de importancia práctica para el estudio y lucha contra las epidemias, porque los agentes infecciosos se han encontrado, en ocasiones, en el aire de las habitaciones junto al enfermo, pero no en el aire libre; los gérmenes que se hallan en éste son exclusivamente saprofíticos, y su número está en proporción con el de las partículas de polvo contenidas en él.

Suelo. En las capas superficiales del suelo abundan los microorganismos, y más, desde luego, cuando el suelo recibe ordinariamente desperdicios, residuos o estiércol. Ciertos agentes morbosos, que viven como saprofitos en el tubo digestivo de los animales domésticos, tales como los gérmenes del tétanos traumático y de la gangrena gaseosa, se

encuentran ordinariamente en el suelo ensuciado de estiércol, y debido a la formación de esporos, conservan largo tiempo la vida, aun en condiciones desfavorables del medio exterior. Otros gérmenes que no forman esporos, como los de la fiebre tifoidea y la disentería, son aportados a las capas superficiales del suelo con las evacuaciones del enfermo. El desarrollo de estos gérmenes en el suelo casi nunca tendrá lugar por la concurrencia abrumadora de las especies saprofíticas, pero es muy posible que estos agentes morbosos se mantengan allí, susceptibles de vivir durante largo tiempo : esta posibilidad especialmente es probable para el bacilo de la fiebre tifoidea, por ser bastante resistente.

A las capas más profundas del suelo sólo pueden llegar los microorganismos que se encuentran en la superficie en circunstancias ordinarias, cuando aquél presenta regulares hendiduras o grietas que abren a los microbios una vía directa de penetración. Las capas de arena o arcilla retienen con facilidad los gérmenes, de tal modo, que a los pocos metros de profundidad, aun en campos de labor muy abonados y en comarcas muy pobladas, el suelo no contiene germen alguno. Esta fuerza de retención del suelo se patentiza no sólo en el sentido vertical, sino también en dirección horizontal, respecto de los gérmenes que incidentalmente han penetrado en las capas profundas, de suerte que, en un suelo compacto, parece estar excluída la propagación amplia, en sentido lateral, de los gérmenes procedentes de tumbas, de cuerpos muertos de animales enterrados o de letrinas. Menos fácil es todavía que los agentes morbosos sean capaces de volver a la superficie desde cierta profundidad, y tampoco cabe que se desarrollen o formen esporos en el subsuelo, porque la temperatura no es favorable para ello. Las capas profundas del suelo, al contrario de lo que antes se creía, carecen, por consiguiente, de importancia en la aparición de enfermedades infecciosas, a no ser que, como veremos en el párrafo siguiente, se infecten las aguas subterráneas a través de un suelo muy permeable y se usen después para la bebida. El examen bacteriológico de las capas superficiales del suelo se verifica pesando una pequeña cantidad de tierra, de la cual se toma una muestra con una cucharilla estéril, y después de diluída en un líquido, también estéril, se siembra en medios sólidos, para contar luego las colonias. Para obtener una muestra del subsuelo que no haya sido contaminada por el suelo, es preciso servirse de una sonda especial, en cuyo extremo inferior hay una cavidad cerrada que se abre, después de introducida a la profundidad debida, por medio de una palanca existente en la parte superior.

Agua. Las aguas, tal como se encuentran en la naturaleza, según su procedencia, presentan grandes diferencias respecto al contenido en microorganismos, y especialmente de los patógenos. Las aguas atmosféricas, de lluvia, nieve o granizo contienen, a lo sumo, especies saprofíticas arrastradas con el polvillo del aire ; pero, a semejanza de éste, carecen de agentes morbosos. Lo mismo puede decirse de las de manantial procedentes de un suelo compacto, y de las subterráneas en

suelos de esta clase, las cuales, lo mismo que las capas profundas del terreno, están libres de gérmenes. Otra cosa es lo que pasa con las aguas subterráneas poco profundas o insuficientemente protegidas contra la contaminación de residuos o estiércoles, así como con las aguas de manantial entre piedras mal unidas, con grandes hendiduras, a través de las cuales pueden ser arrastrados los gérmenes de la superficie del suelo, por lo que, como se comprende, pueden contener también agentes morbosos. Esta clase de aguas son tan sospechosas como las procedentes de ríos, estanques y pozos, que naturalmente están expuestas, en todo momento, a la contaminación de gérmenes por residuos diversos, a menos que, como ocurre en las instalaciones de recogida de aguas de los valles, se tomen rigurosas medidas especiales para evitar toda posibilidad de contaminación. Los agentes morbosos llegados hasta el agua no podrán reproducirse sino en circunstancias particularmente favorables, es decir, si existe un contenido abundante de substancias orgánicas o sales nutritivas y elevada temperatura, y cuando esta reproducción se verifica, será siempre en espacios determinados, como cerca de las orillas más expuestas a la suciedad, entre embarcaciones o armadías reunidas en poco espacio y en zonas de agua estancada. De ordinario, los agentes de la putrefacción y morbosos perecen en el agua en breves días. Esta autodepuración de las aguas explica la pobreza en gérmenes de los grandes lagos, así como el hecho, comprobado por la experiencia, de que en grandes ciudades como Munich, que vierten las aguas de su alcantarillado, sin previa limpieza, en un río, cuando el caudal de éste es normal, a los pocos kilómetros aguas abajo no se notan ya los efectos de la contaminación. Hay varios factores que contribuyen a esta autodepuración de las aguas; la dilución de gérmenes con otras aguas puras que afluyen, la sedimentación de partículas suspendidas, el efecto germicida de la luz solar y la concurrencia vital de los saprofitos. En esta concurrencia toman parte, no sólo las bacterias, sino también los protozoarios, así como todos los organismos más o menos elevados, animales y vegetales, que viven en el agua y se conocen con el nombre de *plancton*. Estos últimos organismos, en la depuración artificial por filtración a través de arena, desempeñan un papel semejante al que tienen en la purificación natural ; el filtro de arena, no sólo retiene mecánicamente los gérmenes, sino que, al filtrar, tienen lugar fenómenos biológicos que se desarrollan, principalmente, en la superficie del filtro. Hemos de indicar también que, si bien es cierto que los agentes morbosos mueren relativamente pronto en una gran masa de agua infectada, en lugares mejor protegidos, por ejemplo, en el fango es posible la conservación de gérmenes patógenos durante largo tiempo, como se ha probado repetidas veces por experimentos de laboratorio y por otros ensayos en condiciones naturales.

El análisis microbiológico del agua es uno de los problemas más importantes que pueden plantearse al higienista. En primer lugar, han de contarse los gérmenes contenidos, lo cual se verifica por siembra de una cantidad determinada de agua en medios de cultivo. Desde

luego ha de evitarse en absoluto que, al recoger la muestra de agua para el análisis, pueda llegar a ella alguna impureza externa. Si la muestra se toma de un pozo o del grifo de una cañería, funcionará la bomba o se dejará correr el grifo durante un cuarto de hora por lo menos, para tener la seguridad de que el agua que pudiera estar detenida en el tubo ha salido por completo. Para extraerla de capas profundas se utilizan aparatos especiales, que se abren después de

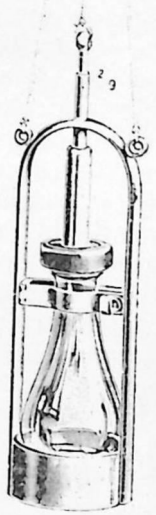


FIG. 50. Aparato para la toma estéril de agua situada profundamente (v. ESMARCH)

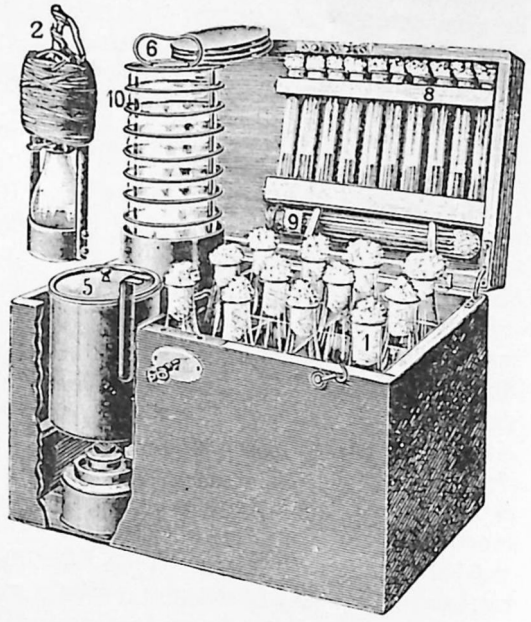


FIG. 51. Caja para análisis de aguas

estar a la profundidad deseada, y pueden llevar una ampolla de cristal cerrada a la lámpara, después de hacer en ella el vacío, o bien un recipiente cerrado con un tapón provisto de dos perforaciones. En el primer caso, el tubo de cristal fundido a la lámpara se rompe por medio de un resorte de acero o dejando caer un peso, y en el segundo el tapón funciona de modo que el agua no puede entrar por uno de los orificios hasta que se da salida al aire por el otro, lo cual se hará siempre a la profundidad deseada. El examen de los gérmenes del agua de una corriente subterránea requiere ciertas precauciones. Para operar con seguridad hay que esterilizar, mediante vapor a presión, el tubo de hierro que ha de introducirse hasta la corriente para obtener la muestra de agua. Esta se ha de recoger siempre en vasijas esterilizadas con toda garantía, lo que sólo podrán hacer personas peritas en la materia, a fin de evitar que el agua pueda contaminarse. El análisis del agua ha de practicarse inmediatamente después de extraída, y si esto no pudiera hacerse, el transporte al laboratorio será lo más rápido posible, con la muestra rodeada de hielo para evitar la reproducción de gérmenes, ya sea de los contenidos en el agua, ya de los que pudieran penetrar en ella al recogerla. La siembra de la muestra se hará generalmente en placas de gelatina, pero si el tiempo es caluroso y en climas cálidos, pueden emplearse placas de agar. Los cultivos se mantienen, de ordinario, a temperaturas de 22° a 26°, y a los tres o cuatro días se cuentan las colonias. Según el número de gérmenes que se suponga contiene el agua, se trabaja con mayor o menor cantidad de ésta ; con aguas pobres en gérmenes se emplearán hasta 10 c. c., y con aguas contaminadas bastarán fracciones de centímetro cúbico en gradación descendente. Las colonias pueden contarse a simple vista con ayuda de una red cuadriculada, o al microscopio a pequeño aumento (ocular I, objetivo *a*), tomando siempre el promedio de colonias bacterianas contadas en una cifra no pequeña de campos visuales, y por la relación entre la superficie del campo visual y la total de la placa de cultivo, tendremos el número de colonias.

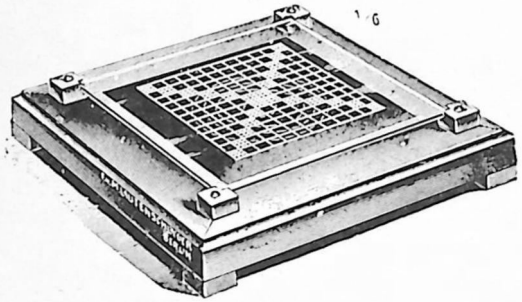


FIG. 52. Aparato contador de WOLFFHÜGEL

Prescindiendo de los casos en que se va a comprobar la ausencia de gérmenes en un agua, y por consiguiente el encontrarlos en abundancia demuestra su impureza, las cifras absolutas de bacterias tienen valor muy escaso, pero no sucede lo propio con las cifras comparadas de varios análisis realizados en igualdad de circunstancias ; así por ejemplo, la mayor cantidad de bacterias en un lugar determinado de una corriente de agua indica que ese lugar ha sido contaminado. De la misma manera, el aumento en la cifra de bacterias en un agua subterránea ordinariamente pobre de gérmenes, después de un período de fuertes lluvias o inundaciones, indica que el agua ha sido contaminada con gérmenes de la superficie del suelo. Tienen especial valor los análisis cuantitativos de gérmenes, verificados con regularidad, para comprobar el funcionamiento de instalaciones de depuración del agua. En este caso, el aumento de gérmenes en el agua señala un obstáculo en los procedimientos de depuración. En el control de la filtración por arena se admite como un buen resultado la cifra de 100 gérmenes por cada centímetro cúbico de agua ; pero lo mejor es determinar por la observación prolongada la cifra normal de gérmenes que deja pasar cada instalación de filtros, cifra que en los filtros rápidos americanos, por ejemplo, está muy por debajo de la anterior, y todo exceso importante sobre el promedio, así determinado, se considera como señal de una avería. Es necesario contar los gérmenes para comprobar la depuración

que realiza un filtro, a fin de conocer en qué momento alcanza su perfecto funcionamiento, a partir del de la puesta en marcha.

Por lo que respecta al resultado cualitativo del análisis bacteriológico, ni el hallazgo de muchas especies de bacterias, ni el que haya gérmenes que liquiden la gelatina, puede considerarse, según se creía antes, como prueba de impureza del agua. En cambio, actualmente nos inclinamos a conceder una importancia mayor a la presencia del colibacilo en un agua, porque como huésped habitual del intestino esto pudiera indicar que las aguas han sido contaminadas por materias fecales. La existencia de gran número de colibacilos por centímetro cúbico, especialmente cuando se trata de razas que crecen a la temperatura de 37° y hasta de 46°, según EIJKMAN, es señal indudable de contaminación del agua por excrementos animales, por lo cual es de sospechar la infección del agua. La presencia de escasos colibacilos carece de valor, porque pueden proceder también del contenido intestinal de peces, y algunas especies coli existen como saprofitos inofensivos. El análisis cuantitativo del colibacilo se verifica por siembras en caldo de cantidades de agua progresivamente aumentadas (de 0'1 a 10 c. c. por ejemplo), traspasando después los cultivos a las placas de agar de ENDO, en el cual se reconocen fácilmente las colonias del colibacilo, por el color rojo obscuro, y por consiguiente la existencia de este germen en el agua sembrada. Más exacto es el procedimiento de sembrar directamente en placas de ENDO las cantidades de agua progresivamente aumentadas, dejando evaporar el agua en el aparato de FAUST-HEIM o en el de SCHURMANN, que evaporan grandes cantidades de agua en muy poco tiempo por efecto de una corriente a temperatura ligeramente elevada de aire seco y libre de gérmenes; luego de evaporada el agua, se cuentan las colonias de colibacilo. De absoluto valor respecto de la capacidad de contagio del agua, es la comprobación directa de agentes morbosos existentes en ella, como se ha demostrado en una serie de casos para el vibrión del cólera y el bacilo tífico. La investigación del vibrión colérico tiene más probabilidades de éxito, en primer lugar porque disponemos de un método de enriquecimiento que permite comprobar la presencia del vibrión colérico en las aguas, aunque exista en escaso número, y además porque, a causa del corto período de incubación de esta enfermedad, pronto nace la sospecha de que un agua esté infectada, y procediendo en seguida a su análisis bacteriológico existen grandes probabilidades de demostrar la existencia de gérmenes del cólera antes de que hayan muerto o se hayan multiplicado notablemente. Ambas circunstancias, procedimiento de investigación y tiempo en que se suele verificar, son mucho más desfavorables para el bacilo de la fiebre tifoidea, y por esta razón se logra pocas veces comprobar su existencia en el agua; véanse ambos capítulos, CÓLERA y FIEBRE TIFOIDEA, en la parte especial.

En atención a los grandes obstáculos que presenta la comprobación directa de los agentes morbosos, y sobre todo las dificultades que existen para el juicio definitivo del análisis bacteriológico, no dependerá sólo de éste el criterio que formemos acerca de la naturaleza y posibilidad de contaminación de unas aguas, sino más bien del resultado de investigaciones posteriores hechas sobre el lugar y el terreno, servirán para decidir la cuestión de si es de temer la contaminación del agua con gérmenes patógenos cuyas circunstancias, aun cuando por el momento falten pruebas o escapen a la comprobación.

En muchos casos la sencilla inspección del lugar nos llevará al fin deseado, proporcionándonos datos interesantes, como por ejemplo la existencia de vías (grietas en la cubierta o paredes de un pozo o construcción defectuosa de un filtro) por donde puedan llegar al agua materias contaminadas, o la presencia de focos de infección próximos, tales como alcantarillas, estercoleros, depósitos de basura, etc., situados inmediatamente encima de la recogida de aguas de una corriente subterránea no muy profunda. En otros casos puede intentarse demostrar palpablemente la vía de contaminación por medio de ensayos directos con gérmenes especiales. Esto se logra vertiendo masas de cultivos de levaduras o «bacillus prodigiosus» en la superficie del suelo, el cual pasa a través de las hendiduras del terreno y va a parar al agua subterránea en donde puede comprobarse luego su presencia. De un modo semejante se prueba el poder retentivo de diversos filtros añadiendo gérmenes al agua antes de llegar a ellos. Y de igual manera se comprueban los procedimientos para depurar las aguas por desinfectantes químicos, rayos ultravioleta y otros.

Las **substancias alimenticias** pueden contener gérmenes patógenos en los casos siguientes:

1. Cuando proceden de animales enfermos (bacilos de carbunco, paratíficos y triquinas en la carne, bacilos de la tuberculosis en la leche) o de plantas enfermas (estreptotrices en las espigas de cereales).
2. Por contaminación posterior por parte de personas infectadas que tocan los alimentos; la leche transmite así la disentería y la escarlatina, y de la misma manera las legumbres crudas sirven de vehículo para la transmisión de la fiebre tifoidea, el cólera y la disentería.
3. Por desarrollo de especies saprofíticas tóxicas que llegan casualmente a los alimentos, y en circunstancias muy favorables a su desarrollo producen venenos; así ocurre con el «bacillus botulinus» y las bacterias peptonizantes de la leche de vaca.

La comprobación de gérmenes patógenos en las substancias alimenticias se verifica por los métodos microscópicos y biológicos adecuados a la especie correspondiente, así como por inoculación en los animales (V. el capítulo correspondiente en la parte especial).

El análisis bacteriológico de la leche y su interpretación merecen estudio especial. Inmediatamente después de ordeñada se hallan ya en la leche miles de gérmenes por centímetro cúbico, y el número será tanto mayor cuanto menos limpio sea el procedimiento de ordeñar. Casi siempre caen en la leche pequeñas partículas de estiércol que pueden demostrarse centrifugando. Si el pezón del animal está

enfermo, aparecen en la leche corpúsculos de pus, numerosos estreptococos y glóbulos rojos. La leche fresca posee determinadas propiedades perjudiciales para las bacterias, pero tales propiedades desaparecen a las pocas horas. El no enfriar considerablemente la leche inmediatamente después de ordeñarla, es causa de que aumente extraordinariamente su contenido en gérmenes; en los casos más favorables, la leche destinada al consumo contiene unas 100 000 bacterias por c. c., y con frecuencia llega al millón y le sobrepasa. A consecuencia de esta multiplicación de los gérmenes, al cabo de uno o dos días la leche sufre alteraciones, que consisten, principalmente, en un aumento de la acidez por efecto del «bacillus acidi lactici», el cual crece a la temperatura ambiente o por especies que le son afines, las cuales se desarrollan a la temperatura de la estufa (bacilos del yoghurt y del kefir); esta leche puede tomarse y hasta se emplea con fines dietéticos. No sucede lo mismo con la alteración producida en la leche por bacterias que forman esporos a temperatura superior a 22°; estas bacterias son muy abundantes en las partículas de estiércol mezcladas a la leche. Rara vez se presenta la fermentación ácida de la manteca producida por anaerobios, y es más rara aún la putrefacción, porque la flora láctea tiene generalmente propiedades antipútridas. Más frecuente es la peptonización de la albúmina de la leche, precipitándose al mismo tiempo la caseína por el fermento lab. Al principio de este proceso la leche casi no presenta otras alteraciones perceptibles que una zona más clara debajo de la capa de nata, y un sabor amargo. La leche en estas condiciones puede provocar a los niños de pecho enfermedades graves del estómago e intestinos, como el cólera infantil, debidas a las toxinas bacterianas que contiene.

Para juzgar de los procedimientos de esterilización encaminados a obtener una leche inalterable, hay que comprobar, en primer término, si han muerto los gérmenes resistentes formadores de esporos; la mejor manera de realizar esta comprobación es colocar los frascos de leche bien cerrados dentro de la estufa y tenerlos allí largo tiempo, con lo cual la descomposición de la leche pondrá de manifiesto la presencia de gérmenes esporógenos, aunque éstos sean escasos.

De un modo muy distinto deberemos juzgar los procedimientos de esterilización, tales como la pasteurización o la biorización, que no se proponen preparar una leche inalterable, sino que se limitan a matar los gérmenes contenidos incidentalmente en la leche; en estos casos bastará con contar los gérmenes.

VIII. Indicaciones técnicas para los trabajos microparasitológicos en el laboratorio

1. Instalación y dotación del laboratorio

Cuando se trata de realizar trabajos bacteriológicos que se repiten con frecuencia, es necesario preparar especialmente para este fin la mesa de trabajo. Esta debe estar situada, en un laboratorio irreprochablemente higiénico y claro, junto a una ventana que ajuste bien. Si el sol diera de lleno en el laboratorio, las ventanas estarán resguardadas por cortinillas que impidan la entrada directa de los rayos solares hasta la mesa de trabajo, porque la luz solar directa mata los cultivos o altera su virulencia e influye también perjudicialmente en los sueros, objeto de estudio, pudiendo hacerlos inservibles. Ante todo hay que adquirir la costumbre de guardar los cultivos en lugar obscuro, ya sea en la estufa o en un armario corriente, tan pronto como se hayan utilizado. Debe evitarse también exponer innecesariamente a la luz solar los líquidos colorantes usados para las preparaciones.

