BIBLIOTECA CONTEMPORÁNEA
DE CIENCIAS MÉDICAS

Microparasitología y Serología

E. GOTSCHLICH
W. SCHÜRMANN

1926

EDITORIAL LABOR, S. A.
BARCELONA - BUENOS AIRES

BIBLIOTECA CONTEMPORÁNEA DE CIENCIAS MÉDICAS

Publicada con la colaboración de eminentes Profesores especialistas

Tamaño 16 × 24 cm. :: Encuadernación en tela

Microparasitología y Serología. Considerando especialmente los métodos de investigación que se exponen en los cursos de Bacteriología.

Por los Profs. Dr. E. Gotschlich, Director del Instituto de Higiene de la Universidad de Giessen, y Dr. W. Schürmann, Prof. en el Instituto de Higiene de la Universidad de Halle. 356 págs. con 213 ilustraciones, la mayoría de ellas en color.

Diagnóstico de las enfermedades de los niños. Con especial consideración de los niños de pecho.

Por el Prof. Dr. E. Feer, Director de la Clínica de Pediatría de la Universidad de Zurich.—390 páginas con 240 ilustraciones.

Modernos métodos de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del riñón.

Por Hugh Maclean, M. D., DSc., Prof. de Medicina de la Universidad de Londres y Director de la Clínica médica del Hospital St. Thomas.—102 págs. con 4 ilustraciones y varios gráficos.

Diagnóstico quirúrgico de las enfermedades del riñón. Tratado práctico para el uso de Cirujanos y Urólogos, Médicos y Estudiantes.

Por el Prof. Dr. Wilh. Baetzner, de la Clínica quirúrgica de la Universidad de Berlín.—391 páginas con 263 ilustraciones, la mayoría de ellas en color.

Terapéutica de las enfermedades de los niños. Con consideraciones generales acerca del diagnóstico y prescripciones farmacológicas especiales para la infancia.

Por el Prof. Dr. F. Lust, Jefe clínico de la Sección de Pediatría en la Universidad de Heidelberg.—474 páginas.

Terapéutica de las enfermedades de la piel y venéreas.

Por el Prof. Dr. J. Schäffer, de la Universidad de Breslau. 477 páginas con 87 ilustraciones.

Cuidado y tratamiento de las heridas y de los focos de infección cerrados.

Por el Dr. W. von Gaza, Profesor de la Clínica quirúrgica de la Universidad de Göttingen. — 320 páginas con 32 grabados, algunos en color.

Análisis clínicos. El Microscopio y la Química al servicio de la Clínica.

Por el Dr. H. Lenhartz, de la Universidad de Leipzig, y el Profesor Erich Meyer, de la Universidad de Estrasburgo. 400 páginas con 196 grabados, muchos de ellos en color.

EN PREPARACIÓN NUEVOS VOLÚMENES

A solicitud remitimos gratis catálogo y folletos especiales de todas nuestras publicaciones

190 Reisertiny
1931.
3er año de Medicina.

BIBLIOTECA CONTEMPORÁNEA
DE CIENCIAS MÉDICAS

TOMO I

Tratado práctico

de

Microparasitología y Serología

TRATADO PRÁCTICO
DE
MICROPARASITOLOGÍA
Y SEROLOGÍA

CONSIDERANDO ESPECIALMENTE LOS MÉTODOS
DE INVESTIGACIÓN
QUE SE EXPONEN EN LOS CURSOS DE BACTERIOLOGÍA

PARA USO DE ESTUDIANTES, MÉDICOS
Y FUNCIONARIOS DE SANIDAD

POR LOS DOCTORES

Prof. E. GOTSCHLICH
Director del Instituto de Higiene
de la Universidad de Giessen

Prof. W. SCHÜRMANN
Profesor auxiliar y Jefe de Sección
en el Instituto de Higiene de la
Universidad de Halle