La mesa de trabajo, que ha de procurarse mantener siempre bien limpia, debe estar cubierta con papel de filtro o secante, y sobre él una placa de cristal o de amianto. En lugar de un sencillo tablero de madera puede cubrírsele con linoleum o substituirlo por un tablero de mampostería de piedra artificial o de vidrio grueso. El sillón debe ser giratorio. Como objetos de uso corriente y medios auxiliares para trabajos microscópicos, se tendrán sobre la mesa, además de un microscopio y un aparato de iluminación, un mechero Bunsen, un recipiente con solución de sublimado para sumergir en él objetos infectados, cultivos viejos, cubreobjetos para gota pendiente, pipetas, etc., un soplete para fundir vidrio, una trompa de agua para vacío y presión, portaobjetos lisos y excavados, cubreobjetos, una campana de vidrio para proteger el microscopio, pinzas para cubreobjetos de Kuhn, pinzas de Cornet, placas de porcelana para colorar en cubreobjetos, agujas, espátulas, escalpelos, tijeras y agujas y asas de platino, si es preciso con la escala de asas de Czaplewski. Entre los objetos de cristal son indispensables: jeringuillas de inyección de tamaños diferentes, probetas de 10, 25, 100 y 1000 c. c., pipetas de 1 c. c., graduadas en centésimas, y de 10 c. c., graduadas en décimas; además un estuche para pipetas esterilizable, frascos de Erlenmeyer, tubos de ensayo, gradillas y pinzas para los mismos, vasos, embudos, placas de Petri y de Kolle, frascos de tapón esmerilado en vidrios claros y obscuros, frascos cuentagotas para alcohol y xilol, frascos con soluciones colorantes, varillas macizas y huecas, cristales de reloj y cápsulas. Habrá también papel de filtro y papel tornasol. Son necesarios también un baño maría, termómetros, tapones de goma y de corcho, capuchones y tubos de goma, balanzas, un centrifugador eléctrico y otro de agua, y desecadores. Para preservarlos de la sequedad y para que no se tornen quebradizos, los objetos de caucho deben guardarse en cajas cerradas herméticamente, en las que se pone algodón impregnado en sulfuro de carbono.

Para lavar las preparaciones teñidas basta un frasco lavador y una cubeta, pero lo más conveniente es tener en el laboratorio agua corriente. No debe faltar un lavabo con jabón y toallas abundantes, teniendo siempre preparado, y a mano, sublimado al 1 % o lisol al 3 %. No ha de olvidarse tampoco un espejo de pared para limpiarse fácil-

mente tanto las manchas de colorantes como el material infeccioso que pueda salpicar la cara durante el trabajo.

Para que la instalación del laboratorio bacteriológico sea completa, debe tenerse también una estufa para gelatina y otra para agar, un agitador, un autoclave, un esterilizador por aire caliente, una nevera o cámara frigorífica, un armario para el instrumental y objetos de cristal, otro para los medios de cultivo, un botiquín y una mesa para las muestras de orina, heces, esputos, autopsias, etc. Si se tienen animales, éstos se guardarán en jaulas de fácil limpieza y en locales apropiados.

El bacteriólogo necesita tener a su disposición, en cualquier momento, las siguientes soluciones colorantes :

1. Solución de violeta de genciana fenicada.
2. » de LUGOL.
3. Fucsina fenicada diluída.
4. » » concentrada de ZIEHL.
5. Solución de azul de metileno de LÖFFLER.
6. Azul de metileno con ácido acético
7. Cristal violeta } Coloración de NEISSER.
8. Solución de vesuvina

Además deben tenerse a mano :

Alcohol absoluto.
Alcohol con ácido clorhídrico (1 % HCl en alcohol de 90°).
Bálsamo del Canadá.
Aceite de cedro.
Vaselina con un pincel.
Un frasco de ERLENMEYER con agua destilada y otro con solución fisiológica al 0'85 %.

2. Precauciones que deben observarse al manejar material infeccioso

El manejo de materiales muy virulentos, si no se tiene mucho cuidado, constituye un continuo peligro para los que toman parte en un curso bacteriológico y para cuantos les rodean. Cabe hasta la posibilidad de llevar gérmenes infecciosos a sus familias, por lo que se contraería una grave responsabilidad. Por eso nos parece oportuno insertar aquí algunas reglas generales sobre las precauciones más necesarias.

Antes de empezar cualquier trabajo bacteriológico ha de examinarse si las manos ofrecen alguna herida por la que pueda penetrar material infeccioso. Si hubiere alguna, debe vendarse. Durante el trabajo no debe tocarse la cara con las manos, y menos aún la boca. Las etiquetas que se peguen en los portaobjetos, para distinguir las diferentes preparaciones, deben humedecerse siempre con el dedo mojado en agua : es inadmisible de todo punto humedecerlas con la lengua. También ha de evitarse el uso del pañuelo y tocar los picaportes o pestillos de las puertas sin desinfectarse antes las manos.

Es indispensable, para trabajar con substancias virulentas usar un vestido de protección, que puede consistir en un delantal largo ajustado al cuerpo, y mejor aún en una blusa de dril o lienzo fuerte. La blusa debe abrocharse por la espalda, como las de los cirujanos; tendrá mangas, cinturón y un bolsillo en el pecho. Los que prefieran un modelo que se abroche por delante, deben exigir una doble hilera de botones, o por lo menos que los bordes se superpongan ampliamente. En el bolsillo no deben meterse nunca los cultivos, porque al inclinarse bruscamente, o cuando el bolsillo es muy holgado, pueden caer y romperse, infectando el piso y el calzado. Las mangas no deben ser demasiado anchas, y conviene que sus extremos se ajusten bien a la muñeca, mediante un botón que llevarán los puños. Si la blusa se ensucia con material infeccioso, debe ser convenientemente esterilizada ; para la limpieza corriente bastará con someterla a la ebullición, como la ropa blanca. Cuando se maneja material muy peligroso, se puede poner sobre la blusa un delantal de goma, si es preciso con mangas. En los laboratorios destinados exclusivamente a trabajos sobre la peste, se acostumbra usar chanclos sobre el calzado, o, al salir del laboratorio, restregarse las suelas con un paño mojado en sublimado o en lisol.

En todos los trabajos bacteriológicos debe observarse la limpieza y el orden más exquisitos. Nada debe tirarse al suelo o dejarse sobre la mesa, ni siquiera un papel de filtro usado, ni aun las leves partículas que resultan al afilar un lápiz. Los frascos de alcohol, xilol y soluciones colorantes deben guardarse siempre en gradillas de madera. Los tubos de cultivo se ponen en vasos, cuyo fondo esté cubierto con algodón, para evitar que se rompan los tubos. Nunca se les dejará sobre la mesa después de usarlos, sino que se les tapará con algodón y se les colocará de nuevo en su vaso correspondiente. Los porta y cubreobjetos se guardarán en cajas de cartón dentro de los cajones de la mesa ; los usados se dejan en un cristalizador con sublimado, que no debe faltar nunca, o en una solución de 200 gr. de bicromato potásico disueltos en dos litros de agua hirviendo, adicionando luego 200 c. c. de ácido sulfúrico.

Para poder utilizar de nuevo los porta y cubreobjetos, se les hierve durante diez minutos en dicha solución, moviéndolos al mismo tiempo ; se vierte después el líquido y se les lava durante cinco minutos en NaOH diluída ; se les vuelve a hervir otros cinco minutos en la misma solución y otra vez se les lava con NaOH diluída, y luego se lavan los portaobjetos con agua y alcohol, y se les frota con un paño seco y limpio (ZETTNOW).

Los cubreobjetos pueden romperse por torpeza o por apretar demasiado con las pinzas de CORNET ; cuando se rompe alguno, se recogen con las pinzas los trozos caídos, se les echa en sublimado y se desinfecta con este líquido la superficie de la mesa. No teniendo estos

cuidados, podría ocurrir que alguno de los trocitos de cristal ocasionase alguna herida en las manos. Si la mesa se ensucia con material que contenga esporos, entonces no basta la desinfección ordinaria con sublimado al 1 ó 2 por 1000, sino que debe hacerse con la llama o con ácido sulfúrico concentrado.

Las preparaciones, una vez terminadas y teñidas, se guardan en carteras o cajas preparadas *ad hoc*.

Sobre la mesa de trabajo no habrá más objetos que los indispensables, pues para trabajar asépticamente es condición fundamental que la mesa esté desocupada. Para principiantes, podría fijarse un cartel en la pared, en sitio bien visible, que recuerde la necesidad del buen orden: «**Devuelve limpio a su sitio, cualquier objeto que hayas usado**» (HEIM).

Asas y agujas. Antes de empezar el trabajo con cultivos, para no llevar ningún germen extraño a la preparación, se quemarán a la llama el asa y las agujas, y lo mismo se hace después de terminar la preparación; jamás se dejarán sobre la mesa sin pasarlas antes por la llama; lo más conveniente es ponerlas en un estuche especial destinado a este fin. De olvidar estas prescripciones, puede ocurrir que al dejarlas sobre la mesa se extienda por ésta la substancia infectada adherida a la punta. No basta quemar a la lámpara el extremo del asa o aguja; con ello no se destruirá todo el material infeccioso que pudiera estar adherido, porque al recogerlo de los tubos la varilla del asa penetra mucho en éstos y toca sus paredes, de modo que las bacterias adheridas a esta parte pueden pasar al mango; por consiguiente, éste, en toda su longitud, ha de pasarse por la llama. Cuando en el asa queda bastante cultivo, es especialmente recomendable la buena práctica de poner el extremo del asa en el centro de la llama de gas; así, por el calor recogido en los lados del asa, se carboniza lentamente el material infeccioso contenido en el centro. Con este procedimiento se evita que salten partículas muy pequeñas de material infectado sobre la mesa, y el peligro consiguiente.

Cubreobjetos y portaobjetos. Las preparaciones son más limpias y se conservan mejor con cubreobjetos, pero por la sencillez y para economizar cristales las preparaciones ordinarias se hacen sólo con el portaobjetos. Después de extender el material sobre éste, se coge con las pinzas de CORNET, que en una de sus caras tienen un botón o una abertura ovalada para indicar que de aquel lado debe estar el frotis de la preparación. No es recomendable tampoco frotar el material indistintamente sobre los cubreobjetos. La gota de agua se pone precisamente en el centro del cubreobjetos, y después de depositar en ella el material, se la extiende sin que llegue a tocar los bordes del cubreobjetos.

Las preparaciones, después de secadas al aire unos minutos, se fijan pasándolas tres veces por la llama. Pero aun después de fijadas y teñidas, debe tenerse en cuenta que el material de la preparación puede ser todavía infeccioso. Si no se han fijado bastante, puede arrastrar la

solución colorante algo del material, y a pesar del fuerte poder bactericida de los colores de anilina, gran parte de los microorganismos pueden aún mantenerse vivos y con poder patógeno. Las preparaciones, después de teñidas, se secan ordinariamente con papel de filtro. Para evitar que substancias infecciosas del cubreobjetos húmedo pasen a la mano a través del papel, se dobla la hoja por medio, y así doblada, se abarca el cubreobjetos por ambas caras.

Desecación del material infeccioso. Es muy peligroso el material infeccioso seco, por ejemplo esporos de carbunco secos en una hebra de seda. Se sabe por experiencia que los esporos de carbunco conservan la vida largo tiempo en el polvo, y que por la acción del viento pueden mezclarse con el aire respirado y producir así el carbunco pulmonar, de fatal desenlace siempre. Las experiencias de desecación deben realizarse siempre en un lugar protegido con un pliego de papel de filtro y separado de las otras mesas de trabajo. Mientras se trabaja con material desecado han de evitarse en absoluto las corrientes de aire y hasta respirar con fuerza. Es indispensable trabajar con mucho cuidado y gran atención. Terminado el trabajo, se quema el papel de filtro, sin sacudirlo.

Desinfección. Hemos detallado ya la desinfección de las agujas de platino. Los objetos sin valor, infectados, deben quemarse enseguida; nunca deben tirarse al cubo de residuos materias infectadas. Los instrumentos contaminados se esterilizan inmediatamente, hirviendo instrumentos y recipientes metálicos en una débil solución de sosa. Al hacerlo, es preciso que la solución cubra por completo los objetos infectados. Ha de procurarse que las paredes del recipiente empleado sean altas, a fin de que al hervir el líquido, que forma espuma con frecuencia, no pueda derramarse, pues cuando ha hervido poco tiempo puede contener aún gérmenes infecciosos vivos. Si se derrama algo de líquido, se vierte encima una solución de sublimado o lisol y se le deja actuar algunas horas; si el líquido llega al suelo, se procederá de igual manera.

La desinfección de las manos debe hacerse lavándose y frotándose con cepillo en los cristalizadores con sublimado, dispuestos en todo momento en el laboratorio; es erróneo el criterio de lavarse y secarse las manos en seguida de desinfectarlas; especialmente después de trabajar con material muy virulento, el sublimado debe dejarse secar sobre ellas. Al terminar cada sesión se lavan las manos con agua y jabón, luego en agua clara y abundante, y por último se desinfectan con sublimado; para evitar que se agrieten basta untarlas con lanolina o glicerina.

Gota pendiente. El examen en gota pendiente ofrece grandes dificultades para los principiantes. Ocurre con frecuencia que al enfocar rompen el cubreobjetos, y el material infeccioso llega entonces a la lente del objetivo. El alumno no debe contentarse con arrojar la preparación estropeada y el portaobjetos en el cristalizador con su-

blimado; debe también esterilizar perfectamente la platina y sobre todo el objetivo, haciéndolo con gran esmero y empleando el alcohol con preferencia a otro cualquier medio.

Preparaciones por impresión. Estas preparaciones se realizan siempre tomando el cubreobjetos con las pinzas y colocándolo sobre la colonia que se quiera examinar. Claro está que el cubreobjetos no debe levantarse nunca con los dedos, sino con la pinza. Tampoco debe tomarse con los dedos, como con frecuencia se hace, al fijarlas y al teñirlas, porque con ello es casi inevitable la infección de la mano.

Extracción del material de los tubos de cultivo. Para que la luz facilite la extremada pulcritud del trabajo, es conveniente tomar el tubo de cultivo entre el pulgar y el índice de la mano izquierda, de modo que la palma de la mano esté hacia arriba y el fondo del tubo hacia fuera. Primeramente se quita el tapón de algodón dándole vueltas, no sencillamente tirando, porque entonces quedan restos en el tubo ; el tapón se coloca entre el tercero y cuarto dedos de la misma mano, manteniendo hacia fuera la parte que ha estado metida en el tubo, para que no toque los dedos. Después se quema la boca del tubo y se extrae el cultivo con el asa o aguja. Esta se coge por el mango, como una pluma. Después de quemar el asa y dejarla, se vuelve a quemar el tubo, se coge el tapón de algodón, se le quema ligeramente y se tapa el tubo, volviendo a colocar éste en su sitio.

Preparación de placas. Al preparar placas de agar o gelatina, se observa con frecuencia que se dejan sobre la mesa los tubos de dilución, en los que se mezcla el material infeccioso con agar o gelatina, después de verter el contenido en las placas de Petri esterilizadas. A fin de evitar la contaminación del lugar en que se trabaja, los tubos usados deben dejarse inmediatamente en un cristalizador con sublimado, de manera que se llenen de líquido. Sobre la mesa no debe caer gota alguna de los tubos.

Pipetas. Antes de sacar las pipetas de la caja deben desinfectarse cuidadosamente las manos, porque el dedo pulgar ha de tapar la abertura superior de la pipeta al manejarla, y esa misma abertura va después a la boca. Las pipetas se sacan con facilidad de la caja en que han sido esterilizadas, inclinándolas sobre la tapa entreabierta, de manera que al abrirla por completo sobresalen del latón de la caja. Entonces es fácil sacar una pipeta sin tocar la boquilla de las demás. Si la boquilla de la pipeta tocase un objeto cualquiera, se la pasa por la llama o se toma otra de la caja. Por la gran posibilidad de infección al manejar la pipeta, es preciso observar un cuidado extraordinario.

Cuando se trabaja con bacterias patógenas, hay que introducir por la embocadura de la pipeta un algodón, que sin embargo deje pasar el aire. Con esta precaución, ya se puede succionar. En el laboratorio se tendrán siempre dispuestas pipetas estériles de esta clase. Cuando por inadvertencia llega el líquido a la boca, con lo cual se corre el

riesgo de una infección, debe enjuagarse la boca repetidas veces con agua oxigenada al 1 %. En todo caso lo mejor es, cuando se maneja material infeccioso, suprimir en absoluto la succión con la boca y verificarla con una pera de goma u otro medio semejante.

Investigación en animales. Para operar en animales es indispensable el auxilio de personal instruído que esté familiarizado con la posición que deba adoptar el animal al operar. Hay que tener cuidado también de que el ayudante no sea herido por el bisturí o la jeringuilla del operador. Parte de las infecciones de laboratorio son debidas a descuidos al operar animales. Con los animales ya inoculados ha de tenerse presente que los gérmenes pueden estar en la piel de aquéllos, no sólo por haberlos recibido en el momento de la inyección o porque se elimine de las lesiones provocadas, sino también en los casos en que el agente infeccioso es evacuado con los excrementos y la orina del animal. Hemos de procurar, además, que ni el operador ni el ayudante sean heridos por mordedura o arañazo de los animales. En casos especiales, se usarán guantes y se tomarán los animales con pinzas. Cualquier arañazo o mordedura debe considerarse como contaminación, y tratarla en consecuencia. El empleo de la tintura de yodo o la cauterización con el ácido nítrico es recomendable en estos casos.

El narcótico más usado es el éter, y al emplearlo deben apagarse todas las llamas próximas, y especialmente las de los encendedores de los mecheros de gas, pues, como es sabido, los vapores de éter son muy explosivos, y la más pequeña llama bastaría para producir la explosión. Por consiguiente es preciso trabajar con las debidas precauciones.

Jeringuillas de inyección. Cuando las jeringuillas tienen burbujas de aire, para expulsarlas se pone la jeringuilla hacia arriba y se empuja el émbolo. Al hacerlo es muy fácil que una pequeña cantidad de líquido infecte las manos o la mesa, circunstancia que se remediará colocando un trozo de papel de filtro o de algodón atravesados por la aguja. Si el émbolo no corriese bien, no debe forzársele, porque salpicaría material infeccioso al ceder, sino que se buscará el motivo de la resistencia, y si no se vence, se utilizará otra jeringuilla.

Autopsia de animales pequeños. Para evitar contaminaciones, al verificarla se extiende sobre la mesa de autopsias una cubierta de papel embebido en sublimado, y se tiende sobre la misma el cadáver del animal. Terminada la autopsia, se cubre el cadáver con papel de filtro o algodón impregnados en sublimado, a fin de evitar que las moscas recojan y extiendan la infección. El cadáver se quema después en el horno de cremación. Cuando se trata de materiales muy infecciosos, la autopsia debe hacerse con guantes de goma.

Observaciones finales. En las lecciones de un curso, y en particular mientras se realizan trabajos bacteriológicos, no se debe comer. Toda una serie de infecciones de laboratorio se han adquirido al manejar la pipeta, pero otras tantas, quizá, pueden atribuirse a tomar ali-

mentos tomados con las manos antes de desinfectarlas. De aquí se deduce la imprescindible necesidad de no comer durante las horas de trabajo, sin haberse antes desinfectado las manos.

Finalmente indicaremos algunas medidas de precaución para los fumadores. El cigarro debe dejarse de modo que la parte encendida esté apoyada, quedando saliente y en el aire el extremo que se lleva a los labios, pero lo mejor es no fumar durante los trabajos bacteriológicos, porque siempre es grande el peligro de llevar a la boca, con el cigarro, material infeccioso. Cuando se trabaja con gérmenes peligrosos, no debe fumarse en absoluto.

3. Investigación en animales

El instrumental necesario para la investigación en animales es el siguiente :

1. Jaulas para guardarlos.
2. Mesas de operaciones para sujetarlos al operar.
3. Jeringuillas de inyección, y demás instrumental necesario.



FIG. 53. Tarro para ratones y ratas

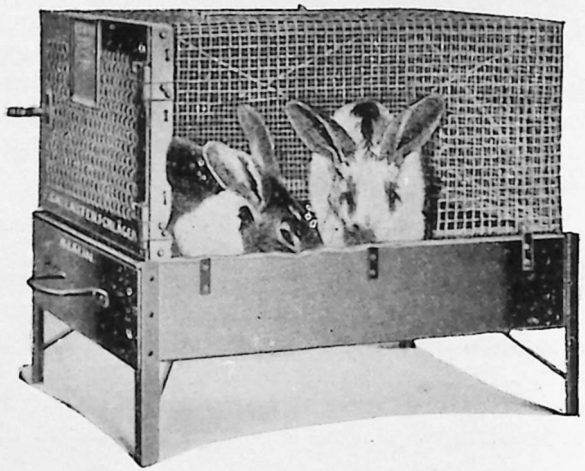


FIG. 54. Jaula para conejos y cobayos

En las figuras 53 a 59 pueden verse la forma y detalles de los utensilios mencionados.

Las ratas y ratones se guardan en tarros de vidrio, altos, cubiertos con tejido metálico, sobre el cual se pone un peso. En los tarros debe anotarse el número de animales, la clase y fecha de la inoculación, peso de los mismos, etc.

Los cobayos y conejos se encierran en tarros de alfarería con tapa de alambre o en jaulas de hojalata redondas o rectangulares. Los animales deben estar dentro de la jaula sobre un piso de alambre superpuesto, para que las excreciones no ensucien tanto la paja.

Los animales se marcan con colores diferentes o con señales de metal, que se atraviesan en las orejas. Las aves se marcan con anillos de latón en los pies. Para evitar confusiones, aconsejamos reseñar con exactitud los animales, anotando detalles, como por ejemplo, oreja izquierda, negra; castaña, la derecha; nariz negra; a la izquierda

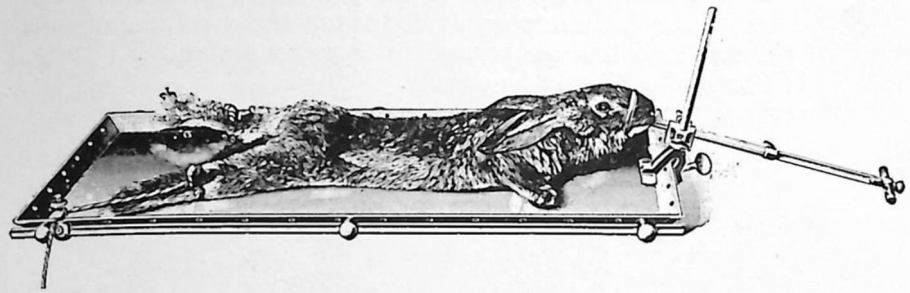


FIG. 55. Mesa de operaciones de MALASSEZ

del lomo, mancha amarilla; el resto blanco, etc. También se pueden usar sellos de goma especiales, en los que pueden señalarse los colores.

La temperatura de los animales se toma con un termómetro que se les introduce en el ano.

La inoculación en animales es indispensable para fines diagnósticos y poder distinguir las especies, así como para comprobar su virulencia y el aumento de las mismas, y para investigaciones de sero y quimioterapia.

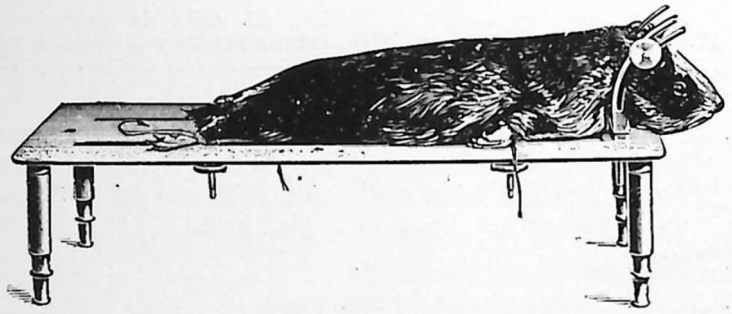


FIG. 56. Mesa de operaciones para gatos pequeños, ratas y cobayos (modelo COWL)

Es conveniente muchas veces limpiar de pelo o plumas el sitio de la inyección, valiéndose de la tijera, con navaja de afeitar o por depilación.

Los métodos de inoculación son los siguientes :

1. *Intracutánea*; empleada para el diagnóstico de la tuberculosis y difteria.

2. *Cutánea* (PIRQUET). Consiste en untar con el material infeccioso la piel afeitada, o rasguñar ésta y depositar el material en la herida.
3. *Subcutánea.*
   a) En una bolsa de la piel; introduciendo el material inoculado en el tejido celular subcutáneo por una herida hecha con tijera estéril. En ratones y ratas se practica en el arranque de la cola; en los cobayos, sobre el pecho o vientre.
   b) Por medio de una jeringuilla.

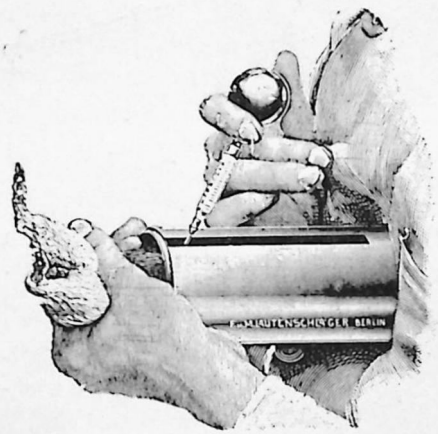


FIG. 57. Inyección intraperitoneal con manguito auxiliar

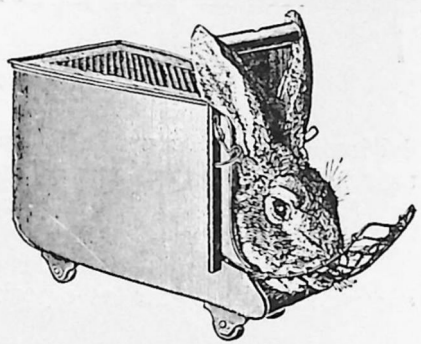


FIG. 58. Caja de operaciones para extraer sangre y practicar inyecciones intravenosas en conejos, según MICHEL

4. *Intraperitoneal;* se hace con aguja de punta obtusa, para evitar las lesiones del intestino, muy fáciles si la punta es aguda. La penetración de la aguja se facilita con un pequeño corte de tijeras en las capas de la piel, hasta la capa muscular.
5. *Intrapleural e intramuscular.*
6. *En la cámara anterior del ojo.*
7. *Intravenosa o intracardiaca.*
8. *Por alimentos.*
   a) Por la boca.
   b) Por catéteres elásticos introducidos hasta el estómago.

Finalmente, para ser completos:

9. *Inoculación por inhalación;* para ésta se deben tomar precauciones extraordinarias, consistentes en realizar el experimento en espacios cerrados herméticamente, a fin de evitar infecciones de laboratorio.

4. Autopsia

Cuando hay que autopsiar a los animales, se procede en la forma siguiente:

En primer lugar, ha de establecerse como regla general no tocar al animal con las manos. Se le tiende de espaldas en la mesa de autopsias sujetando las extremidades con cuerdas, clavos, punzones o alfileres. El vientre se humedece con sublimado o solución de lisol para evitar la dispersión del pelo y matar los parásitos. Si es preciso, se quema el pelo con alcohol; las plumas deben arrancarse.

A continuación se traza una incisión en la línea media, desde el cuello a la sínfisis, mediante un instrumento estéril; se diseca la piel, se la vuelve hacia fuera y se sujeta a la mesa. Luego se procede a cortar los músculos del vientre por la línea media, sin lesionar el intestino.

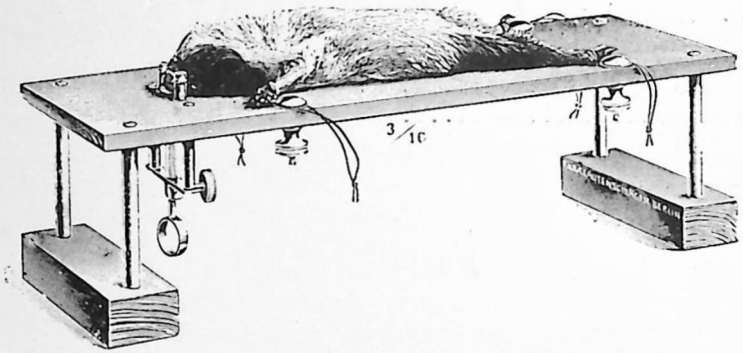


FIG. 59. Mesa de operaciones para conejos, cobayos y ratas. Modelo de FRIEDBERGER

La cavidad torácica se abre seccionando las costillas por ambos lados del esternón, que se levanta después en alto. Entonces pueden observarse las distintas vísceras, se examinan también los ganglios inguinales y se procede a la extracción estéril de los órganos sospechosos. Durante la autopsia deben quemarse con frecuencia los instrumentos o renovarlos por otros esterilizados y, al terminarla, no se dejarán sobre la mesa, sino que se esterilizarán, hirviéndolos en un recipiente con solución de sosa al 2 %.

Si se quiere hacer cultivos con los órganos, se quema la superficie de éstos con un escalpelo al rojo, se incinden luego con escalpelo esterilizado, y con un asa pasada por la llama se recoge el material y se siembra en medios sólidos y líquidos. Para el examen microscópico se preparan frotis de los órganos infectados. Las partículas duras, como los tubérculos, se aplastan entre dos portaobjetos, para examinarlas.

Terminada la autopsia, los restos del animal se llevan al horno de cremación. Si no se dispone de éste, pueden enterrarse envueltos en un paño embebido en sublimado, o destruirlos con ácido sulfúrico concentrado.

La mesa de autopsia se lava, después de usarla, con sublimado al 1 ó 2 por 1000.

Los órganos especialmente adecuados para demostraciones o experimentos se tratan con solución de KAISERLING.

1. Fijación del órgano hasta decoloración completa en la solución I.

Formalina	200	partes
Agua	1000	»
Nitrato de potasa	15	»
Acetato de potasa	30	»

2. Para restablecer el color de la sangre, se tratan con alcohol de 80°, que se renueva varias veces.

3. Llevarlos a una mezcla de

Agua	2000	partes	líquido conservador
Acetato de potasa	200	»	
Glicerina	400	»	

PARTE ESPECIAL

A. Bacterias patógenas

I. Cocos patógenos

Los cocos o bacterias de forma esférica se clasifican de una manera natural, atendiendo a la característica morfológica de las agrupaciones dependientes de la división celular. Si ésta se realiza de un modo desigual, en distintas direcciones, se originan montones irregulares semejantes a racimos, por lo cual se les denomina *estafilococos*. Cuando la división se realiza en una o varias direcciones perpendiculares entre sí, se forman agrupaciones regulares características para cada especie o grupo. Si la división tiene lugar sólo en una y siempre la misma dirección, se forman cadenas, constituídas por una serie más o menos larga de individuos aislados, recibiendo en este caso el nombre de *estreptococos*. En algunas especies las cadenas son muy cortas, constando únicamente de 4 a 6 elementos; en otras, las células, hijas de la división, permanecen dispuestas por pares y se denominan *diplococos*, entre los cuales aun pueden establecerse diferencias derivadas de la forma de los cocos; unas veces, éstos son perfectamente esféricos, otras son elípticos, y dentro de estos últimos el mayor diámetro puede ser perpendicular a la línea de división, como sucede con el diplococo de la neumonía, en cuyo caso resulta la forma lanceolada, o ser paralelo a la línea de división, presentando además los cocos sus caras internas aplastadas y con una escotadura o depresión que les da un aspecto reniforme o de habichuela, como ocurre con el gonococo y el meningococo. La segmentación celular puede también realizarse según dos direcciones perpendiculares entre sí en un mismo plano, resultando grupos de cuatro elementos, a los que se da el nombre de *merista* o *tetradas*, como se observa con frecuencia en estas dos últimas especies patógenas citadas, y con regularidad absoluta en el *micrococcus tetragenus*. Por último, la segmentación puede efectuarse siguiendo las tres direcciones del espacio, de lo cual resultan formas parecidas a un paquete o fardo de mercancías, constando siempre de ocho elementos agrupados en dos planos, y denominándose entonces *sarcinas*.

Esta clasificación no es tan sólo una división artificial basada en caracteres puramente exteriores, ya que a los caracteres morfológicos corresponden en mayor o menor proporción otros biológicos, como por ejemplo su comportamiento respecto al GRAM, su desarrollo en los medios de cultivo, etc. En casi todos los grupos de bacterias esféricas establecidos se encuentran especies patógenas; únicamente entre las sarcinas no se conoce hasta ahora especie patógena alguna. Los estreptococos ovales presentan muchos caracteres afines con ciertos bacilos también ovales, especialmente con los del grupo del bacilo láctico, dentro del cual ciertas especies fueron denominadas estreptococo láctico por unos autores y bacilo láctico por otros. Algunas especies de bacilos ovales muy cortos fueron tomadas erróneamente por cocos, como por ejemplo, el *bacillus prodigiosus*, tan conocido por sus facultades cromógenas. El germen de la fiebre de Malta, todavía hoy, se designa casi siempre con el nombre de *micrococcus melitensis*, aunque indudablemente se trata de un bacilo.

Las bacterias de forma redonda carecen de esporos y, a excepción de algunas sarcinas, no poseen movimiento.

1. Estafilococos piógenos

En casi todas las afecciones que se acompañan de formación de pus figuran los cocos como agentes causales de este proceso, ya sean los estafilococos, ya los estreptococos. La opinión de BILLROTH y otros, de creer que se trataba de un solo germen de variadas formas, denominado «cocobacteria séptica» solamente pudo admitirse cuando no era posible una separación bien definida entre las diversas especies, pero tuvo que ser abandonada tan pronto como se consiguió el aislamiento en cultivos puros de cada uno de los gérmenes piógenos. ROSENBACH demostró, por medio de cultivos, la presencia constante de estafilococos en ciertas heridas infectadas. Más tarde GARRÉ, KRAUSE y SCHIMMELBUSCH, valiéndose de la experimentación en animales y en el hombre, consiguieron demostrar con toda claridad la significación etiológica de los estafilococos.

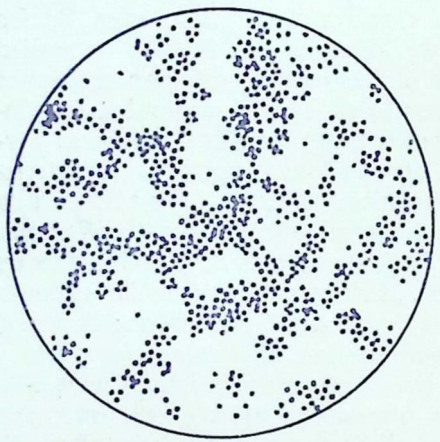


FIG. 60. Estafilococos. Cultivo puro. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

El *staphylococcus piogenes aureus* es el agente piógeno más frecuente; su calificativo de dorado se debe a la facultad que tiene de producir en los cultivos, y en presencia del oxígeno, una substancia de color amarillo de oro. Algunos estafilococos piógenos dan lugar a la producción de un color amarillo de limón en el medio de cultivo, y, en cambio, hay otros que no producen pigmento alguno *(staphylococcus citreus* y *albus)*. La formación de pigmento no es un carácter específico y puede desaparecer en los cultivos viejos de laboratorio. Los cultivos de estafilococo en caldo se enturbian uniformemente. En ellos la gelatina se funde lentamente.

Al examen en gota pendiente y en las preparaciones teñidas, los estafilococos se presentan agrupados en montones irregulares; los gérmenes aislados ofrecen tamaños diversos, pero su medida aproximada es 1 μ de diámetro; los tamaños mayores corresponden

a las formas de desarrollo próximas a la división. El estafilococo piógeno es GRAM positivo.

Los estafilococos pertenecen a la clase de microorganismos que se desarrollan bien en todos los medios de cultivo ordinarios, tanto aerobios como anaerobios. No exigen medios especiales, al contrario de lo que sucede con el gonococo y el meningococo, de los cuales nos ocuparemos luego, que requieren para su desarrollo la adición de albúminas de origen humano a los medios de cultivo. Asimismo la reacción del medio no es factor importante para los cultivos del estafilococo. Le convienen los medios débilmente alcalinos, pero su desarrollo tiene también lugar en los medios débilmente ácidos y en los alcalinos de concentración relativamente alta. Los estafilococos están dotados de una gran resistencia al calor y a otras influencias desfavorables. Sólo mueren con seguridad bajo la acción de temperaturas de 80° sostenidas durante media o una hora. Resisten a la desecación durante meses enteros, y algunas razas de estafilococos ofrecen también bastante resistencia a los desinfectantes químicos; así, por ejemplo, la acción de una solución de sublimado al 1 por 1000, durante media hora, no siempre basta para destruirlos.

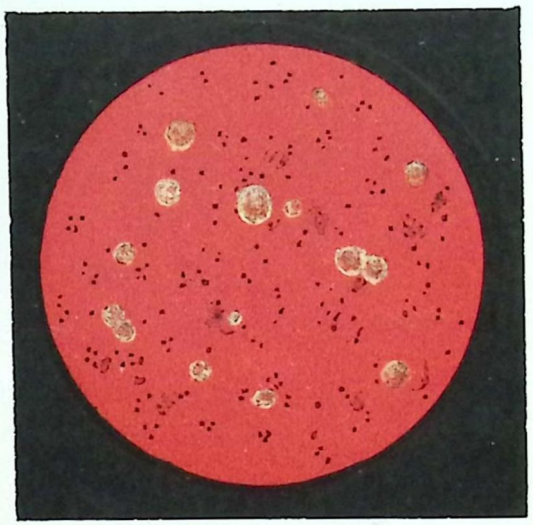


FIG. 61. Estafilococo dorado
Placa de agar-sangre (tamaño natural)

Las siembras en agar presentan, entre las doce y las veinticuatro horas, una capa espesa, viscosa, blanca, o de color amarillo de oro o de limón, según la facultad cromógena de la especie cultivada. En el caldo producen un enturbiamiento uniforme. La gelatina y el suero sanguíneo coagulados se liquidan por la acción de fermentos peptonizantes.

Los estafilococos producen, además, otros fermentos, las hemolisinas, que en los cultivos en caldo se manifiestan a los siete días. Si hacemos pasar uno de estos cultivos de estafilococos a través de un filtro de BERKEFELD, con lo cual queda libre de bacterias, y mezclamos cantidades progresivamente menores de filtrado con una emulsión de glóbulos rojos de carnero, se observará, al cabo de una hora de permanencia en la estufa a 37°, o a las veinticuatro horas en la nevera, una disolución de los glóbulos rojos, mayor o menor según

la cantidad del filtrado empleada (prueba cuantitativa de las hemolisinas según NEISSER). De un modo mucho más sencillo se comprueba la existencia de hemolisinas por la aparición en una placa de agar-sangre de halos claros alrededor de las colonias desarrolladas.

En los exudados a que dan origen las infecciones estafilocócicas, demostró VAN DE VELDE la presencia de un fermento disolvente de los leucocitos, fermento que consideró como un producto de secreción de los estafilococos. Puede observarse al microscopio cómo los leucocitos bajo la acción de este fermento, pierden desde luego sus movimientos, se hinchan después y, por último, se disgregan por completo. M. NEISSER emplea para la demostración de este fermento, llamado leucocidina, el método bioscópico, que se funda en el hecho de que los leucocitos mezclados con azul de metileno pierden su poder reductor normal sobre la materia colorante a consecuencia de la acción nociva de la leucocidina.

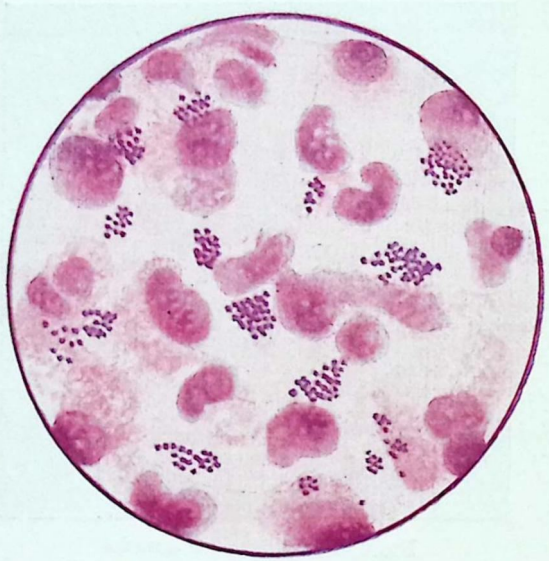


FIG. 62. Pus con estafilococos. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

Es muy digno de notarse que los dos fermentos que acabamos de citar se forman en gran cantidad, lo mismo por las razas de estafilococos procedentes del pus, que por los estafilococos que tienen una existencia latente en la piel y en la mucosa respiratoria. Estos últimos son considerados como variedades atenuadas del estafilococo piógeno, y presentan también por ello diferencias respecto a la aglutinación. La prueba de la virulencia de los estafilococos se realiza por la investigación en animales, especialmente por la inyección intravenosa en los conejos, que da lugar a la formación de abscesos, particularmente en los riñones; la inoculación directa en la articulación de la rodilla produce una artritis purulenta. También se han demostrado los efectos piógenos de los estafilococos en el hombre (friccionando la piel sana con cultivos virulentos, se han originado pústulas de acné y forúnculos).

2. Estreptococos piógenos (Streptococcus pyogenes)

Los estreptococos desempeñan un papel de importancia en la patología humana, a causa de las numerosas enfermedades a que dan origen, no sólo como agentes únicos de determinadas manifestaciones morbosas, sino también por su asociación a otras infecciones. Los estreptococos producen supuraciones agudas y abscesos, y son los agentes de la erisipela, de la endometritis puerperal y de la septicemia, y causan con frecuencia la piemia, la osteomielitis y la endocarditis séptica. Las infecciones estreptocócicas secundarias se presentan especialmente en la escarlatina, viruela, reumatismo articular, difteria, tuberculosis pulmonar, tifus exantemático y otras enfermedades. Gracias al descubrimiento de estos gérmenes por RINDFLEISCH, KLEBS y BILLROTH en las heridas supuradas, y por OGSTON, FEHLEISEN y ROSENBACH en la erisipela, pudo demostrarse el estrecho parentesco existente entre estas infecciones piógenas de curso clínico tan distinto.