CON 213 LÁMINAS, LA MAYOR PARTE EN COLOR

TRADUCCIÓN DIRECTA DEL ALEMÁN
POR LOS SEÑORES

Dr. SERVANDO BARBERO SALDAÑA
del Instituto de Higiene Militar de Madrid

Dr. REMIGIO DARGALLO
del Laboratorio Biológico Municipal de Barcelona

LIBRERIA AMERICANA
VICUÑA HNAS.
CONCEPCION

BARCELONA
EDITORIAL LABOR, SOCIEDAD ANÓNIMA
1923

Es propiedad. Queda hecho el depósito que marca la ley



Talleres Tipográficos de EDITORIAL LABOR, S. A. : Provenza, 88, BARCELONA

PRÓLOGO

El presente Manual no tiene la pretensión de exponer todos los hechos comprendidos en la Microparasitología ; no es un tratado de esta ciencia, sino sólo un libro auxiliar que tiende a cumplir un doble objeto. Primero, el de que sea en todo momento un fiel consejero de los alumnos de un curso bacteriológico, y de utilidad tanto en el laboratorio como después de terminadas las prácticas, es decir, un auxiliar dispuesto siempre a orientarles en las manipulaciones o que les sirva para recordar los conocimientos adquiridos. Para ello no era suficiente una simple descripción de los métodos, sino que hemos creído necesario que un libro de esa índole contenga, convenientemente sintetizados, los fundamentos y las conclusiones prácticas de la Microbiología, pues sólo de este modo puede conseguirse un conocimiento exacto de los métodos y de sus aplicaciones. Por esta razón no siempre se expone la materia tratada con el mismo orden que se explicaría por razones didácticas (yendo de lo más sencillo a lo más difícil) durante el curso, ni como se hallaría expuesta en un tratado de Bacteriología, concebido exclusivamente para texto. La exposición se ha procurado hacerla más bien en forma sistematizada ; y particularmente, en la descripción individual de los gérmenes patógenos, éstos se presentan clasificados en un sistema natural dentro de lo que es posible hacerlo dado el estado actual de nuestros conocimientos científicos.

En segundo lugar, este Manual constituye un valioso auxiliar para el médico práctico y para los funcionarios de Sanidad, ejerzan o no como bacteriólogos. Los trabajos bacteriológicos propiamente dichos requieren, como se comprende, haberse ejercitado en ellos con anterioridad, ya que todos sabemos por experiencia cuán fácilmente se olvidan los conocimientos adquiridos en un curso, cuando no los acompaña luego una práctica prolongada. Por lo tanto, el médico práctico seguramente sabrá apreciar el valor de este Manual que en cualquier momento, aun para trabajos bacteriológicos no usuales, le permitirá recordar y orientarse con rapidez y le proporcionará la seguridad de un método acertado y, lo que es más de apreciar, el conocimiento exacto de los motivos susceptibles de error. Además,

este libro ha sido escrito pensando también en el médico que no se consagra a trabajos bacteriológicos, sino que encomienda a los técnicos las investigaciones necesarias en su práctica. Afortunadamente, por parte del clínico se generaliza cada vez más la costumbre de poner a contribución los laboratorios de análisis bacteriológicos. De conformidad con nuestra larga experiencia en Microparasitología, podemos afirmar que para que la cooperación del clínico con el analista sea fructífera, es necesario no echar en olvido determinadas condiciones previas. El médico debe conocer cuales son las substancias o productos que en cada enfermedad infecciosa han de ser examinados, así como también el modo y momento de recogerlos; ha de saber también lo que puede esperar del examen bacteriológico (quizá no repetido) en cada caso determinado, y, sobre todo, ha de estar capacitado para apreciar exactamente el resultado del análisis que se le entrega. Pero ¿qué suele ocurrir en la práctica? Prescindiendo de que, a veces, se entrega material completamente inadecuado y técnicamente mal preparado (por ejemplo las extensiones de sangre), o que los productos son expuestos a un largo transporte que no pueden soportar, cuando lo procedente sería examinarlos en el mismo punto o inmediatamente después de tomarlos (v. gr. cultivos de bacilos de disentería y meningococos), se cometen, además, con gran frecuencia errores en la elección y momento en que estos productos deben obtenerse. Carece de objeto, por ejemplo en un caso de fiebre tifoidea, enviar en los primeros días el suero para la reacción Widal o las heces para la investigación del bacilo tífico, cuando en realidad en estos días el análisis de la sangre del enfermo permitiría un resultado casi seguro. Enviando productos inadecuados o fuera de tiempo, el resultado será negativo, y como consecuencia el análisis bacteriológico, defectuosamente planteado, inducirá precisamente a error. Semejantes errores podrían evitarse y se evitarían si el médico, al enviar los productos, poseyera los conocimientos debidos de los métodos bacteriológicos, o si, llegado el caso, ante uno de esos análisis conociera la eficacia y oportunidad de los mismos.