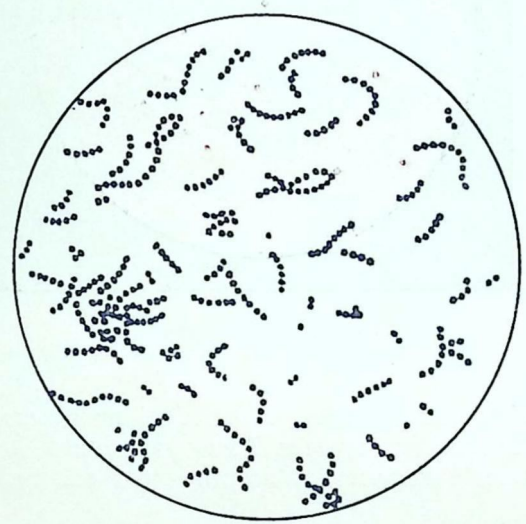


FIG. 63. Estreptococos. Cultivo en caldo Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

Los estreptococos son GRAM positivos y forman cadenas más o menos largas, cuyos elementos algunas veces son alargados y de distintas dimensiones.

La formación de cadenas, característica en los estreptococos, se observa especialmente en los cultivos en caldo; en medios sólidos, a menudo, en lugar de formar cadenas, aparecen agrupados en montones.

El estreptococo se desarrolla perfectamente a temperaturas de 30° a 37° y en medios de reacción débilmente alcalina; algunas razas son anaerobias. No liquida la gelatina. En agar, la mayor parte de las razas forman colonias pequeñas, delgadas, no confluentes, de color gris azulado por transparencia, con el centro granuloso y los bordes transparentes, lisos o filamentosos; en agar con sangre de conejo se observa un halo claro alrededor de las colonias, debido a la acción de un fermento hemolítico producido por el germen. De todas estas características del *streptococcus longus*, que ofrece cadenas de ocho y más eslabones, se apartan algunas razas, ya sea for-

mando cadenas cortas *(streptococcus brevis)*, ya sea demostrando otras propiedades en los medios de cultivo ; así, por ejemplo, el *streptococcus viridans* produce, en el agar con sangre, un pigmento verde por transformación de la hemoglobina ; otras razas *(streptococcus mucosus)* se distinguen por su desarrollo mucoso en los medios sólidos, y por la formación de cápsulas en los animales. También en los cultivos en caldo se observan diferencias entre unas y otras razas ; el *streptococcus conglomeratus* forma gruesos copos en el fondo del tubo, quedando el resto del caldo claro, mientras que otras razas enturbian uniformemente el medio. Pero todas estas diferencias casi nunca son lo suficientemente constantes para que admitamos diversas especies. La mayor parte de los bacteriólogos son unicistas a este respecto, y aceptan que solamente se trata de diversidad de razas y variedades de una misma especie.

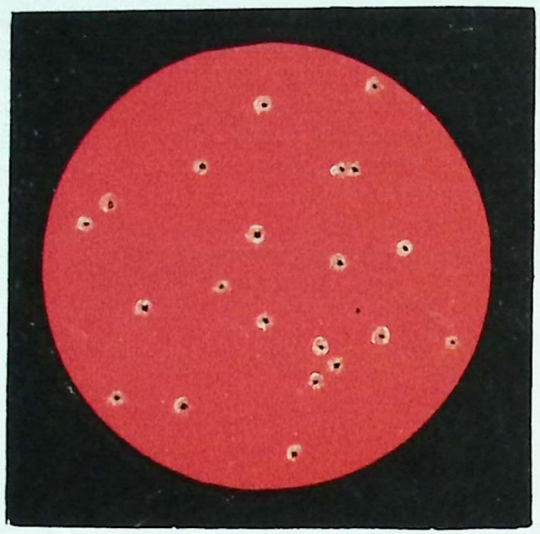


Fig. 64. Placa de agar-sangre
Estreptococo hemolítico (Tamaño natural)



Fig. 65. Estreptococos del pus. Coloración de Gram (aumento 1 : 500)

También la virulencia varía mucho de unas a otras razas. Para los experimentos en animales se utilizan especialmente los conejos y los ratones blancos. Algunas razas poseen una virulencia tan extraordinaria, que basta la inyección intravenosa de los pocos individuos contenidos en una millonésima de centímetro cúbico de cultivo en caldo para matar al animal. La determinación indirecta de la virulencia respecto al organismo humano puede hacerse, según Bürgers, por el comportamiento del estreptococo frente a la actividad fagocitaria de los leucocitos, por la cual los gérmenes virulentos son fagocitados en mucho menor grado que los avirulentos. Estos últimos se encuentran en las mucosas de las vías respiratorias de la mayoría de personas sanas ; tales epifitos, ordinariamente inofensivos, pueden originar infecciones mixtas o secundarias tan pronto como una infección (escarlatina, difteria) u otra causa cualquiera (traumatismo, enfriamiento) disminuyan la resistencia normal del organismo.

El estreptococo determina también supuraciones en los animales, según se ha observado especialmente en las inflamaciones de las mamas en los animales lecheros, en cuyo caso pueden verse en el sedimento de la leche los estreptococos junto a los leucocitos polinucleares. Las relaciones de parentesco entre el *streptococcus lactis* y los bacilos lácticos han sido ya mencionadas. Existen también, por otra parte, relaciones de parentesco entre algunas razas de estreptococos y el neumococo (véase el apartado siguiente). La mayor parte de los estreptococos son bastante resistentes a las influencias exteriores, aunque no en tan alto grado como los estafilococos.

3. Neumococo (diplococcus lanceolatus)

A Eberth se debe la primera demostración microscópica indudable de este germen en el infarto pulmonar y en la pleura y piamadre, inflamadas, de un caso de neumonía. Este autor describió ya la agrupación en parejas de este coco. Posteriormente, R. Koch, Friedlander y otros demostraron también su presencia en cortes de pulmones procedentes de casos de neumonía. Cuando Koch dió a conocer sus procedimientos de cultivo de bacterias, Friedlander, A. Fraenkel y Weichselbaum intentaron la obtención de cultivos del microorganismo descubierto en la neumonía. Friedlander consiguió aislar un bacilo capsulado (bacilo de Friedlander) por medio de cultivos en gelatina a la temperatura ambiente, o sea en condiciones desfavorables al crecimiento del neumococo. Fraenkel y Weichselbaum, con cultivos en la estufa a 37°, procedentes de siembras de esputos, pulmones, sangre, bazo, peritoneo y meninges de diversos casos neumónicos, consiguieron aislar un germen que por su agrupación en parejas y por su forma de lanceta se le llamó «diplococo lanceolado» y fué considerado como el agente específico de la neumonía crupal, por lo que se le designó también, para abreviar, con el nombre de neumococo (Fraenkel-Weichselbaum). Además de este germen, pueden también provocar procesos neumónicos el bacilo de la gripe, el de la peste, los estreptococos y el diplobacilo de Friedlander, pero todos estos procesos se diferencian del cuadro clínico propio de la neumonía crupal.



Fig. 66. Neumobacilo del ratón.
Coloración de cápsulas (aumento 1 : 500)

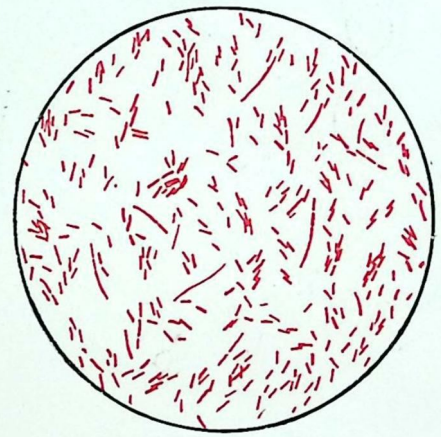


Fig. 67. Neumobacilo de Friedlander. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

Los neumococos se encuentran, como agentes infecciosos latentes, en la saliva de casi todas las personas sanas, y desempeñan un

papel de importancia en la patogenia de algunas artritis purulentas, abscesos cerebrales, meningitis, otitis y endocarditis, así como también en ciertas complicaciones consecutivas a las afecciones inflamatorias pulmonares. Del mismo modo que el estreptococo, puede también el neumococo producir una septicemia si el germen llega a penetrar en el torrente circulatorio. En algunos casos, además, se ha encontrado el neumococo en ciertas formas de conjuntivitis, y como agente causal de las úlceras serpiginosas de la córnea.

El aspecto característico del neumococo en las preparaciones hechas con esputo o pus neumocócico, o con sangre o jugo de órganos de animales infectados con este germen, es el siguiente:

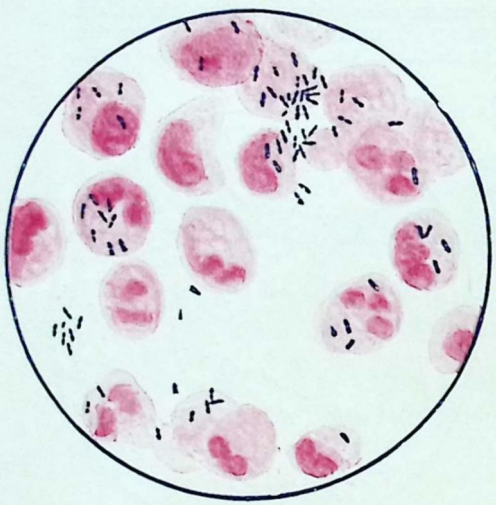


FIG. 68. Neumococos (Pus). Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

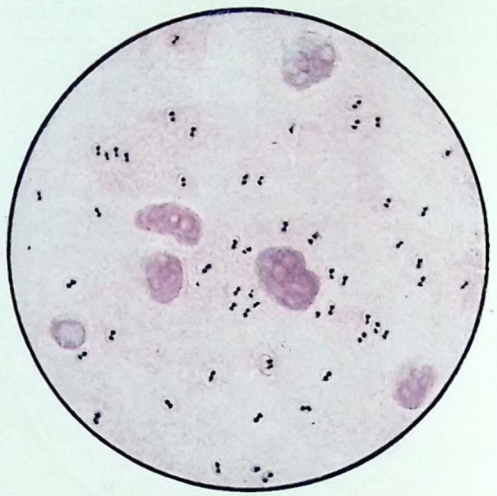


FIG. 69. Neumococos. Frotis de sangre de ratón. Coloración de cápsulas (aumento 1 : 500)

Aparecen agrupados por parejas de forma oval o con su extremo externo algo más agudo, semejando una lanceta o llama de bujía; rara vez forman cadenas cortas de cuatro a seis elementos. Las parejas o las cadenas están rodeadas de un halo claro, el cual permanece incoloro con las anilinas usadas ordinariamente en la coloración, pero que puede hacerse claramente visible valiéndonos de los métodos empleados para la coloración de cápsulas (véase pág. 16). El neumococo es GRAM positivo, y con este método de coloración se obtienen preparaciones muy demostrativas, especialmente en los cortes.

El neumococo observado en preparaciones hechas a partir de los medios de cultivo, tiene un aspecto bastante diferente del germen procedente del organismo animal. Es muy difícil diferenciar morfológicamente las preparaciones de neumococos, obtenidas de cultivos en caldo, de las de estreptococos cultivados en este mismo medio,

pues en tal caso los neumococos aparecen también, la mayoría de veces, formando cadenas. En las preparaciones de cultivos en agar se observan también formas muy distintas, unas como diplococos, otras como estreptococos; en algunas parejas, el neumococo presenta la forma lanceolar, en otras es redondo. Además, en los medios de cultivo casi nunca se observa la formación de cápsulas, o, si se observa, es de una manera imperfecta. Unicamente puede verse la formación de cápsulas, con bastante claridad, mediante cultivos en suero o en leche.

Según NEUFELD, existen variedades de neumococos que tampoco forman cápsulas en el organismo de los animales, y que, además, de-

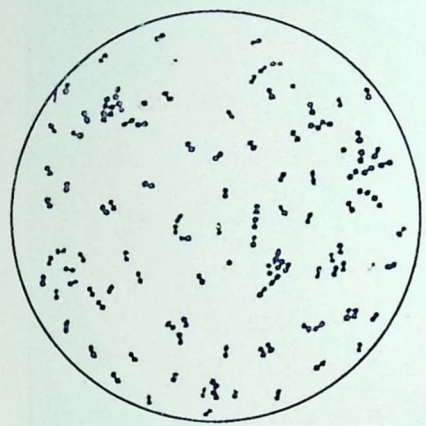


FIG. 70. Neumococos. Cultivo puro. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

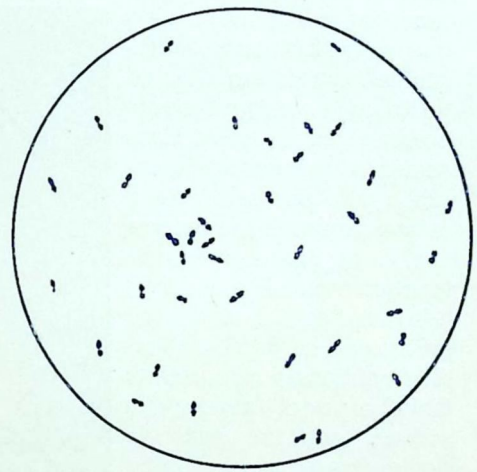


FIG. 71. Neumococos. Cultivo en caldo. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

muestran sus caracteres atípicos en el hecho de que en la experimentación en animales no son influídas por el suero específico obtenido con neumococos típicos. Estas variedades atípicas sólo se encuentran muy raras veces como agentes patógenos del hombre.

Por lo que se refiere a los medios de cultivo, los neumococos son bastante más exigentes que los estreptococos piógenos. Los medios más convenientes son los adicionados de suero o de sangre. En el agar ordinario, el neumococo da lugar, a las veinticuatro horas de permanencia en la estufa a 37°, a la formación de finas colonias transparentes, pequeñas, como gotas de rocío, que al examen microscópico, con débiles aumentos, presentan un centro finamente granuloso y un borde circular bien limitado. Algunas veces el borde de la colonia ofrece un aspecto regularmente ondulado.

El caldo (el mejor caldo es el preparado con cubos de albúmina) se enturbia uniformemente y en el fondo se deposita un sedimento coposo. En el agar con sangre, el neumococo da lugar a la formación de un pig-

mento verde obscuro, y no produce hemolisis. Las colonias superficiales y brillantes aparecen verdosas y, todo lo más, del tamaño de la cabeza de un alfiler. Puede conseguirse la desaparición del pigmento, cultivando el neumococo a baja temperatura (22°). En los cultivos en caldo, adicionado de sangre, a las veinticuatro horas y a 37°, se observa también una manifiesta coloración verdosa, sin producción de hemolisis. El *diplococcus lanceolatus* se comporta en los medios con sangre exactamente lo mismo que el *streptococcus mitior* o *viridans*, del cual apenas es diferenciable por los cultivos. Sin embargo, según Neufeld, se consigue llegar a una segura diferenciación de los estreptococos patógenos y de los neumococos adicionando bilis a los cultivos. La bilis no sólo mata los neumococos virulentos, sino que, en corto tiempo, los disuelve completamente, en tanto que los estreptococos permanecen intactos. Esta acción se debe al ácido colálico y a sus sales. Para esta experiencia, se mezcla 1 c. c. de una solución de taurocolato sódico al 10 % (Merck) con 1 c. c. de cultivo en caldo. También el *streptococcus mucosus* es disuelto por el taurocolato sódico, con lo cual se demuestran nuevamente las relaciones de parentesco que existen entre ambas especies.

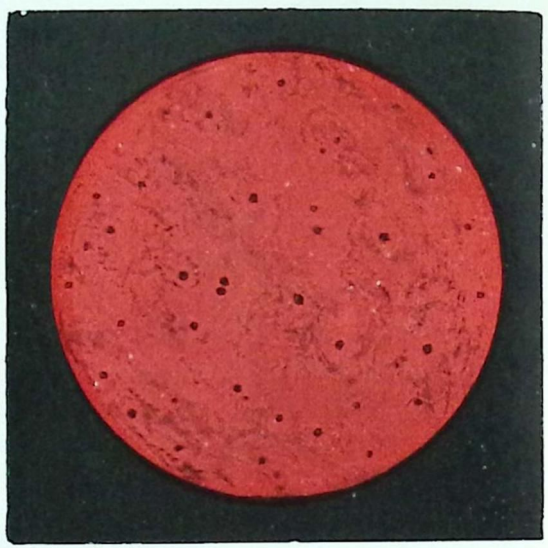


Fig. 72. Neumococos en placas de agar-sangre. (Tamaño natural)

Los estreptococos y los neumococos pueden también diferenciarse entre sí por medio de la optoquina o etilhidrocupreína, que es un derivado de la quinina (Morgenroth). La optoquina ejerce una acción bactericida electiva sobre los neumococos, y por esto se emplea con resultado en el tratamiento de las afecciones neumocócicas. En diluciones al 1 : 100 000 impide el desarrollo del neumococo, mientras que no ejerce acción sobre el estreptococo. Existen, sin embargo, ciertas variedades de neumococos que se comportan como tales en la experimentación en animales y en las placas de agar con sangre; pero, en cambio, se asemejan a los estreptococos por su comportamiento con respecto a la optoquina y al taurocolato sódico. Probablemente estas variedades constituyen un estado de transición entre los neumococos y los estreptococos.

El neumococo es muy poco resistente a la influencia de los agentes exteriores. El calor por encima de 52° y todos los desinfectantes

corrientemente empleados lo destruyen, a lo sumo, en diez minutos. La desecación de masas espesas de productos patológicos conteniendo albúmina, como esputos o sangre, al constituir una costra de albúmina desecada, que envuelve los gérmenes, favorece la conservación del neumococo, que de este modo se mantiene vivo y virulento durante meses. Fundándose en esto, resulta práctico conservar los trozos de órganos o la sangre de animales (ratones blancos) muertos de infección neumocócica, recogiéndolos asépticamente en tubos estériles, herméticamente cerrados, después de haber sometido dichos productos al desecador. De este modo llega a mantenerse la virulencia del germen durante un año, mientras que dicha virulencia desaparece rápidamente en los cultivos. La virulencia puede sostenerse también por el paso del germen en los animales.

Para la investigación ordinaria de las infecciones neumocócicas, se utilizan especialmente los conejos y los ratones blancos. En estos animales se consigue provocar una septicemia por inoculación subcutánea o intravenosa, de muy pequeñas cantidades de cultivos, en caldo-suero (basta a veces una millonésima de centímetro cúbico) que determina la muerte del animal en pocos días. Por inoculación subcutánea en el conejo puede demostrarse la existencia del neumococo en la saliva de casi todos los individuos sanos.

El origen de la neumonía en el hombre se debe, indudablemente, a la autoinfección determinada por causas accidentales, como traumatismos o enfriamientos. Por esto, generalmente, la neumonía franca en el hombre no es contagiosa de una manera directa; por excepción, se ha observado alguna vez verdadero contagio de un pequeño grupo de enfermos. En este caso, no tratándose de una infección producida por otro germen completamente distinto, el contagio fué debido, quizá, a la virulencia especial del neumococo. Hasta hoy no se han descubierto toxinas solubles de este germen. Klemperer primero, y más tarde, particularmente, Römer consiguieron preparar un suero antineumocócico eficaz en la neumonía del hombre. Los trabajos de Neufeld y sus colaboradores nos han dado la explicación de la manera de actuar este suero. El suero no tiene acción antitóxica ni bactericida directa, sino exclusivamente bacteriotrópica, es decir, que por la acción del suero las bacterias sufren modificaciones que facilitan su presa y destrucción por los leucocitos (véase pág. 87).

4. Gonococo

El gonococo fué descubierto por Neisser en el año 1879 en el pus blenorrágico. Bumm obtuvo cultivos puros, cuya inoculación en la uretra humana determinó la blenorragia, con lo cual quedó establecida, de una manera indudable, la significación etiológica del germen.

El gonococo es un diplococo que presenta la forma de bollo, de riñón, de grano de café o de habichuela, y dispuesto de tal modo que las superficies adyacentes de los cocos son las aplanadas, mientras

que la superficie libre es la convexa. Con frecuencia se observan, después de la división de los gérmenes, agrupaciones también características constituídas por cuatro elementos reunidos en forma de tetrada. Un carácter distintivo del gonococo es su situación intraprotoplásmica en los glóbulos de pus ; sin embargo, se observan también muchos gérmenes fuera de dichos glóbulos. Esto se nota, especialmente, al principio de la blenorragia, cuando la secreción es mucosa en su mayor parte, y faltan aún, por consiguiente, los glóbulos de pus ; entonces se observa, a menudo, que los gonococos yacen sobre las células epiteliales, pero también fuera de ellas. En la secreción purulenta reciente predomina la situación intracelular de los diplococos, en tanto que más tarde, sobre todo en las afecciones ya crónicas, es muy rara la presencia de gérmenes. En estos casos los gonococos se encuentran casi siempre fuera de las células, y lo mismo ocurre al examinar los filamentos mucosos de la orina.

Se consiguen preparaciones muy características con la solución de azul de metileno corrientemente empleada (un minuto) ; los gonococos se colorean con mayor intensidad que cualquiera otra formación que contenga cromatina ; como consecuencia de esto, el azul obscuro con que aparecen teñidos resalta, con toda claridad, en el azul claro del protoplasma de las células. Sin embargo, esta sencilla coloración no ofrece un valor diagnóstico decisivo, puesto que existen saprofitos inofensivos que dan lugar a un aspecto completamente semejante.

El comportamiento del gonococo con la coloración de GRAM, tiene valor diagnóstico diferencial, pues al contrario de lo que sucede con los demás cocos hasta ahora mencionados, no se tiñe por este método, pero puede obtenerse una coloración de contraste en color rojo mediante la fucsina. El diagnóstico diferencial entre el meningococo y el gonococo ofrece dificultades, ya que ninguna diferencia existe entre ambos gérmenes con respecto a la coloración de GRAM y con frecuencia se observa en uno y otro la situación intracelular. Esta diferenciación puede ser necesaria en algunas infecciones generalizadas graves ; en estos casos recurriremos al empleo de métodos de cultivo y serológicos auxiliares, tales como los medios azucarados de v. LINGELSHEIM, de los cuales nos ocuparemos al tratar del meningococo (pág. 172), la reacción de aglutinación con sueros meningocócicos de alto poder aglutinante, y, en ocasiones, la reacción de fijación del complemento.

Otro procedimiento de doble coloración, que con los gonococos proporciona preparaciones extraordinariamente demostrativas y ricas de contraste, es el debido a PAPPENHEIM. En este procedimiento se emplean dos colorantes básicos, de los cuales el uno es electivo para las células y tiene escasa afinidad para las bacterias (verde de metilo), y el otro, en cambio, muestra electividad para las bacterias (pironina).

La composición de esta mezcla colorante es la siguiente :

Solución concentrada de verde de metilo en solución fenicada al 5 %, 2 partes
Solución concentrada de pironina en solución fenicada al 5 %, 1 á 3 partes

Coloreando durante tres minutos aparecen los gonococos en rojo brillante, y los núcleos celulares en lila o azul verdoso.

En algunas preparaciones se observan, a veces, junto a las formas típicas de los gonococos, otras más gruesas con ligera tendencia a la segmentación, y otras aún mayores y desiguales, que son verdaderas formas de involución.

El gonococo se desarrolla con dificultad en los medios de cultivo. En el agar ordinario, la gelatina y el caldo, no se desarrolla ; para su crecimiento necesita albúmina sin coagular en cualquiera forma ; la preferible es la albúmina humana. Pueden también emplearse, con

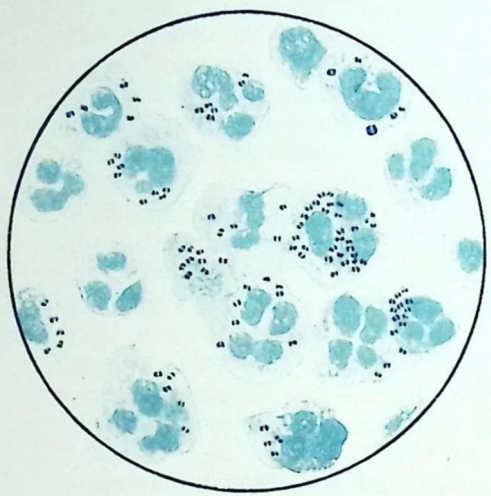


FIG. 73. Gonococos. Coloración con solución de azul de metileno (aumento 1 : 500)

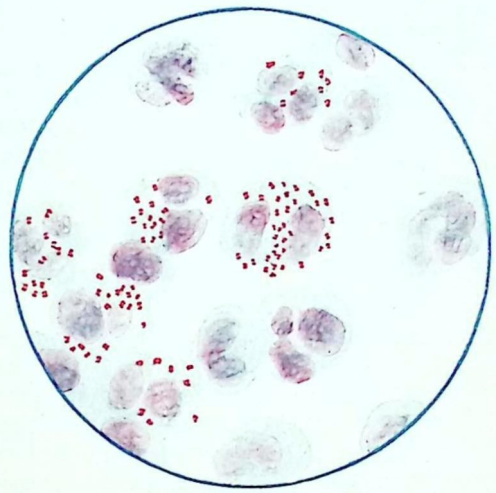


FIG. 74. Gonococos. Secreción uretral. Coloración de PAPPENHEIM (aumento 1 : 500)

buen resultado, el agar o el caldo adicionado de líquidos orgánicos albuminoideos, tales como el ascítico, el exudado pleural, etc.

Las colonias desarrolladas en estos medios son redondas, en forma de gotas de rocío, con el borde ligeramente dentado y el centro obscuro. Aparecen opacas y viscosas.

El gonococo es poco resistente a la influencia de los agentes exteriores. La temperatura de 45° le destruye ya en pocos segundos. Del mismo modo actúan sobre él los medicamentos empleados localmente en el tratamiento de la blenorragia, especialmente las sales de plata. Asimismo es muy sensible a la desecación.

El gonococo no forma toxinas solubles. Los efectos de la inyección subcutánea de filtrados de cultivos en caldo son determinados por las endotoxinas, o sea por las substancias tóxicas que quedan libres únicamente después de la destrucción de las bacterias.

Al contrario de lo que sucede en los animales, el hombre es muy sensible a la infección del gonococo. Las mucosas, y especialmente la

uretral y la conjuntival, la del útero y de sus anexos, así como la mucosa rectal, constituyen la puerta de entrada para los gonococos. La conjuntivitis blenorrágica del recién nacido, producida por contagio directo en el momento del parto, se combate eficazmente, en la actualidad, por medio de instilaciones preventivas de sales de plata en los fondos de saco conjuntivales inmediatamente después del nacimiento del niño (CREDÉ).

Además de las complicaciones consecutivas a las infecciones gonocócicas, en el hombre: la epididimitis, la infección de las vesículas seminales, de la próstata y de la vejiga ; y en la mujer : las afecciones de los anexos, la endometritis, y a veces, la peritonitis, pueden también presentarse en ambos localizaciones metastásicas tales como la artritis gonocócica, la endocarditis y focos en la médula espinal.

La gonococia no confiere inmunidad y, por consiguiente, poco puede esperarse de la seroterapia. Antes se consideraban los casos crónicos como la prueba de una inmunidad que poco a poco iba estableciéndose ; pero según la opinión actual, esto depende, por una parte, de que en ellos los gonococos han llegado a ser avirulentos, y, por otra, de que las condiciones para la vida de los gérmenes han empeorado a consecuencia de modificaciones ocurridas en las mucosas.

El tratamiento de las afecciones gonocócicas por medio de vacunas de gérmenes muertos (artigón) permite concebir fundadas esperanzas. Casi todas las vacunas gonocócicas conocidas están preparadas con muchas y distintas razas de gonococos.

Una cuestión de no pocas responsabilidades se ofrece al bacteriólogo respecto a la blenorragia ; y es la de determinar con exactitud si una blenorragia clínicamente curada lo está también desde el punto de vista bacteriológico, y si, por consiguiente, puede considerarse al paciente exento ya de ser causa de contagio. Los gonococos, especialmente en el sexo femenino, pueden mantenerse vivos largo tiempo, en estado latente, a pesar de todo tratamiento, en los repliegues de la mucosa y glándulas accesorias de las vías urinarias y genitales. Precisar si en tales casos, aparentemente curados, existen o no gonococos, sólo puede conseguirse mediante exámenes bacteriológicos repetidos y minuciosos, y, en caso de duda, por el hallazgo de diplococos extracelulares aislados y negativos al GRAM, o por la observación de formas de degeneración, recurriendo a los procedimientos de cultivo. En la obtención de productos para los exámenes hay que tener muy en cuenta que también deben investigarse las secreciones de la próstata y de las glándulas accesorias, así como el contenido de las vesículas seminales, secreciones que se obtienen ejerciendo un masaje desde el recto. Es además recomendable, en algunos casos, movilizar los gonococos, que puedan aún existir, por una adecuada provocación (inyecciones uretrales, inyección de artigón, dilatación uretral seguida de masaje, etc.), a fin de hacerlos accesibles al examen.

5. Meningococo

La meningitis contagiosa fué descrita en el año 1805 con motivo de una epidemia habida en Ginebra. En Alemania apareció por primera vez esta enfermedad en el año 1863, durante el cual se extendió desde la Silesia a casi todos los demás Estados alemanes. Posteriormente se publicaron trabajos diversos acerca de la meningitis cerebroespinal epidémica en distintos países de Europa y América. En el año 1904 estalló otra vez una epidemia extraordinariamente intensa en la Alta Silesia y en los territorios limítrofes de la Polonia y de Galitzia: solamente en el territorio alemán hubo 3000 enfermos, y la mortalidad alcanzó el 66 % de los atacados. Más tarde, en los años 1906 y 1907, se presentaron también epidemias intensas en la Alemania occidental, especialmente en las comarcas industriales del Rhin y de Westfalia.

Antes la Medicina carecía de medios terapéuticos contra esta temible enfermedad, pero actualmente es posible combatirla por medio de una seroterapia eficaz.

WEICHSELBAUM, en el año 1887, encontró con regularidad, en los casos de meningitis cerebroespinal, un germen, que denominó *diplococcus intracellularis meningitidis*, el cual consideró como el verdadero germen de la enfermedad. La completa demostración del papel etiológico de este germen, su diferenciación con otras formas afines y la explicación de las circunstancias epidemiológicas fueron el fruto de los numerosos trabajos realizados posteriormente con motivo de las últimas epidemias sufridas en las dos grandes comarcas industriales de Alemania citadas. Además de la enfermedad infecciosa específica originada por el meningococo, o sea la meningitis cerebroespinal epidémica, se observan también otras formas esporádicas de meningitis, causadas por el neumococo, el estreptococo, el bacilo de KOCH y otros microorganismos. El diagnóstico diferencial de estos casos es muy importante, tanto desde el punto de vista de la profilaxis, como en cuanto al tratamiento de la enfermedad, y aquél sólo se consigue por medio del examen bacteriológico, y en ocasiones también, por el examen citológico del líquido cefalo-raquídeo, el cual, en la meningitis cerebroespinal epidémica, demuestra principalmente leucocitos polinucleares, en tanto que en la tuberculosis predominan los elementos mononucleares.

El meningococo se parece mucho al gonococo, tanto por sus caracteres morfológicos como por sus afinidades colorantes ; al igual que el gonococo es GRAM negativo y presenta la forma de diplococo y a veces de tetrágeno. Son características, y esto tiene suma importancia diagnóstica, las grandes diferencias en las dimensiones de los cocos aislados. Junto a pequeños cocos se observan formas gigantes que sobrepasan por su tamaño cinco a ocho veces el tipo ordinario. Se observa, además, que los ejemplares aislados de meningococos se comportan de modo muy distinto ante las substancias colorantes. Al lado de ejemplares perfectamente coloreados existen otros que se tiñen con gran dificultad. Estas formas de degeneración se presentan ya en los cultivos de veinticuatro horas.

Como el meningococo posee escasa resistencia a la acción de los agentes exteriores, deben hacerse los cultivos inmediatamente después de la obtención del producto patológico. Esto se refiere

especialmente cuando se trate de examinar productos procedentes de la rinofaringe, pues en estos casos, si el examen se ha hecho pasado algún tiempo de tomado el material, el resultado es casi siempre negativo. El cultivo del meningococo presenta grandes dificultades por lo exigente que es el germen respecto a los medios ordinarios. En las primeras tentativas casi nunca se consigue su desarrollo en el agar ordinario ligeramente alcalino. Mediante la adición de albúmina no coagulada de origen animal, y mejor aún de albúmina humana, se obtienen cultivos bien desarrollados. Para este fin se emplean ventajosamente el líquido ascítico, el exudado pleural, el líquido cefalo-raquídeo y la sangre o suero, añadidos a los medios de cultivo.

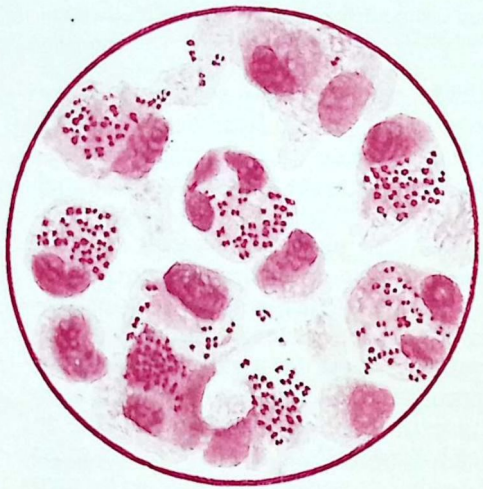


FIG. 75. Meningococos. Pus de punción lumbar. Coloración de GRAM y recoloración con fucsina (aumento 1 : 800)

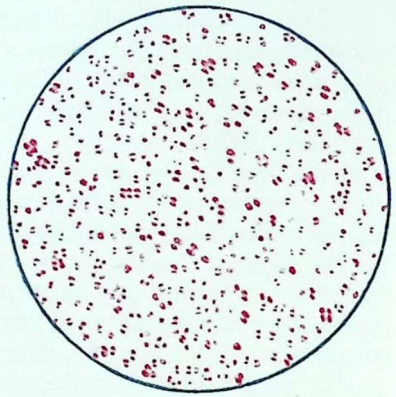


FIG. 76. Meningococos. Cultivo puro. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

Las colonias en agar adicionado de líquido ascítico, son mayores y menos transparentes que las de neumococos o estreptococos, y aparecen como discos redondos, grises por transparencia, homogéneos y húmedos, con el centro elevado y los bordes planos, lisos y ligeramente ondulados.

Para los cultivos se recomienda especialmente el medio de ESCH, compuesto de agar adicionado de líquido ascítico, maltosa y sangre de carnero, o el medio de KUTSCHER, compuesto de agar, adicionado de suero y placenta de vaca.

Los cultivos posteriores se logran particularmente bien en agar con líquido ascítico o en suero de LÖFFLER.

Los cultivos en caldo ascítico enturbian ligeramente el medio y forman un velo fino, que al menor movimiento del tubo cae al fondo.

La temperatura óptima de desarrollo es la de 37°, siendo posible, sin embargo, el crecimiento entre los 25° y los 42°.

Los meningococos son microorganismos extraordinariamente sensibles ; sobre todo los primeros cultivos, intentados con los productos obtenidos del enfermo, son muy difíciles de conseguir, y cuesta mucho conservarlos mientras no se acomoda el germen a los medios de cultivo por siembras muy frecuentes. Y aun a pesar de esto, es fácil que el germen pierda con rapidez su capacidad de desarrollo y muera. La duración de los cultivos es muy limitada, pues sólo resisten de seis a ocho días.

Los cultivos son muy sensibles a la desecación y a la influencia de la luz, hasta el punto de que ésta, aunque sea difusa, es suficiente para perjudicarlos e impedir su desarrollo. La temperatura de 80° los destruye en dos minutos; la de 50° no la soportan más de una hora. Los desinfectantes usuales, aun en soluciones débiles, también los destruyen. En resumen, el meningococo, fuera del organismo humano, no puede desarrollarse ni vivir.

Los meningococos no eliminan toxina soluble de ningún género. Su acción tóxica se debe, por lo tanto, a las endotoxinas, que al ser liberadas, a consecuencia de la destrucción del cuerpo bacteriano, ejercen una acción tóxica.

La acción patógena en los animales es escasa. Entre los animales de laboratorio sólo el cobayo, de vez en cuando, es sensible al meningococo.

Según la experiencia actual, únicamente la cavidad rinofaríngea puede considerarse como puerta de entrada de este germen. A juzgar por las estadísticas epidemiológicas, el tránsito del invierno a la primavera favorece la infección meningocócica a causa de la mayor frecuencia de las afecciones rinofaríngeas en tal época. En los enfermos de meningitis cerebroespinal, los sitios de elección para encontrar los meningococos son : las meninges, el líquido de los ventrículos cerebrales, el líquido cefalo-raquídeo y la cavidad rinofaríngea. A veces se encuentran también en la sangre, especialmente en algunos casos graves con diátesis hemorrágica, que por su aspecto clínico pueden fácilmente confundirse con el tifus exantemático. Se han observado también casos en los que se ha comprobado que el meningococo era el germen causal único de la otitis y la epididimitis.

La investigación del meningococo se lleva a cabo por el examen microscópico directo y por los cultivos.

Con frecuencia es suficiente, para establecer el diagnóstico, el aspecto típico de las preparaciones obtenidas con líquido cefalo-raquídeo purulento, teñidas por el método de GRAM y con coloración de contraste por la fucsina, en las que, junto a leucocitos polinucleares abundantes y linfocitos muy escasos, se encuentran en gran cantidad diplococos negativos al GRAM y situados, la mayor parte de ellos, en el interior de las células. Ante un resultado negativo o dudoso del examen microscópico, es conveniente mezclar el líquido cefalo-raquídeo

con caldo glucosado a partes iguales, y después de mantenerlo veinticuatro horas en la estufa se repite el examen, que suele ser entonces positivo, debido al desarrollo del meningococo durante ese tiempo. En todo caso, antes de dar un informe negativo, hay que esperar a conocer el resultado de las siembras en agar con líquido ascítico. Así mismo, al examinar éstas, hay que tener presente que no todas las colonias de cocos negativos al GRAM, obtenidas de casos de meningitis o de enfermos sospechosos, deben considerarse sin más ni más como de meningococos, sino que antes de dictaminar en este sentido, hay que comprobar su poder de fermentación según el procedimiento de LINGELSHEIM, desde luego y, además, para una diferenciación más exacta, deben hacerse también las pruebas de aglutinación.

En el diagnóstico diferencial del meningococo hay que tener en cuenta el gonococo, el *micrococcus catarrhalis*, que es un poco mayor que el meningococo y que ya en agar ordinario desarrolla colonias espesas de color blanco, y el *diplococcus crassus*, que da resultado positivo en la mayoría de los casos con la coloración de GRAM. En agar ordinario, sus colonias se parecen a las de los estreptococos. Estos cocos, a diferencia del meningococo, no son destruídos por las sales biliares (solución de taurocolato sódico al 2'5 %). Debe tenerse presente, también, la posible confusión con el *diplococcus flavus*, el *micrococcus cinereus* y el *micrococcus pharyngis siccus*.

Los resultados obtenidos por LINGELSHEIM cultivando estos distintos cocos, en medios azucarados a los que se añade solución de tornasol como indicador, van expuestos a continuación :

	Poder de fermentación		
	Dextrosa	Levulosa	Maltosa
Gonococos	+	—	—
Meningococos	+	—	+
Diplococcus crassus	+	+	+
» *phar. flavus* III	+	—	+
Micrococcus catarrhalis	—	—	—
» *cinereus*	—	—	—

Para poder formar un juicio definitivo es preciso que los cultivos, que según el cuadro anterior deben considerarse como meningococos, sean aglutinados por un suero específico en diluciones elevadas. La aglutinación de los meningococos con el suero específico no suele observarse antes de las veinticuatro horas. La temperatura óptima de la reacción es la de 55°.

La acción curativa del suero antimeningocócico no radica en este poder aglutinante, y tampoco el efecto bactericida del suero parece intervenir en ella ; más bien parece tratarse en este caso, como en el del suero antineumocócico, de un efecto bacteriotrópico. Para lograr el efecto curativo, el suero debe administrarse lo antes posible a grandes dosis y en inyección intra-raquídea.

Según algunas estadísticas, gracias a la seroterapia, la mortalidad por meningitis ha descendido de 67'7 % a 20'7 %. Las inyecciones de suero deben repetirse con frecuencia. Cuando se presentan complicaciones, o en casos de infección mixta, o cuando la enfermedad se halla ya en un período avanzado no son de esperar grandes resultados de la misma.

Para la epidemiología de la infección es de gran importancia el hecho de que existan más o menos personas próximas al enfermo, que alberguen meningococos en la faringe nasal, aun cuando clínicamente parezcan completamente sanas o sólo noten pequeñas molestias propias de un coriza o anginas. Para descubrir estos «portadores de cocos» se procurará obtener un poco de secreción de la faringe nasal, recogida a nivel de la cara posterior del velo del paladar por medio de una bolita de algodón colocada en el extremo de una sonda curva ; esta secreción debe sembrarse inmediatamente en placas de agar con líquido ascítico; el análisis de productos enviados de puntos distantes no sirve para este objeto (véase pág. 169).

6. Micrococcus tetragenus

El *micrococcus tetragenus*, clasificado por algunos autores entre los estafilococos y por otros entre las sarcinas, se caracteriza por su típica agrupación, pues siempre aparecen cuatro cocos unidos en grupo. El *micrococcus tetragenus* se distingue de los *staphylococcus piogenus* por su mayor tamaño, así como por sus caracteres en los cultivos y por formar cápsulas. El *micrococcus tetragenus* se desarrolla en todos los medios ordinarios, en forma de capas de aspecto aporcelanado brillante y viscosas. No liquida la gelatina. A las veinticuatro horas de la siembra en caldo, éste se enturbia, se vuelve granuloso y se produce un sedimento abundante, de una manera semejante a lo que sucede con las sarcinas.

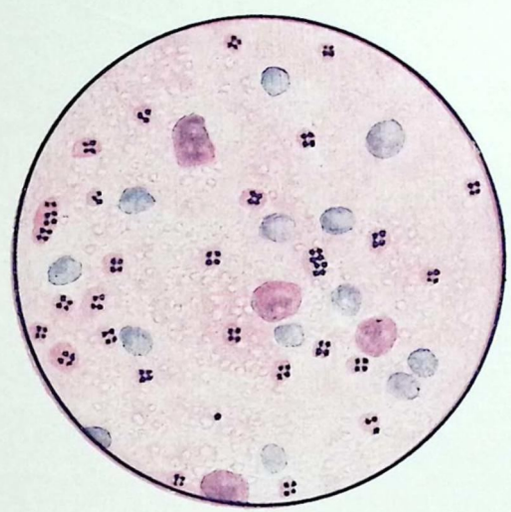


FIG. 77. *Micrococcus tetragenus*. Sangre de ratón. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

La formación de cápsulas puede observarse a veces en los cultivos en caldo, pero más especialmente en el organismo de los animales. La coloración de las cápsulas se logra fácilmente por el método de JOHNE. También en este caso aparece la cápsula casi incolora, mientras que las bacterias fijan y retienen fácilmente la substancia colorante (véase pág. 16).