Hoy día casi ya no es posible exigir al médico de cabecera que en medio de sus múltiples ocupaciones consulte tratados extensos; un libro breve y claro será su mejor guía. Esto es lo que venimos a ofrecerle con el presente Manual. Breve y preciso. Tal es su divisa, y con ella están definidos su tamaño y su contenido. En él hemos procurado suprimir todo lo innecesario a los matriculados en un curso, así como no constan datos sobre bibliografía ni controversias científicas que no sean útiles para el conocimiento práctico. Tampoco se describen los métodos complicados de rara aplicación, no enseñados en los cursos. Teniendo en cuenta todo esto hemos procurado limitarnos, con frecuencia, a indicar un solo método, a condición de que llene su objeto sin reservas. También se ha suprimido todo lo referente a las enfermedades exóticas, con excepción de las que pueden ofrecerse a la observación en casos importados,

y excluído el estudio de las enfermedades infecciosas de los animales que no son transmisibles al hombre. Pero como la brevedad tiene su límite en las necesidades de los fundamentos científicos, en la Parte general hemos hecho una exposición de la biología de los microparásitos, así como de las relaciones existentes entre la infección y la inmunidad. Además, para mayor claridad, se ha procurado ilustrar el texto con numerosas láminas en colores, que mucho mejor que las microfotografías ayudan a recordar las imágenes vistas al microscopio durante el curso. Cuando no se indica otro origen, debe entenderse que las numerosas láminas que ilustran este Manual han sido tomadas de preparaciones originales. Afortunadamente, hemos hallado en la Srta. K. Wangerin, dibujante científica de la Universidad de Halle, una insigne colaboradora de gran valía, tanto por sus conocimientos y probidad técnica como por su arte exquisito, razones que nos obligan a expresarle nuestro agradecimiento en este lugar. Algunas láminas, con indicación de su procedencia, se han tomado de las siguientes obras:

Jochmann, *Lehrbuch für Infektionskrankheiten* (Berlín, J. Springer). Hartmann und Schilling, *Die pathogenen Protozoen* (del mismo editor). R. O. Neumann und M. Mayer, *Wichtige tierische Parasiten und ihre Uebertrager* (Lehmanns medizinische Atlanten, tomo XI, Munich, J. F. Lehmann), von Gruber, Rubner und Ficker, *Handbuch der Hygiene*, tomo III, parte 2. (Leipzig, S. Hirzel.)

Muchos de los grabados de instrumentos de laboratorio proceden del catálogo de la casa F. & M. Lautenschlaeger, Berlín.

Finalmente, no queremos terminar estas líneas sin testimoniar a la Casa editora nuestro más profundo agradecimiento, tanto por su desprendimiento como por las facilidades otorgadas para la espléndida presentación de este libro.

E. Gotschlich. W. Schürmann.

Giessen y Halle, Febrero de 1921.

ÍNDICE DE MATERIAS

PARTE GENERAL

Págs.

I. **Concepto y clasificación de los microorganismos patógenos.** 1

II. **Morfología general y métodos de estudio de los microparásitos.**

A. *Caracteres morfológicos de los microparásitos.*

1. Formas normales y degeneradas 6
2. Núcleo. 11
3. Producción de formas de resistencia (esporos). 12
4. Cápsulas 15
5. Flagelos. 16

B. *Métodos de estudio de los microparásitos.*

1. El microscopio y su empleo en los trabajos microbiológicos 20
2. Examen de los microorganismos en preparaciones teñidas e incoloras 27
3. Métodos especiales de coloración. 36

III. **Biología general y métodos de cultivo de los microorganismos.** 40

1. Condiciones necesarias para la vida de los microorganismos 54
2. Manifestaciones vitales de los microorganismos. 58

IV. **Los microorganismos considerados como gérmenes patógenos** 61

V. **Inmunidad.**

1. Generalidades. 74
2. Antitoxinas. 82
3. Bacteriolisinas 84
4. Opsoninas y bacteriotropinas. 87
5. Aglutininas. 89
6. Precipitinas. 95
   Apéndice : Termoprecipitación 99
7. Hemolisinas 100
8. Fijación del complemento y reacción de WASSERMANN.... 104
9. Hipersensibilidad (Anafilaxia) 114
   Apéndice : Vacunación y Bacterioterapia 117

Págs.