El *micrococcus tetragenus* es patógeno para el cobayo y el ratón blanco, pero no para el gris. Los animales perecen por la gran multiplicación de los gérmenes inoculados.

El *micrococcus tetragenus* rara vez produce enfermedad en el

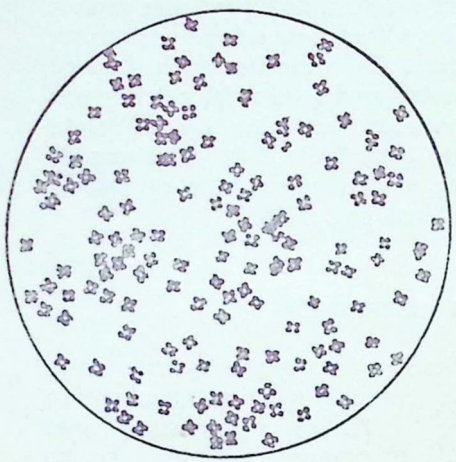


FIG. 78. *Micrococcus tetragenus.* Cultivo puro. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

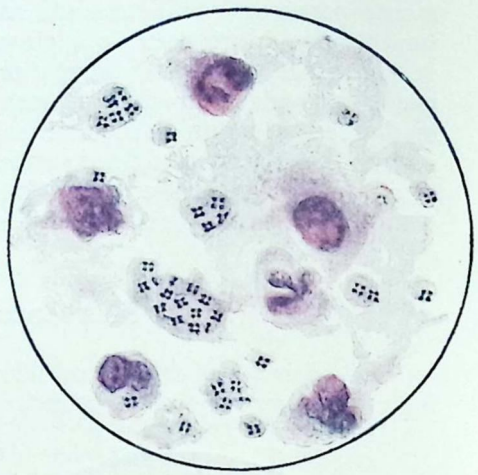


FIG. 79. *Micrococcus tetragenus.* Sangre de ratón. Coloración de cápsulas (aumento 1 : 500)

hombre. Se encuentra como saprofito en la boca y en la mucosa nasal. Se observan infecciones mixtas de tetrágeno y de estafilococo blanco en las cavernas tuberculosas y de tetrágeno en casos de bronconeumonía y sarampión.

7. Sarcinas

A manera de apéndice citaremos aquí las sarcinas, que con frecuencia se encuentran en el aire y que aparecen como contaminación fortuita de los medios de cultivo. El desarrollo y multiplicación de estos gérmenes se verifica de una manera regular en las tres direcciones del espacio, perpendicularmente entre sí. Las células hijas persisten unidas, observándose por ello formas semejantes a fardos de mercancías, que a su vez pueden reunirse en paquetes aún mayores. En gota pendiente, las sarcinas se observan rodeadas de un halo tenue. Se tiñen fácilmente con los colores de anilina corrientes, y toman el GRAM.

La mayor parte de las especies carecen de movimiento propio ; en cambio, presentan un movimiento molecular muy vivo. Esto no obstante, se han descrito sarcinas, con movimiento propio, que tienen de 1 a 4 flagelos.

En los cultivos, la mayor parte de las sarcinas forman un pigmento amarillo o rojo, y por ello se distinguen las variedades, *lutea*, *flava*, *erythromyxa*, *aurantiaca*, *rosea*, *cervina*, *alba* y *rubra*. El crecimiento de las sarcinas en medios líquidos o sólidos presenta grandes diferencias ; hay sarcinas que liquidan la gelatina, y otras que no la liquidan.

No se conocen, hoy por hoy, agentes morbosos entre las sarcinas ; éstas se encuentran a veces, en grandes cantidades, en el jugo gástrico.

II. Bacilos patógenos

Por lo que se refiere a las numerosas especies de bacilos patógenos, no es posible establecer una clasificación natural, fundada en un principio tan sencillo como hemos hecho para los cocos, es decir, según las agrupaciones morfológicas dependientes de la división de las células. La clasificación de las distintas especies de bacilos no puede hacerse únicamente desde el punto de vista morfológico ; sin embargo, la presencia o la falta de verdaderos esporos permite desde luego establecer una división en dos grandes grupos: con esporos y sin esporos. Dentro de estos dos grupos principales, y especialmente dentro del más numeroso y variado de los no esporógenos, se establece la diferenciación en familias y especies, valiéndose, no sólo de los caracteres morfológicos, sino también de los biológicos, como : la movilidad, el resultado de la coloración de GRAM, la resistencia a los ácidos, su poder de fermentación y sus efectos patógenos.

A veces, el desarrollo filogenético tiene lugar según dos series independientes, casi uniformes, de modo que aparecen grupos paralelos, que aun cuando son de origen distinto y están separados por una diferencia característica, ofrecen, sin embargo, gran semejanza. Este es el caso por un lado, del grupo tífico, paratífico y de GARTNER, afines del *bacterium coli*, cuyas especies están dotadas de movimiento, y por otro, del grupo de la disentería que con todas sus especies, faltas de movimiento, es afín del *bacillus lactis aerogenes*. Tanto ambas especies filogenéticas primitivas como los dos grupos derivados de ellas son extraordinariamente semejantes entre sí.

Los bacilos que no forman esporos, mantienen relaciones naturales de parentesco en diversos sentidos con otras especies de microorganismos ; así el grupo del *bacillus lactis aerogenes* es muy afín de ciertos estreptococos, y el grupo del *bacillus proteus*, en el cual no hay agentes morbosos, pero influye en la putrefacción, guarda relación, por una parte, con el *bacterium coli* y los cromógenos y, por otra, con los vibriones. Finalmente, la propiedad de la ramificación, que presenta ya el bacilo de la peste y demás del grupo de las septicemias hemorrágicas, afines también del *bacillus lacticus aerogenes*, nos lleva a los estreptotrices, pasando por especies de orden elevado, tales como el bacilo del muermo y los bacilos ácido-resistentes.

Es de notar que todos los bacilos pertenecientes a estos grupos tan distintos (bacilo de la peste, del muermo, de la tuberculosis y estreptotrices) ofrecen, sin embargo, la propiedad común de producir en el organismo localizaciones particulares en forma de tubérculo.

Basándose en todos estos puntos de vista, es posible ofrecer una clasificación natural de las numerosas especies de bacilos patógenos, como sigue :

A. Esporógenos

I. *Aerobios :*

1. Sin movimiento : bacilo del carbunco.
2. Con movimiento : bacilos peptonizantes (productores de toxinas en la leche, del grupo del bacilo del heno o *bacillus subtilis).*

II. *Anaerobios obligados :*

1. Con esporos terminales, bacilo del tétanos.
2. Con esporos centrales.

a) Verdaderos agentes morbosos. Germen de la gangrena gaseosa. Bacilo del edema maligno. — Infección en animales : Carbunco sintomático.

b) Productores de toxinas. *Bacillus botulinus.*

B. No esporógenos

1. Cromógenos.
   Bacilo piociánico.
2. Derivados del *bacterium coli* : grupo tífico.
   Bacilo de la fiebre tifoidea.
   » paratíficos A y B.
   » de la enteritis (GARTNER).
   Bacterium coli.
   Bacillus faecalis alcaligenes.
3. Derivados del *bacillus lactis aerogenes:* grupo de la disentería.
   Bacilo de KRUSE-SHIGA.
   Diversos tipos de bacilos seudodisentéricos.
4. Derivados del *bacillus lactis aerogenes:* bacilos capsulados patógenos.
   Bacilo neumónico (FRIEDLANDER).
   » del ocena (ABEL).
   » del rinoescleroma.
5. Derivados del *bacillus lactis aerogenes :* grupo de las septicemias hemorrágicas.
   Bacilo de la peste.
   Gérmenes afines de epizootias.
6. Grupo de bacilos hemoglobinófilos.
   Bacilo de la gripe.
   Bacillus *pertussis convulsivus.*
   Bacilo de la conjuntivitis (KOCH-WEEKS).
7. Grupo del mal rojo del cerdo y de la septicemia de los ratones.
8. Bacilos que actualmente no se pueden colocar con certeza en la clasificación natural.
   Diplobacilo de la conjuntivitis (MORAX-AXENFELD).
   Estreptobacilo del chancro blando (DUCREY).
   Bacillus melitensis.

9. Diftéridos.
   Bacilo de la difteria.
   » del muermo.
10. Bacilos ácido-resistentes.
    Bacilo de la tuberculosis.
    » » » lepra.

1. Bacilo del carbunco (bacillus anthracis)

El tipo clásico de un microorganismo patógeno es el bacilo del carbunco (*bacillus anthracis*; antrax = carbón), así llamado por el color obscuro que ofrece el bazo enfermo.

EILERT, en 1836, y GERLACH, en 1845, pudieron comprobar que la sangre de un animal enfermo del bazo, inoculada o administrada con el pienso a otro animal, le producía la misma enfermedad. DAVAINE y RAYER, en 1850, y POLLENDER, en 1855, lograron reconocer en la sangre del animal atacado de carbunco las formas de bastoncito características del germen de esta infección. Diez años más tarde, consiguió DAVAINE demostrar que la inyección de sangre muy diluída conteniendo estos bacilos, producía la afección carbuncosa. Experimentos más completos realizados más tarde por COHN demostraron el carácter bacteriano de estos bacilos. R. KOCH, en 1876, fué el primero que logró el cultivo de los mismos y detalló además sus propiedades morfológicas y biológicas, proporcionando nuevas orientaciones al estudio de las enfermedades infecciosas.

El bacilo del carbunco es un bastoncillo grueso, inmóvil y de unas 5 a 12 μ de longitud por 1 a 1'5 μ de espesor, con los extremos marcadamente planos, que en los líquidos del organismo forma cadenas cortas y en los cultivos constituye agrupaciones igualmente en cadenas, pero más largas.

El animal más empleado, tanto en los experimentos didácticos como en el diagnóstico del carbunco, es el ratón blanco, que muere a los pocos días de la inyección subcutánea de una pequeñísima cantidad de material infeccioso ; en cada gota de sangre o de líquido obtenido de los tejidos del animal muerto, se comprueba la presencia de gran número de bacilos del carbunco. La preparación teñida presenta, respecto de la no coloreada, diferencias en el aspecto de los bacilos, debidas a las retracciones del cuerpo de la bacteria, originadas por la fijación y la coloración. Esto mismo es la causa de las « formas de bambú », en la que cada eslabón de las agrupaciones en cadena, aparece más delgado en el centro que en los extremos, que están algo engrosados, de manera que en el punto en que éstos se juntan se presentan engrosamientos a manera de nódulos, y los espacios de separación entre los bacilos aparecen amplificados y biconvexos por la retracción en forma de plato de las superficies terminales de los bastones. Estas deformaciones son artificiales, según se demuestra en las preparaciones sin teñir, en las cuales siempre se observa la forma cilíndrica del bacilo, y hasta con la superficie ligeramente abombada hacia fuera como en otras especies.

La coloración de GRAM es singularmente apropiada para los cortes de tejido y frotis del bacilo del carbunco. En cortes de hígado, pulmón y riñones (agrupaciones en ovillo de bacilos en los glomérulos) se puede observar cómo los bacilos se encuentran localizados princi-

palmente en los capilares (como corresponde al desarrollo de la infección por la vía sanguínea).

El bacilo del carbunco forma cápsulas en el organismo infectado, visibles, valiéndose de ciertas coloraciones (véase pág. 16 en la Parte general) ; en los cultivos, con excepción del obtenido en suero sanguíneo, no llega a formar cápsulas. La obtención de cultivos puros es muy sencilla si el material es reciente, tanto en placas de gelatina como en las de agar. Las colonias se desarrollan a las doce horas en placas de

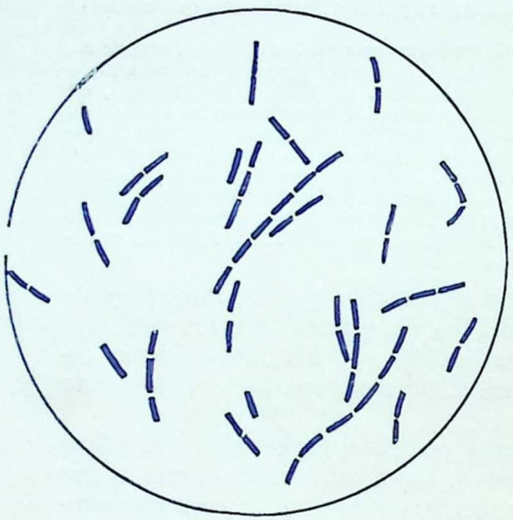


FIG. 80. Bacilos del carbunco. Cultivo puro. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

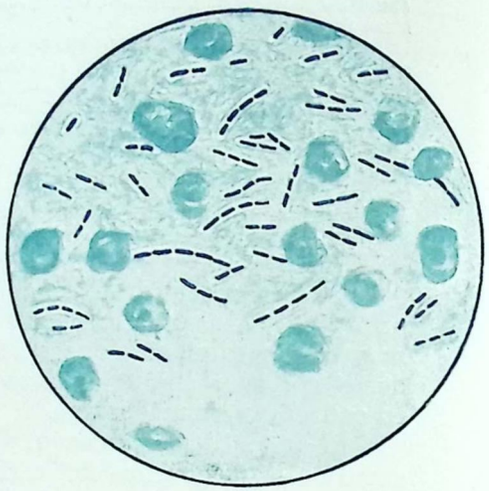


FIG. 81. Bacilos del carbunco. Frotis de un órgano. Coloración con solución de azul de metileno. Cápsulas (aumento 1 : 500)

agar ; necesitando de treinta y seis a cuarenta y ocho horas en las de gelatina, presentando en ambos casos un aspecto muy característico, típico del carbunco. Macroscópicamente parecen discos irregulares de color blanco mate. Las colonias funden la gelatina a causa de un fermento peptonizante que puede obtenerse, separado del cultivo, en estado de disolución. Por esta razón, el centro de la colonia se hunde poco a poco en la gelatina, y con pocos aumentos se observa que forma una masa espesa estrechamente entrelazada, alrededor de la cual crecen los bordes de la colonia como enmarañados, formando trenzas o rizos como las serpientes en la cabeza de Medusa. Esta disposición característica de las colonias de carbunco aparece con toda claridad en las preparaciones por impresión (véase Parte general, pág. 33). En los bucles se ven los filamentos de bacterias que salen del interior de la colonia y que, arqueándose, vuelven a penetrar en ella. También se observan con frecuencia prolongaciones filamento-

sas en el borde de la colonia ; con aumentos medios se consigue distinguir los bacilos que constituyen tales filamentos, y con mayores aumentos se puede comprobar en los bacilos la formación de esporos, incipiente a veces, y completa otras según la edad del cultivo.

También los cultivos puros procedentes de las colonias descritas sembrados en agar inclinado, por picadura en gelatina o en caldo, presentan un aspecto muy característico ; en agar inclinado, a las pocas horas, se forma una capa blanquecina espesa de bordes enma-

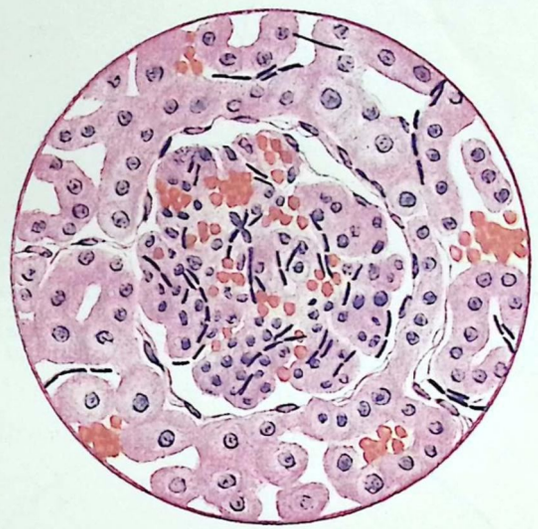


FIG. 82. Bacilos del carbunco en un glomérulo. Ratón. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

rañados ; en caldo, aparecen grandes copos en el fondo del tubo mientras que el líquido de encima continúa claro ; por picadura en gelatina, el crecimiento no se verifica únicamente a lo largo de la línea de la siembra, sino que se extiende en líneas perpendiculares a ésta, que dan al cultivo el aspecto de un abeto invertido ; al mismo tiempo se realiza la licuación de la gelatina de arriba abajo a lo largo de la picadura.

La formación de esporos, cuyas condiciones fueron estudiadas por R. KOCH por primera vez, no se verifica nunca en un organismo vivo infectado, y requiere, como primera condición, la presencia de oxígeno, así como una temperatura superior a 16°. En los cultivos no aparecen los esporos en seguida, sino únicamente cuando se sobrepasan las condiciones óptimas de desarrollo y empiezan a ejercer su acción factores que dificultan el crecimiento, unas veces debidos al agotamiento del medio nutritivo, y otras a la formación de productos metabólicos tóxicos. De aquí que la formación de esporos,

represente un medio de conservación de la especie. Los esporos del carbunco son de forma ovalada, y su situación es central. En pre-

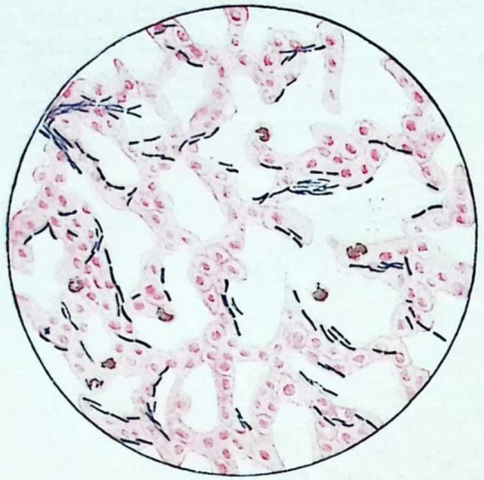


Fig. 83. Carbunco. Corte de pulmón. Coloración de Gram (aumento 1 : 500)



Fig. 84. Bacilos del carbunco. Frotis de órgano. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

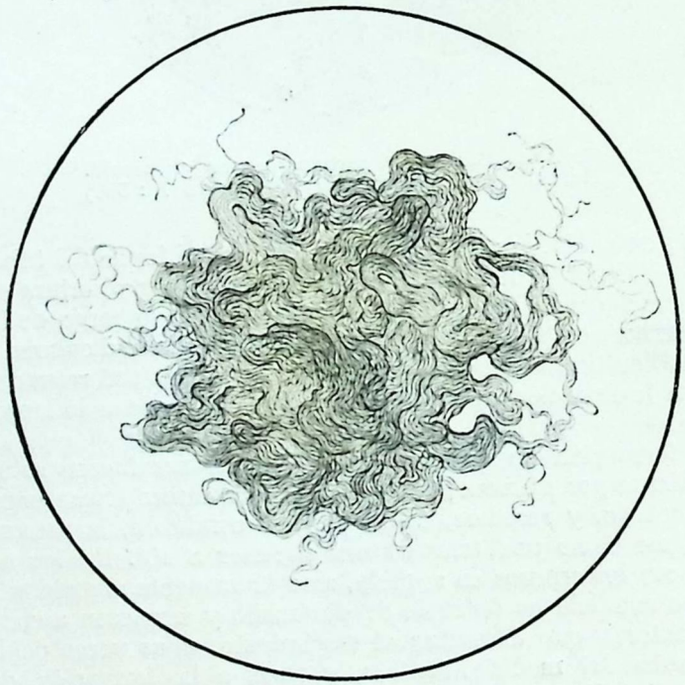


Fig. 85. Colonia de bacilos del carbunco. Placa de agar (aumento 1 : 60)

paraciones teñidas o incoloras, se observan, en forma muy característica, todos los detalles indicados respecto a los esporos de las bacterias en la pág. 12 de la Parte general. (Véanse también las págs. 39 y 40, acerca de los métodos de coloración de esporos.) La resistencia de los esporos a la influencia de los agentes exteriores es muy considerable y constante, por lo cual las hebras de seda con esporos de carbunco desecados son el testigo preferido en las experiencias de desinfección, y especialmente para la prueba de aparatos de desinfección por

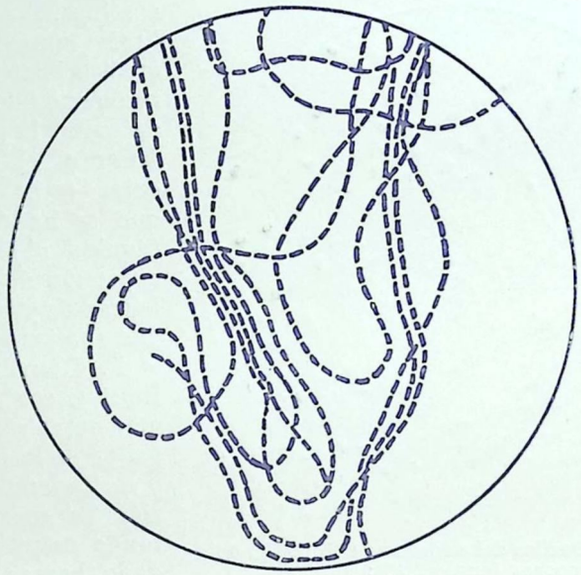


Fig. 86. Bacilos del carbunco. Preparación por impresión. Coloración de Gram (aumento 1 : 500)

vapor; en vapor circulante, a 100°, mueren los esporos de carbunco en un lapso de tiempo que varía de dos a doce minutos. La reviviscencia de los esporos, reintegrándolos a condiciones de cultivo favorables, da por resultado el crecimiento en sentido longitudinal. En ocasiones se encuentran bacilos del carbunco en los que ha desaparecido la propiedad de formar esporos. Estas razas asporógenas (Lehmann) se obtienen artificialmente colocando los cultivos en condiciones desfavorables, en medios con un ligero contenido de substancias antisépticas (Behring), o sometiendo el cultivo a una temperatura superior a la óptima (41° según Roux).

Los caracteres morfológicos y biológicos descritos para el bacilo del carbunco, tanto en los cultivos como en inoculación en los animales, bastan para establecer con seguridad, en la mayor parte de los casos, el diagnóstico bacteriológico. Pueden presentarse dificultades para formularlo, cuando el material examinado se halla en estado

de putrefacción avanzada, porque en el organismo, según hemos indicado, los bacilos del carbunco no forman esporos, por lo cual son anulados fácilmente por los anaerobios de la putrefacción que morfológicamente pueden ser muy semejantes a ellos. Hasta la inoculación en los animales puede inducirnos a error en este caso, porque ciertos agentes anaerobios, como el del edema maligno, inoculados a cobayos o ratones, pueden presentar una forma semejante. Por esto no es conveniente fiarse únicamente del examen microscópico, sino que es preciso hacer siempre cultivos aerobios. Si no puede realizarse inmediatamente el análisis bacteriológico, es recomendable, con el fin de evitar la putrefacción durante el transporte, dejar secar el material que se ha de examinar (líquido obtenido de la expresión de tejidos) en barras de yeso esterilizadas (preparadas por M. y F. Lautenschlager, Berlín), con lo cual se detiene el efecto perturbador de la putrefacción y se favorece la formación de esporos. Calentando después, con cuidado, brevemente, a 80°, se destruyen las bacterias de la putrefacción, en tanto que los esporos de carbunco permanecen intactos. Para el examen de órganos cuya putrefacción está ya muy adelantada, el serodiagnóstico de Ascoli presta muy buenos servicios.

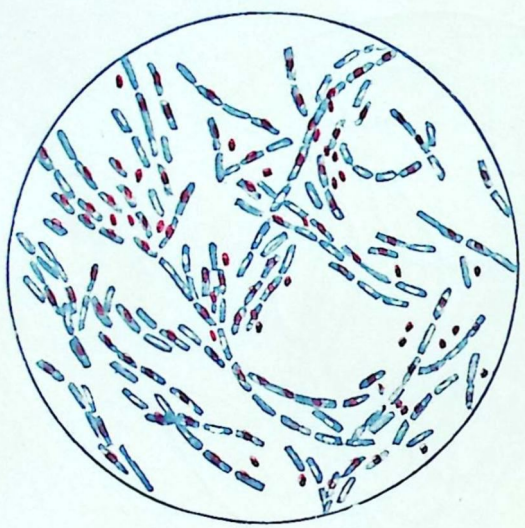


Fig. 87. Bacilos del carbunco. Coloración de esporos (aumento 1 : 500)

Este procedimiento está fundado en que el suero de animales inmunizados contra el carbunco contiene con frecuencia cantidades abundantes de precipitinas, es decir, substancias precipitables procedentes de la albúmina de los bacilos carbuncosos. Sobre un extracto de órganos transparente e incoloro, se vierte con cuidado, en tubitos estrechos, el suero anticarbuncoso precipitante, de manera que se formen dos capas. Si se trata de carbunco, es decir, si el extracto contiene substancias precipitinógenas abundantes, al cabo de un cuarto de hora aparece un anillo blanco entre los dos líquidos. No deben faltar los controles necesarios; el conjunto del experimento se dispone en la siguiente forma:

Extracto de órgano sospechoso	+	Suero de carbunco	=	positivo
» » » »	+	» normal	=	negativo
» » carbunco indudable	+	» de carbunco	=	positivo
» » » »	+	» normal	=	negativo
» normal	+	» de carbunco	=	»

Respecto a detalles de este método, véase el capítulo Precipitinas.

El carbunco es, de muy antiguo, una de las plagas más temibles de los grandes animales domésticos (vacas, ovejas, caballos, cerdos y cabras), y aparece, con frecuencia, en forma de epizootias más o menos extensas. La infección del animal parte, generalmente, del intestino, adonde llega junto con el pienso infectado por otros animales atacados de carbunco. Las picaduras de ciertos insectos (tábanos) son también una de las causas de infección. En lugares donde el material infectado se arroja a la superficie del suelo, si en éste las circunstancias favorecen la formación de esporos, estas formas de resistencia pueden mantenerse vivas durante años y conservar al propio tiempo toda su virulencia. Por esta razón puede suceder que en circunstancias especialmente favorables (como la de utilizarse siempre el mismo lugar para apacentar el ganado), se manifieste la enfermedad de una manera endémica con casos de infección que aparecen de vez en cuando y siempre en los animales que frecuentan el mismo sitio.

También el hombre es receptivo para el carbunco, y la infección puede presentarse en él bajo tres formas diferentes: 1) La más frecuente y relativamente benigna, es la pústula maligna o infección carbuncosa de la piel; 2) Menos frecuente, pero de pronóstico mucho más grave, es el carbunco pulmonar, que se presenta bajo la forma de una pulmonía maligna; 3) El carbunco intestinal, forma de infección intestinal y general, con todos los caracteres de una septicemia grave. La segunda forma de la enfermedad es producida al respirar el germen con el polvo infectado, o por el manejo de pieles, cueros o brochas que contengan gérmenes de carbunco; la tercera, muy rara, se produce por la ingestión de carnes de animales infectados, insuficientemente cocidas. Como material de análisis, se usa, en la primera forma, el contenido de las pústulas o carbuncos; en la forma neumónica los esputos; y las deyecciones, en la forma intestinal.

2. Productores de toxinas del grupo de los bacilos del heno

Flugge demostró que los gérmenes del cólera de la infancia eran los saprofitos tóxicos existentes en el estiércol y, en pequeñas cantidades también, en la leche de vaca, y que su desarrollo no se verifica por debajo de 22°, siendo la temperatura más favorable la de 37°. Al multiplicarse, provocan en la leche un desdoblamiento característico, que se manifiesta por la peptonización y sedimentación parcial de la caseína producida por el fermento lab; en este estado se observa en la leche, por debajo de la capa de nata no alterada, un líquido amarillo, transparente, y en el fondo la caseína precipitada por el lab. Esta descomposición, al principio, es apenas perceptible a simple vista, especialmente si se agita la leche antes de examinarla, pero su sabor amargo la excluye desde luego como alimento. Si llega a ser ingerida por los niños de pecho, les produce una enfermedad de aspecto clínico semejante al del cólera, que por esta razón se llama cólera infantil. El

mismo cuadro clínico puede producirse en perritos alimentándolos con leche en tal estado. La substancia tóxica no puede obtenerse en forma soluble, sino unida al cuerpo de las bacterias, y se destruye rápidamente hirviéndola (LUBBERT). En cambio, los esporos de estas bacterias peptonizantes presentan una resistencia extraordinaria, y no se destruyen ni aun al cabo de los tres cuartos de hora de ebullición empleados ordinariamente para esterilizar la leche, sobreviviendo a veces aun después de hervirla hora y media.

Estos gérmenes pertenecen a varias especies y no son verdaderamente infecciosos, sino que en forma análoga al *bacillus botulinus*, deben considerarse como saprofitos tóxicos que producen los fenómenos morbosos por sus toxinas introducidas en el organismo humano. Sus propiedades biológicas están completamente de acuerdo con las circunstancias epidemiológicas del cólera infantil; tanto la falta de contagio directo, como la dependencia de la enfermedad de la elevada temperatura de la habitación y de la alimentación artificial — ya que los niños lactados al pecho no la padecen — inducen a creer en el origen tóxico de la enfermedad a consecuencia de alteraciones de la leche debidas a influencias exteriores. En la Parte general, pág. 142, hemos analizado las conclusiones que de esto se deducen, por lo que se refiere a la esterilización de la leche.

3. Bacilo del tétanos

Los antiguos sabían ya que el tétanos se relaciona, la mayoría de las veces, con heridas profundas, y se creía poder deducir de ello que las convulsiones que caracterizan clínicamente la enfermedad eran debidas a la fuerte excitación producida por la herida en los grandes nervios periféricos. Pero también se explicaba el tétanos como debido a una convulsión refleja, provocada por un enfriamiento o por fenómenos psíquicos.

Estas hipótesis fueron desechadas cuando en el año 1884 CARLE y RATTONE consiguieron reproducir en conejos el mismo cuadro de convulsiones, inyectando a los animales secreciones de la herida de un caso de tétanos humano. NICOLAIER comprobó el hecho importante de que también se conseguía producir el tétanos inyectando tierra a diversas especies de animales. Fué también el primero en reconocer al microscopio el bacilo del tétanos en frotis de secreciones de heridas, y consideró los característicos bacilos delgados como los verdaderos gérmenes de la enfermedad. ROSENBACH confirmó los datos de NICOLAIER. Dos años más tarde, consiguió KITASATO, valiéndose de un procedimiento de cultivo anaerobio, obtener un cultivo puro y reproducir con él, experimentalmente, las típicas convulsiones en los animales.

El bacilo del tétanos se encuentra, ordinariamente, en la tierra abonada y en el fango de las calles; es también muy frecuente en el estiércol del ganado caballar y vacuno, y alguna vez aparece en las deyecciones del perro y del hombre. Los esporos del germen del tétanos ofrecen una gran capacidad de resistencia a la desecación, y por esta causa pueden conservar su virulencia largo tiempo en las capas superficiales del suelo.

El bacilo del tétanos es un bastoncillo alargado y delgado, con los extremos redondeados, muy característico en la manera de formar esporos, que, situados en un extremo del bacilo, dan a éste la figura de un palillo de tambor o la de un alfiler. Los bacilos sin esporos presentan

un movimiento muy vivo y están provistos de un gran número de flagelos perítricos. Por tratarse de un anaerobio obligado, el movimiento y todas sus demás manifestaciones vitales se paralizan pronto en presencia del oxígeno, y por esto sólo pueden observarse bien en medios de cultivo pobres en oxígeno, o que carezcan del mismo por completo.

Los bacilos del tétanos se tiñen bien con los colores de anilina usados ordinariamente. La coloración de GRAM no da resultado con regularidad en todos los casos, como sucede con el bacilo del carbunco,

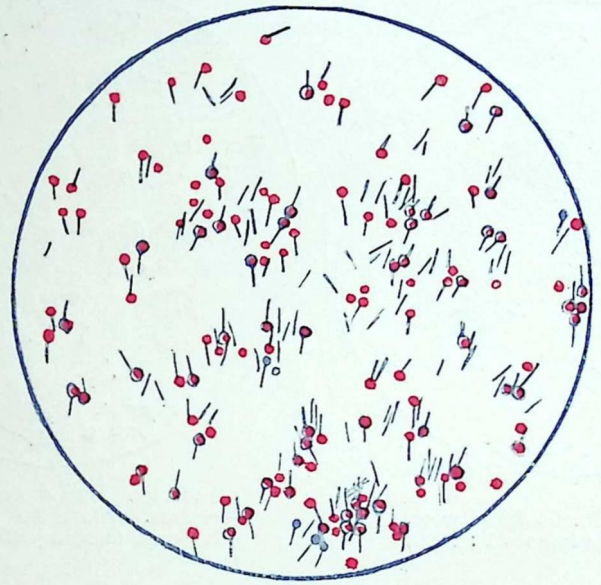


FIG. 88. Bacilo del tétanos. Coloración de esporos (aumento 1 : 500)

por ejemplo. Incluso algunos autores sustentan la opinión de que el bacilo del tétanos es GRAM negativo.

El bacilo del tétanos no es muy resistente. Los esporos, en cambio, soportan perfectamente durante horas enteras temperaturas de 60° a 70°; a los 90° mueren al cabo de una hora, aproximadamente. El vapor circulante los mata en cinco minutos. El sublimado al 1 por 1000, sólo al cabo de tres horas. Esta gran facultad de resistencia de los esporos permite explicar que astillas de madera infectadas con ellos puedan, después de muchos años, producir el tétanos en el hombre y los animales.

Los gérmenes del tétanos sólo pueden cultivarse en condiciones anaerobias, es decir, en medios desprovistos de oxígeno, en los que es conveniente, además, añadir substancias reductoras, tales como glucosa, indigosulfato de sosa o formiato de sosa. En la Parte general, pág. 50, hemos descrito ya con detalle la técnica para preparar esta clase de cultivos.

Los cultivos por picadura en agar presentan un aspecto semejante a un abeto. El desarrollo se verifica en todos sentidos a partir de la línea de la siembra y se acentúa más en la profundidad. Los bordes presentan una intensa ramificación. Se nota también que el agar ha sido fragmentado por los gases que se forman en algunos puntos. Este gas consiste, principalmente, en ácido carbónico e hidrocarburos y se distingue por su olor repugnante.

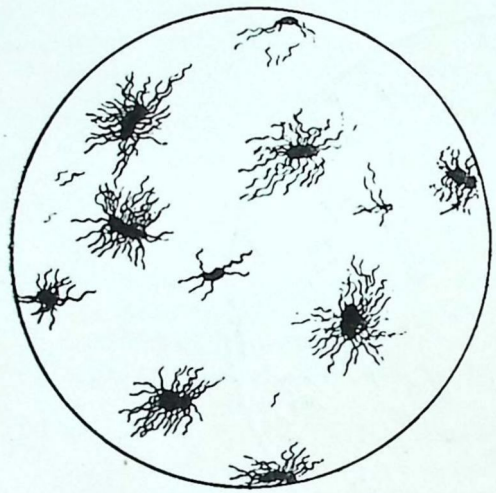


FIG. 89. Bacilo del tétanos. Flagelos (aumento 1 : 1000)

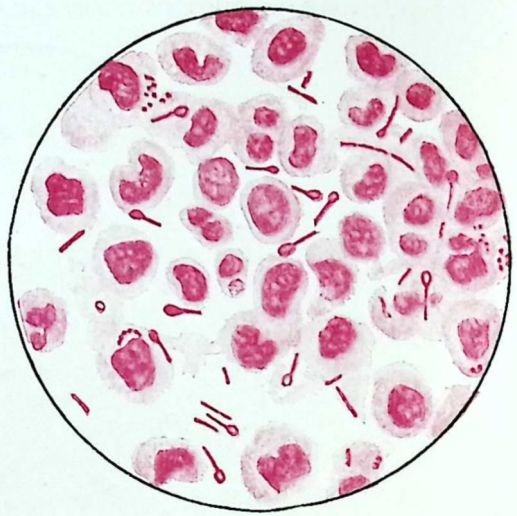


FIG. 90. Bacilo del tétanos en el pus. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1:500)

En los cultivos anaerobios en caldo, éste aparece uniformemente turbio, y a veces se notan en la superficie burbujas de espuma.

Liquida pronto la gelatina. Las colonias de tétanos en este medio son de pequeño tamaño, y semejan un ovillo formado por hebras arrolladas a un centro obscuro en maravilloso serpenteo, del cual parten hilos rígidos y delgados, a manera de radios, hacia la periferia.

El bacilo del tétanos, al parecer, puede desarrollarse también en condiciones aerobias principalmente cuando se halla asociado a otros microorganismos, como los gérmenes del pus. Estos, al desarrollarse, consumen el oxígeno y crean de este modo circunstancias anaerobias favorables para el crecimiento del bacilo del tétanos. Aun cuando para poder reconocer el bacilo del tétanos, con gran probabilidad de acierto, el aspecto de las preparaciones es bastante característico, sin embargo, para la seguridad completa del diagnóstico, siempre que sea posible, se hará también el ensayo en animales.

Inyectando por vía subcutánea o intramuscular cobayos, conejos o ratones, con material de cultivos puros del tétanos u otro cualquiera que contenga el bacilo, al cabo de un período de incubación que oscila entre uno a tres días, aparecen los síntomas tetánicos propios de la enfermedad en sus tres períodos de tétanos ascendente, opistótonos, y descendente, iniciándose los síntomas en el miembro más próximo al sitio de la inyección para generalizarse después por todo el organismo y perecer muy pronto los animales. Se trata, realmente, de una acción tóxica, como se deduce del hecho de que el bacilo del tétanos sólo se desarrolla en el sitio de entrada, no encontrándosele en el resto del organismo.

Por otra parte, puédense producir también los mismos síntomas en los animales de experimentación, sin inocularles los bacilos vivos, sino únicamente con la inoculación de la toxina soluble obtenida de los cultivos. Esta toxina es extraordinariamente activa ; 0'000005 de c. c. de cultivo en caldo filtrado mata un ratón. Según EHRLICH, la toxina tetánica no es un cuerpo simple; está compuesta de tetanoespasmina, que es la causa de las convulsiones, y tetanolisina. La primera actúa sobre el sistema nervioso central, y la segunda obra disolviendo los glóbulos rojos de diversas especies de animales. El veneno es conducido por las vías nerviosas periféricas desde el punto en que se produce, en la puerta de entrada de la infección, hasta el cerebro o la médula espinal. La toxina del tétanos tiene una afinidad especial para las substancias del sistema nervioso, como se demuestra por la unión *in vitro* de esa toxina con la pulpa cerebral. Cuando esta combinación llega a verificarse en el organismo, lo hace de una manera tan íntima que, aun con grandes dosis de antitoxina, apenas se consigue, o no se logra destruirla. Por eso, el efecto curativo de la antitoxina del tétanos es muy inferior a su valor preventivo. El efecto preventivo puede demostrarse por experimentos de laboratorio, inyectando a la vez toxina y antitoxina en un ratón, con lo cual no aparecen los síntomas del tétanos y el animal continúa sano.

4. Bacilos del edema maligno

Ya en el año 1878 PASTEUR logró producir en los animales infecciones agudas, con edema sanguinolento, inyectándoles líquidos pútridos. Estas infecciones eran semejantes al edema maligno del hombre, afección bastante frecuente en los tiempos anteriores a la antisepsia, y en ellas logró descubrir un bacilo algo encorvado, que denominó « vibrión séptico ». En el año 1881 consiguió R. KOCH cultivos puros del bacilo del edema maligno en condiciones anaerobias, y lo diferenció exactamente del bacilo del carbunco, con el cual a menudo se encuentra asociado, en cadáveres carbuncosos en putrefacción. El bacilo del edema maligno se distingue del bacilo del carbunco por su crecimiento anaerobio, por su movilidad debida a sus numerosos flagelos perítricos, así como por la formación de esporos dentro del organismo infectado ; además, el bacilo del edema maligno es más delgado, y al desarrollarse forma filamentos arqueados, con los extremos redondeados, en lugar de los rígidos y completamente cilíndricos del bacilo del carbunco. En contra de lo que se creyó al principio, el bacilo del

edema es GRAM positivo, pero este carácter no es tan constante como en el bacilo del carbunco ; con frecuencia se encuentran ejemplares que son negativos.

El bacilo del edema maligno se encuentra, generalmente, en la superficie de los terrenos estercolados, desde los cuales pasa al intestino de los animales domésticos, donde se le halla normalmente en grandes cantidades, junto con sus afines los bacilos de la fermentación butírica de la leche. La inoculación subcutánea de tierra estercolada

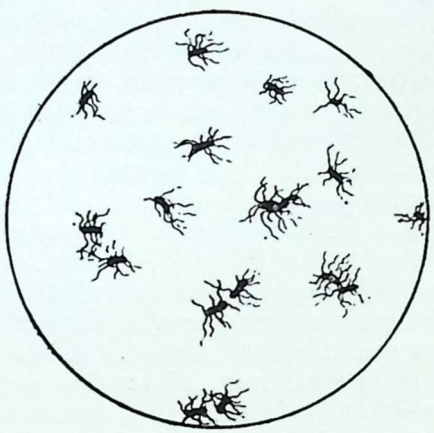


FIG. 91. Bacilo del edema maligno. Flagelos (aumento 1 : 500)

en un animal le produce la muerte casi siempre al primero o segundo días de la inyección ; alrededor del punto de la inoculación se produce circularmente un edema extenso y sanguinolento con destrucción típica del tejido muscular, pero con escasa formación de gases o ausencia completa de los mismos. Los bacilos, al morir el animal, se encuentran , generalmente en gran cantidad, localizados sólo en el área del edema ; horas después de la muerte se comprueba la existencia de bacilos en los órganos internos, especialmente en el bazo, en donde son muy numerosos. En el hombre, la infección se presenta en las mismas condiciones que en los animales de experimentación, especialmente a consecuencia de lesiones con gran magullamiento de las partes blandas, acompañado de gran suciedad de la herida.