VI. **Circunstancias que determinan la muerte de los microorganismos (Desinfección)** 122
Apéndice al capítulo VI : Quimioterapia. 131

VII. **Existencia de los microparásitos y su comprobación en la naturaleza inanimada** 133

VIII. **Indicaciones técnicas para los trabajos microparasitológicos en el laboratorio.**
1. Instalación y dotación del laboratorio. 142
2. Precauciones que deben observarse al manejar material infeccioso 144
3. Investigación en animales. 150
4. Autopsia 153

PARTE ESPECIAL

A. **Bacterias patógenas.**

I. *Cocos patógenos.* 155
1. Estafilococos piógenos (Streptococcus pyogenes) 156
2. Estreptococos piógenos. 159
3. Neumococo (diplococcus lanceolatus) 161
4. Gonococo. 165
5. Meningococo 169
6. Micrococcus tetragenus. 173
7. Sarcinas 174

II. *Bacilos patógenos* 175
1. Bacilo del carbunco (bacillus anthracis) 177
2. Productores de toxinas del grupo de los bacilos del heno 183
3. Bacilo del tétanos. 184
4. Bacilos del edema maligno 187
5. Bacilos de la gangrena gaseosa (flemón gaseoso) 189
6. Bacilo del carbunco sintomático 190
7. Bacillus botulinus 191
8. Bacilo piociánico 194
9. Bacilo de la fiebre tifoidea. 194
10. Bacilos paratíficos. 208
11. Bacterium coli 213
12. Bacilos de la disentería 215
13. Bacilos capsulados patógenos 219
14. Grupo de bacilos de la septicemia hemorrágica. 219
Bacilo de la peste 220
15. Grupo de los bacilos hemoglobinófilos 226
Bacilo de la gripe 226
Bacilo de la tos ferina 228
Bacilo de la conjuntivitis. KOCH-WEEKS 230
16. Bacilos del mal rojo del cerdo y de la septicemia del ratón. 230
17. Diplobacilo de MORAX-AXENFELD 231
18. Bacilo del chancro blando (DUCREY) 231
19. Bacilo de la fiebre de Malta (Fiebre del Mediterráneo) 232

Págs.

Difteridos 233
20. Bacilo de la difteria. 234
21. Bacilo del muermo (bacillus mallei) 239
Bacilos ácido-resistentes.
22. Bacilo tuberculoso. 242
23. Bacilo de la lepra 257

III. *Vibriones patógenos.*
Vibrión del cólera asiático 259

B. **Estreptotrices patógenos.** 269
Actinomicetos 269

C. **Hifomicetos y blastomicetos patógenos.** 273

D. Espiroquetos. 280
1. Espiroqueto de la fiebre recurrente 282
2. Espiroqueto de las aves. 284
3. Espiroqueto de la enfermedad de WEIL (Espiroqueto icterógeno). 285
4. Espiroqueto de la sífilis (Espiroqueto pálido) 288
5. Espiroquetos en la angina de PLAUT-VINCENT. 293

E. **Protozoarios patógenos.** 295
1. Amibas de la disentería. 297
2. Tripanosomas 302
3. Leishmanias 310
4. Plasmodio del paludismo. 312
Plasmodias del paludismo de las aves 325

F. Gérmenes patógenos ultramicroscópicos 327
1. Viruela. 329
2. Escarlatina 330
3. Fiebre aftosa 331
4. Tracoma. 331
5. Poliomielitis aguda (Parálisis espinal infantil) 332
6. Rabia 333
Tifus exantemático 338

Apéndice 342
1. Anquilostoma duodenal 343
2. Trichinela spiralis (Triquina) 345
3. Filarias. 348
4. Bilharzia haematobia (Schistosomum haematobium) 349