Investigaciones posteriores han demostrado que el edema maligno no representa una entidad morbosa, sino que puede ser originado por diversos gérmenes afines de un mismo grupo natural. Estos gérmenes distintos del bacilo del edema maligno de R. KOCH fueron descritos por NOVY y por GHON y SACHS, recibiendo el nombre de estos autores. Las diferencias aparecen, en parte, en los cultivos y, en parte, en sus efectos en el organismo infectado. El bacilo del edema de R. KOCH produce un fermento que liquida la gelatina y ennegrece el medio de cultivo de pulpa cerebral empleado por v. HIBLER. Las

otras dos especies citadas tienen las propiedades siguientes : el bacilo de NOVY liquida también la gelatina, y, lo mismo que el de KOCH, destruye el tejido muscular del organismo infectado, pero el de GHON-SACHS, en cambio, no produce fermento peptonizante ni ennegrece el cultivo de pulpa cerebral, y sus esporos presentan, además, una gran capacidad de resistencia, lo que les permite soportar durante más de dos horas la acción de la temperatura de la ebullición. Por último, hay

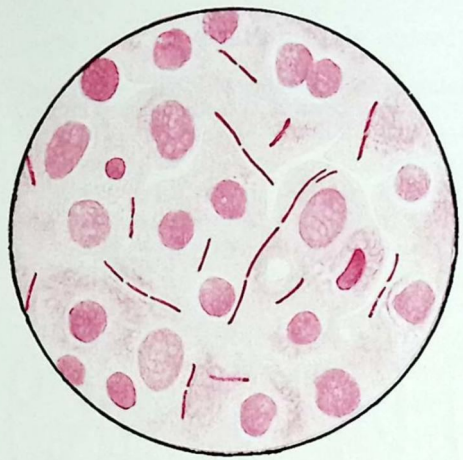


FIG. 92. Bacilo del edema maligno en el pus. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

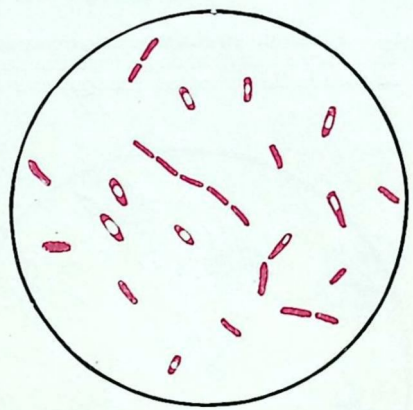


FIG. 93. Bacilo del edema maligno. Cultivo puro. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

que distinguir radicalmente del edema maligno, el grupo de bacilos descritos a continuación, que en un principio se confundieron con el germen del mismo.

5. Bacilos de la gangrena gaseosa (flemón gaseoso)

Esta infección se presenta en el hombre y en los animales inoculados experimentalmente en condiciones próximamente iguales a las del edema maligno, siendo las heridas manchadas con estiércol de caballo las más temibles como origen del flemón gaseoso. Se diferencia clínicamente del edema maligno por la gran producción de gases en los alrededores de la herida, desarrollo que después de la muerte puede hacerse extensivo a los órganos internos (enfisema de las heridas, « órganos espumosos », *Schaumorgane*); en ocasiones, tiempo antes de morir el animal, la infección se hace septicémica porque el germen penetra en el aparato circulatorio. La gangrena gaseosa es producida por un bacilo descrito por E. FRAENKEL, distinto del germen del edema maligno, que se caracteriza sobre todo por carecer de movimiento, por ser GRAM positivo y porque con frecuencia forma cápsulas. Recientemente, KLOSE descubrió que también el bacilo de la gangrena gaseosa

de FRAENKEL produce una toxina bastante resistente al calor, que, al ser inyectada en los animales, da lugar a los síntomas característicos locales y generales, propios de la gangrena gaseosa. Contra esa toxina preparó KLOSE un suero curativo. El empleo práctico de tal suero, preparado con una sola raza de cultivo, tropieza con la dificultad de no ser la gangrena gaseosa una enfermedad única bien definida, sino que puede ser causada por diversos gérmenes afines.

6. Bacilo del carbunco sintomático

El carbunco sintomático, llamado también enfisema infeccioso, es una enfermedad muy extendida entre los animales, especialmente en el ganado vacuno, la cual se confundía en otros tiempos con el carbunco. A los concienzudos trabajos de

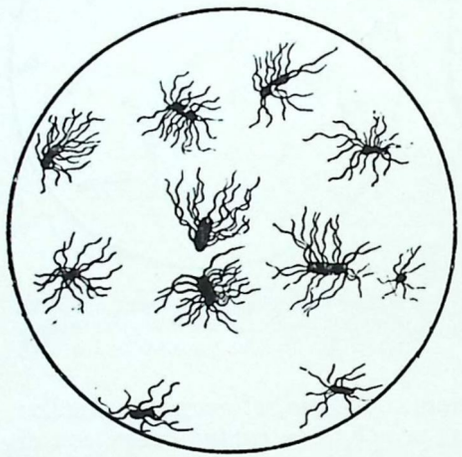


FIG. 94. Flagelos del bacilo del carbunco sintomático (aumento 1 : 500)

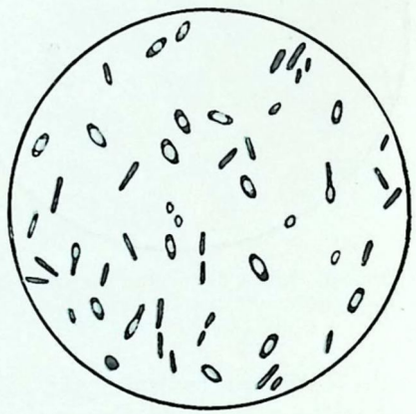


FIG. 95. Bacilo del carbunco sintomático con esporos. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

BOLLINGER y FESER se deben la descripción exacta del germen del carbunco sintomático y la diferenciación anatomopatológica de esta enfermedad, del carbunco y de otras semejantes. Los cultivos puros se obtienen empleando los procedimientos adecuados a los anaerobios.

El agente morboso es un bacilo anaerobio dotado de un movimiento muy vivo, provisto de numerosos flagelos perítricos y que se tiñe por el GRAM. En el líquido del edema y en las cavidades serosas del animal enfermo se encuentra el germen, aislado o por parejas, en forma de bastoncitos rectos sin abultamiento del cuerpo bacilar. Este detalle se utiliza en el diagnóstico diferencial para distinguirlo del bacilo del edema maligno, que se presenta dispuesto en filamentos. Es muy distinta la imagen microscópica del germen procedente de un músculo infectado. Además de los bastoncitos citados, pueden observarse formas abultadas y en forma de vejiga, llamadas formas de *clostridium*, que al ser tratadas con yodo toman un color rojo castaño debido al glicógeno contenido como material de reserva en el cuerpo de los bacilos.

También en los cultivos, especialmente en medios muy alcalinos, en los que abunden los hidratos de carbono, se encuentran estos bastoncitos granulosos. Aparecen asimismo bacilos con esporos terminales ovalados (formas de maza), que no se forman en el organismo hasta pasadas veinticuatro o cuarenta y ocho horas de la muerte del animal.

El cultivo del germen del carbunco sintomático se consigue en buenas condiciones en medios muy alcalinos, ricos en hidratos de carbono.

En caldo, se forma un sedimento, mientras que el líquido de encima permanece claro o muy ligeramente turbio. A consecuencia de la fermentación butírica, los cultivos en caldo huelen a manteca rancia. En caldo con sangre, su desarrollo es extraordinario, produciéndose un gran desprendimiento de gases. En gelatina, ésta se liquida lentamente, formándose colonias redondeadas con líneas radiales en el borde. En agar, en capa espesa, al lado de las burbujas de gas se reconocen finas colonias redondeadas con ligera granulación. Los esporos del bacilo, a diferencia de sus formas no esporuladas, se distinguen por su gran resistencia, de manera que, aun desecados, se mantienen vivos y virulentos durante años.

La infección experimental en los animales se consigue fácilmente, sobre todo en cabras, vacas, ovejas y cobayos, por la inoculación de órganos enfermos o de cultivos; es más difícil infectar conejos, ratones blancos y ratas. El animal más apropiado para los experimentos, el cobayo, enferma a las catorce horas de la inyección; la región próxima al punto de inoculación se pone edematosa, y los tejidos, por efecto del desarrollo de gases, crepitan al ser comprimidos. El animal decae y muere pronto. El hombre parece completamente inmune al carbunco sintomático; existe, pues, una diferencia específica entre esta infección de los animales y la gangrena gaseosa del hombre.

GRASSBERGER y SCHATTENFROH, en 1912, comprobaron en los cultivos de carbunco sintomático la existencia de un veneno soluble y lo obtuvieron como verdadera toxina. Sin embargo, no se ha conseguido demostrar, de una manera indubitable, hasta qué punto influye esta toxina en la patogenia de la infección. La inoculación en un cobayo produce inflamaciones hemorrágicas en el punto de inyección y en la piel, exudaciones sanguinolentas en las cavidades serosas y edema pulmonar, que causa la muerte del animal. Los conejos inyectados con la toxina mueren con convulsiones y parálisis; en la autopsia se encuentran edemas y hemorragias en el cerebro.

7. Bacillus botulinus

Bajo la denominación de intoxicaciones por la carne o los embutidos se agrupaban antes enfermedades de naturaleza muy distinta. En algunos casos se trataba de verdaderas infecciones originadas por

bacilos de los grupos paratífico y de GARTNER (véase más adelante), y en otros, de verdaderas intoxicaciones producidas por toxinas microbianas, debiendo considerar entre los productores de toxinas el *bacillus proteus*, los colibacilos y gérmenes semejantes a éste y el *bacillus botulinus*. Mientras que los cuadros morbosos producidos por bacilos de los grupos GARTNER, coli y paratífico son semejantes al de una gastroenteritis, en la intoxicación por los embutidos propiamente dicha, el botulismo, se trata de una enfermedad grave

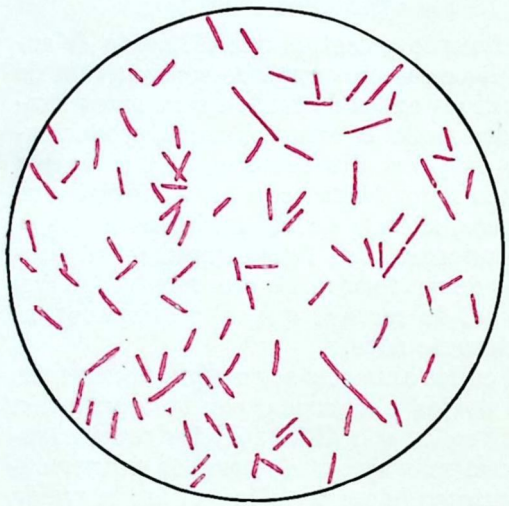


FIG. 96. *Bacillus botulinus*. Cultivo reciente. Formas no esporuladas solamente. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

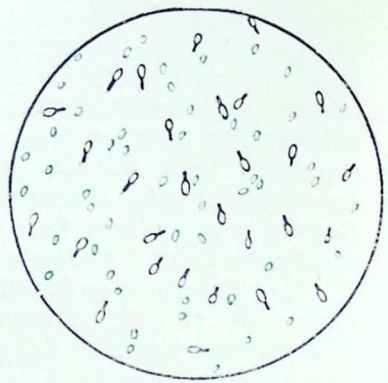


FIG. 97. *Bacillus botulinus*. Cultivo puro con esporos. Coloración de GRAM (aumento 1 : 500)

con síntomas de parálisis, distinta de las enfermedades infecciosas febriles que acabamos de citar. El nombre de intoxicación por los embutidos (« *Botulismo* ») no es apropiado al cuadro etiológicamente caracterizado de la enfermedad que nos ocupa, porque no solamente pueden originarla los embutidos, sino que con más frecuencia se adquiere por comer jamón, conservas de carne y distintas clases de pescado ahumado o salado, y aun legumbres en conserva. El botulismo es una verdadera intoxicación producida por substancias tóxicas preformadas en la carne o legumbres. No se trata precisamente de un parásito patógeno, sino de un saprofito toxinógeno. Ignoramos todavía cuál es el origen o en qué forma se verifica la contaminación de los alimentos con estos saprofitos toxinógenos; probablemente tienen su asiento y se multiplican en el contenido intestinal; al menos el *bacillus botulinus* se ha encontrado en las evacuaciones del cerdo sano.

El germen fué descubierto en 1895 por VAN ERMENGEN con ocasión de un gran número de casos de intoxicación producidos por comer jamón.

El *bacillus botulinus* es un bastoncito recto de extremos redondeados, movible, y anaerobio obligado, que se tiñe bien con los colores de anilina corrientes y es GRAM positivo. Su temperatura óptima de crecimiento es la de 22° a 25°; a los 35° crece con dificultad y por eso no puede desarrollarse en los organismos vivos; por debajo de 18° su desarrollo es precario. Forma esporos ovalados situados entre un extremo y el centro del bacilo, que se tiñen fácilmente por los procedimientos de coloración de esporos. Estos, en comparación con los de otros gérmenes, son poco resistentes a la influencia de los agentes exteriores. Una temperatura de 80° mantenida durante una hora es suficiente para destruirlos. En los cultivos se observan a veces formas filamentosas. Los bacilos se presentan en parejas, y de vez en cuando se les ve dispuestos en cortos filamentos. En cultivos de agar y gelatina, el bacilo muestra tendencia a las formas en huso y de *clostridium*, y en la parte del cuerpo del bacilo que presenta mayor diámetro, se halla el esporo.

En agar glucosado, produce gases, en tal abundancia, que agrieta el medio por todas partes. Una gran parte de estos gases consiste en hidrógeno y metano; al mismo tiempo se originan también ácidos grasos volátiles que prestan al cultivo un olor a rancio, pero no fétido.

La toxina del *bacillus botulinus* se forma con mayor abundancia en los medios líquidos a una temperatura de 18° a 23°, pero no más elevada. Esta toxina soluble, a diferencia de las verdaderas toxinas bacterianas del conducto intestinal, puede provocar intoxicaciones muy graves. Es muy poco resistente a la luz y a los álcalis (solución de sosa al 3 %); a la media hora de calentamiento a 80° ya no produce efectos. Los cobayos y los ratones mueren por la ingestión de muy pequeñas cantidades de toxina (0·0001-0·0005 c. c.).

KEMPNER consiguió obtener un suero antitóxico contra el botulismo por inyecciones repetidas de toxina; las inyecciones de este suero en los animales demostraron su acción preventiva y curativa, pues se observó la desaparición de los síntomas de intoxicación después de administrar el suero. La antitoxina es también eficaz administrándola por vía digestiva. Según las investigaciones de LEUCHS, sólo puede esperarse un resultado curativo seguro con los sueros polivalentes, es decir, obtenidos por inmunización de animales con toxinas procedentes de distintas razas de gérmenes. Esta circunstancia hace pensar que el botulismo no es producido por una sola especie de bacterias, sino que, en analogía con el paratifus, puede ser causado por un grupo de especies afines.

El diagnóstico bacteriológico del botulismo se hace comprobando el germen en los residuos del alimento ingerido, ya sea por cultivos anaerobios, ya por la inoculación en los animales. Los conejos y gatos inoculados presentan síntomas especialmente característicos, que consisten en parálisis semejantes a las que ofrece la intoxicación en el hombre (midriasis y sialorrea); las palomas son también muy receptivas.

8. Bacilo piociánico

En el año 1882 fué cultivado por GESSARD un bacilo que, por la facultad que posee de producir una substancia colorante azul verdosa en el pus, se denominó *bacilo piociánico*, dando lugar, en algunas ocasiones, a infecciones generales, especialmente en los niños. E. FRAENKEL lo encontró en la sangre de cuatro cadáveres entre 1100 examinados. Las puertas de entrada de este germen son el ombligo, el intestino y el oído medio. La infección general originada por el bacilo piociánico presenta una evolución aguda intensa (con fiebre alta y remitente, síntomas cerebrales, exantemas y diarrea) que puede terminar con la muerte. El examen bacteriológico, por el cual únicamente se conoce la verdadera naturaleza de esta clase de infecciones, permite establecer con certeza el diagnóstico.

El bacilo piociánico presenta la forma de un bastoncito alargado, de tamaño variable, movible y provisto de un flagelo en sus extremos. Se tiñe bien con todos los colores de anilina, pero no toma el GRAM.

Se cultiva fácilmente en todos los medios corrientes. En agar, se obtiene una capa espesa de cultivo de coloración gris, al mismo tiempo que todo el medio se impregna de la substancia verde y fluorescente segregada por el germen. En caldo, forma un velo, debajo del cual se acumula el pigmento en forma de un estrecho anillo. Liquida la gelatina y coagula la leche, tiñéndola de verde amarillento.

El pigmento se compone de dos substancias colorantes distintas:

1. La piocianina, que puede extraerse de los cultivos por el cloroformo.

2. Una substancia insoluble en el cloroformo, y soluble, en cambio, en el agua, que se encuentra también en muchos cultivos de bacterias fluorescentes.

Además del fermento que liquida la gelatina, el bacilo piociánico produce otro fermento que actúa sobre la fibrina y la albúmina. Su presencia se ha comprobado en cultivos en caldo viejos; se le ha dado el nombre de «piocianasa» y posee propiedades bactericidas. El preparado de piocianasa se utiliza con fines curativos en los portadores de gérmenes (difteria, meningococos).

El bacilo piociánico forma también una hemolisina, la piocianohemolisina, que por su relativa termoestabilidad se diferencia de las hemotoxinas propiamente dichas. También produce una toxina soluble que pasa al líquido de cultivo.

La acción patógena del bacilo piociánico en los animales es muy variable. El animal más receptivo es el cobayo, que muere frecuentemente con sólo una inyección intraperitoneal o subcutánea. Los conejos y ratones lo son menos.

9. Bacilo de la fiebre tifoidea

Con el nombre de «tifus» se comprendía antiguamente una serie de entidades morbosas que evolucionaban con delirio y estupor (τυφος = niebla). En los tiempos modernos, tomando como base los estudios clínicos y anatomopatológicos y sobre todo las investigaciones bacteriológicas, se ha conseguido establecer diferencias esenciales entre tan distintas enfermedades, como la fiebre tifoidea, el paratifus, la fiebre recurrente y el tifus exantemático, cuya sintomatología presenta grandes semejanzas, lográndose determinar en cada caso el verdadero diagnóstico.

El bacilo de la fiebre tifoidea fué descubierto en el año 1880. EBERTH y KOCH encontraron en cadáveres de tifódicos, en los cortes de los ganglios mesentéricos y del bazo, así como en los del hígado, paredes intestinales, riñones, etc., pequeños focos de necrosis como verdaderos nidos de bacilos, a los que consideraron como la causa de la enfermedad. Estos descubrimientos fueron ampliados por GAFFKY en 1884, que consiguió cultivar por primera vez el germen de la fiebre tifoidea.

El germen de esta enfermedad es un bacilo delgado, pequeño, que se tiñe fácilmente con las soluciones acuosas de los colores de anilina,

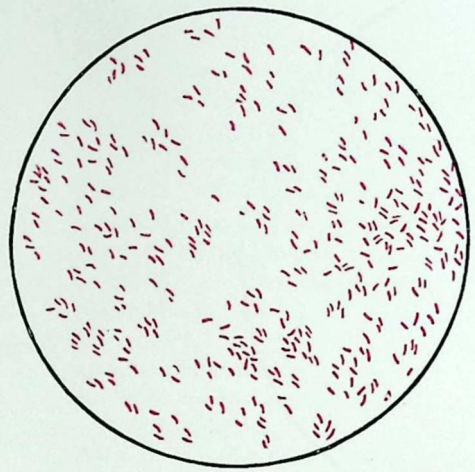


FIG. 98. Bacilo tífico. Cultivo puro. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

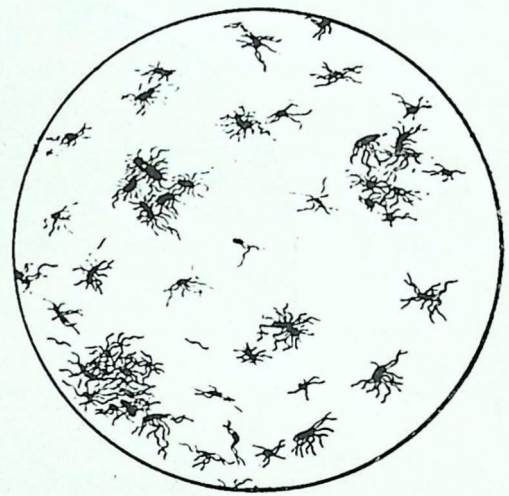


FIG. 99. Bacilo tífico. Flagelos (aumento 1 : 500)

negativo al GRAM y muy movible. Este carácter de movilidad se aprecia especialmente en los gérmenes cultivados en caldo. El cuerpo del bacilo está rodeado de una corona de 8 a 12 flagelos en disposición perítrica. (Para la coloración de flagelos, véase la Parte general, pág. 40). El movimiento es muy característico, propiamente como de serpiente, de manera que un observador ejercitado sospecha los bacilos tíficos sólo por la forma especial de moverse. En los medios de cultivo, este germen se desarrolla algunas veces en forma de largos filamentos. Carece de esporos; los espacios claros (granos polares) del cuerpo del bacilo, que se observan con frecuencia en algunos medios, por ejemplo, en la patata, nada tienen que ver con los esporos, puesto que les faltan las propiedades características de éstos, tales como la dificultad en la coloración y decoloración, y la resistencia ante influencias desfavorables. En cambio, los bacilos mismos tienen mayor resistencia que muchas otras formas bacterianas no esporuladas. Para destruirlos a una temperatura de 53°, es necesario media hora; en hielo y en medios pútridos conserva el bacilo de la fiebre tifoidea su virulencia durante