Indice alfabético 353

PARTE GENERAL

I. Concepto y clasificación de los microorganismos patógenos

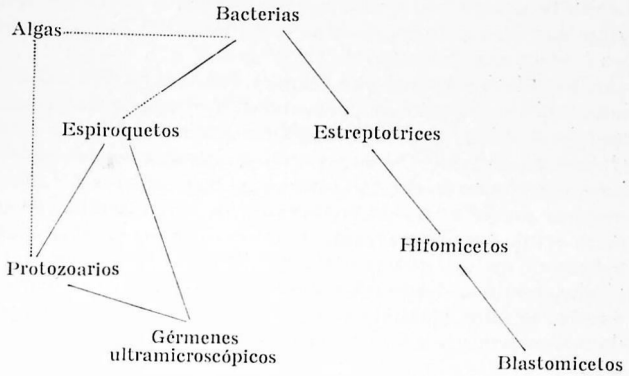
Se denominan microparásitos o microorganismos patógenos unos seres vivos pequeñísimos, sólo perceptibles con grandes aumentos microscópicos, capaces de vivir en las superficies exterior e interior, así como en los tejidos, de organismos animales o vegetales más elevados, a cuyas expensas se nutren. Es frecuente que por tal causa se produzcan trastornos en la vida normal, es decir, enfermedades en el organismo huésped. Como las mismas provienen de la transmisión del microparásito existente en otro organismo, se les da el nombre de enfermedades contagiosas o infecciosas. Sabido es que hay también enfermedades infecciosas causadas por parásitos perceptibles a simple vista (macroparásitos), los cuales pertenecen a las clases de los vermes y arácnidos; y aunque a estas enfermedades, para diferenciarlas de las infecciosas causadas por los microorganismos, se las llama « enfermedades de invasión », la separación es caprichosa, puesto que ni los fenómenos biológicos derivados del ataque del agente al organismo, ni el carácter epidémico de las enfermedades en uno y otro caso, permiten establecer diferencias fundamentales entre las infecciones causadas por micro o macroparásitos.

Vemos, pues, que el concepto de microparásitos o microorganismos patógenos se opone tan sólo, en apariencia, al de macroparásitos perceptibles a simple vista; y como, además, los microorganismos pertenecen a clases muy diferentes del sistema biológico,—pues mientras los hay con decidido carácter de planta, otros lo tienen marcadamente animal, y un tercer grupo se mantiene en el límite de ambos reinos,—hemos de justificar, con otras razones, el nombre común de microparásitos y su agrupación al estudiarlos. Es lógico obrar así, en primer lugar, porque los métodos aplicables a su conocimiento les son comunes, pues en todos se impone la técnica microscópica, y, además, lo que es más esencial, por el gran interés médico que ofrecen los microorganismos como agentes de las enfermedades infecciosas

más importantes. Esta cualidad patógena de los microparásitos hizo que su estudio afectase más cada día los dominios de la Medicina, aunque como seres vivos debieran encontrar su puesto entre las ciencias propiamente biológicas, como la Zoología o la Botánica, separándose aún más del campo de estas ciencias al relacionarse con su conocimiento puntos de vista y temas completamente extraños a ellas, como el estudio de los procesos de desinfección e inmunidad. Justifica también la agrupación separada de los microorganismos el distintivo común a todos ellos, de ser monocelulares, al contrario de los macroparásitos, que son seres vivos pluricelulares. Fijados estos principios, queda bien definido el reino de los microorganismos, porque el monocelular reúne en sí las funciones vitales más distintas, mientras que el pluricelular, aun en los grados de desarrollo más inferiores, presenta siempre una diferenciación o distribución de las diversas manifestaciones vitales, según las distintas agrupaciones de células que constituyen los órganos. Cuanto más ha ido progresando el conocimiento de los microorganismos monocelulares y cuanto más numerosas y variadas han sido las especies descubiertas, tanto más evidentes han aparecido las relaciones biológicas entre representantes aislados de diversos órdenes que al principio parecían completamente distintos, de tal modo, que hoy puede aventurarse el ensayo de presentar una clasificación natural de los microorganismos.

Para ello, lo mejor es partir de los grupos de bacterias, que por su evolución ocupan los grados más inferiores en la escala biológica; desde éstos el desarrollo filogenético conduce en un sentido a formas puramente vegetales (estreptotrices, hifomicetos y blastomicetos), y en otro, a través del grupo intermediario de los espiroquetos, a animales monocelulares del orden más inferior (protozoarios); finalmente, existe todavía un grupo de microorganismos que presenta dificultades especiales para su clasificación, por tratarse de formas de tal pequeñez, que están más allá del límite de la visibilidad microscópica, y en relación con ello pasan a través de filtros completamente impermeables para los gérmenes de los grupos enumerados anteriormente. Esta dificultad de ser vistos al microscopio les ha valido la denominación de sub o ultramicroscópicos (afanozoarios, según KRUSE), y la cualidad de filtrarse les da el nombre de virus filtrables. La investigación morfológica fracasa por completo frente a estas formas pequeñísimas, como ocurre con el germen de la fiebre amarilla, o es posible únicamente descubrirlas cuando el microparásito se hace visible dentro de las células del organismo atacado, no de un modo aislado como tal microparásito, sino merced a que resulta rodeado por productos de reacción de las células que ataca, productos que son coloreables y permiten así descubrirlo, por lo cual se les denomina clamidozoarios (v. PROWAZEK) o estrongiloplasmas (LIPSCHÜTZ). A pesar de las dificultades para su estudio, las cualidades biológicas de estos entes ultraminúsculos permiten atribuirles cercano parentesco con los protozoarios y espiroquetos.

Una clasificación natural de los microorganismos puede representarse según el siguiente esquema:



El estrecho parentesco entre las bacterias y las algas es de interés puramente biológico, pues no tiene importancia inmediata para la Medicina, toda vez que hasta hoy no se conocen algas parásitas de los animales, y, en cambio, las hay que guardan gran semejanza con algunos protozoarios flagelados.

Los distintos grupos de microbios presentan, brevemente expuestas, las siguientes características:

1. **Bacterias**, llamadas también esquizomicetos u hongos fisíparos por su íntimo parentesco con los hongos; son microorganismos monocelulares desprovistos de clorofila (con excepción de algunas especies saprofíticas), de forma sencillísima, esferoidal, alargada o helicoidal; se multiplican únicamente por división transversal, y en su consecuencia nunca se separan en sentido longitudinal, demostrando una extraordinaria diversidad de caracteres específicos, tanto en las condiciones que requieren para vivir, como en sus distintas manifestaciones biológicas.

2. **Estreptotrices** (hongos radiados). Aunque muy parecidos, se diferencian de las bacterias de forma bacilar en que presentan verdaderas ramificaciones y terminaciones en forma de maza, y crecen radialmente a partir de un centro. Ciertas especies, como los bacilos de la tuberculosis, del muermo y de la difteria, que en rigor pertenecen a los estreptotrices por razón de su morfología, se cuentan entre las bacterias en el lenguaje corriente de la Medicina, costumbre que seguiremos en nuestra exposición, porque en los organismos infectados adoptan casi exclusivamente la figura de bacterias, y las formas de crecimiento más superiores, las ramificadas, sólo en circunstancias especiales se consiguen por cultivo.

3. **Hifomicetos** u hongos filamentosos. Presentan el aspecto de una ramificada red (micelium) de filamentos (hifos), sobre la cual

resaltan, con su configuración especial, los esporangios conteniendo los esporos. En cuanto a la reproducción, tiene lugar en algunas especies la generación sexuada (copulación). A partir de los hifomicetos y hongos filamentosos el desarrollo filogenético pasa en un sentido a los hongos superiores y en otro a los

4. **Blastomicetos,** que después de su aparición presentan formas indudablemente más sencillas que los complicados hifomicetos; pero que sin embargo podemos considerarlos descendientes de ellos, porque el micelio hifomiceto característico, sumergido en un caldo de cultivo, sigue creciendo en forma de blastomiceto. Estos toman su nombre de la forma característica de su reproducción, en la cual, de la célula madre esferoidal o alargada salen abultamientos laterales a manera de yemas o brotes, que, por su parte, llegan a ser nuevas células madres, desprendiéndose entonces de la que los creó. Por lo demás, algunos blastomicetos, como el oidium y el muguet, además de reproducirse por brotes, crecen por filamentos ramificados, de manera semejante al micelio de los hifomicetos, con lo cual demuestran su próximo parentesco con éstos.

Así hemos llegado a trazar el árbol genealógico del desarrollo filogenético, que partiendo de las bacterias, une a éstas con las formas más elevadas del reino vegetal; desde el mismo origen, pero en otro sentido, veremos las relaciones entre las bacterias y los seres vivos del reino animal.

5. Los **espiroquetos** ocupan un lugar intermedio entre los microorganismos animales y las bacterias. Por su forma y movimiento recuerdan las bacterias helicoidales o espirilos, tanto, que en un principio se les confundía con éstos, y las denominaciones de espiroquetos o espirilos se usaban casi indistintamente. Un estudio más detenido condujo a conocer sus diferencias morfológicas, puesto que en los espirilos el cuerpo de la célula es relativamente rígido, en tanto que en los espiroquetos es extraordinariamente flexible. Es discutible la cuestión de si en los espiroquetos se presenta también la división longitudinal además de la transversal, o aun sólo la primera, por lo que también es dudosa la cuestión derivada de ese hecho, de si ocurren en los espiroquetos verdaderas dicotomías. Algunas observaciones, por ejemplo la desaparición de las formas típicas en ciertas fases del desarrollo de las infecciones debidas a espiroquetos (fiebre recurrente), así como la aparición de gérmenes filtrables de tamaño ultramicroscópico, inducen a creer que el ciclo de desarrollo de los espiroquetos es más vario que el de los espirilos, pues éstos, como todas las bacterias, repiten indefectiblemente el mismo tipo morfológico. Hay que añadir a esto que la forma adulta o superior de algunas especies se ha observado en un insecto que representa el papel de intermediario, hecho que pertenece en absoluto a los parásitos animales.

6. **Protozoarios.** Son seres vivos monocelulares del reino animal, de formas muy variadas y reproducción sexuada, que no constituyen su protoplasma sintéticamente de combinaciones químicas sencillas,

como ocurre en las bacterias, estreptotrices, hifomicetos y blastomicetos, sino que necesitan nutrirse de substancias albuminoideas de complicada composición molecular, y, en ocasiones, como en las amibas, exigen elementos orgánicos formes. Los distintos géneros y especies entre sí, así como cada una de éstas durante su desarrollo, presentan gran variedad de formas; junto a la reproducción vegetativa sencilla por división transversal o longitudinal, o por partición en numerosos trozos, se observa también en muchas especies un desarrollo sexual más o menos complicado que coincide con metamorfosis en un huésped intermediario, que suele ser un mosquito o un ácaro; a todo ello hay que añadir las amplias diferencias morfológicas de cada individuo. En analogía con la variedad de órganos de los metazoarios, aunque los protozoarios son organismos monocelulares, se encuentra ya en ellos cierta distribución de las funciones entre determinadas partes del compuesto celular («organitos»); así, por ejemplo, la locomoción se efectúa por prolongaciones protoplasmáticas (seudópodos), por medio de flagelos o por una membrana ondulada; en algunas especies se encuentra una vacuola alimenticia especial, visiblemente destinada a fines digestivos; en el plasma se distingue un endoplasma granuloso y un ectoplasma hialino; a esto se une en algunas especies la formación de una substancia envolvente, formas quísticas; pero, sobre todo, siempre se diferencia morfológicamente el núcleo de una manera clara. Junto al núcleo principal se encuentra en los flagelados una formación secundaria, a manera de núcleo también, de la cual salen los flagelos, que por lo mismo se llama raíz de los flagelos (blefaroplasto).

7. **Gérmenes ultramicroscópicos.** Antes hemos hablado brevemente de sus relaciones biológicas con los espiroquetos y protozoarios. Es sorprendente que, a pesar de conocerse ya un número considerable de especies submicroscópicas de gérmenes patógenos, no se haya descubierto ningún germen saprofítico de tal tamaño, aun cuando debiera notarse su presencia, por ejemplo, al pasar líquidos corrompidos por filtros impermeables para las bacterias.

El establecer una clasificación natural de los microorganismos, como se ha intentado en los párrafos precedentes, se apoya, dentro de lo posible, en el estado actual de nuestros conocimientos y en el conjunto de cualidades morfológicas y biológicas de los microbios. Si los caracteres morfológicos desempeñan un papel de singular importancia en esta clasificación, no ha sido, ciertamente, porque se haya hecho resaltar más de lo debido, con objeto de distinguirlos, una característica llamativa, sino porque los caracteres morfológicos son en todos notablemente constantes y específicos, mientras que las cualidades biológicas están sometidas a muy numerosas variaciones. Un solo ejemplo lo demostrará: la presencia de un solo flagelo polar define de tal modo el vibrión del cólera, que la existencia de vibriones con varios flagelos excluye desde luego el diagnóstico de cólera. Es claro que podría intentarse una clasificación de microbios en la que se tuviera en cuenta, en primer término, las características nutritivas, agrupándolos según

que fuesen capaces de formar, por síntesis, combinaciones sencillas de albúminas o necesitasen albúminas preformadas. Asimismo podrían clasificarse atendiendo a los procesos de fermentación a que diesen lugar en los medios de cultivo, y, por último, podría también elegirse, como fundamento de una clasificación, la capacidad patógena de los gérmenes en el organismo de los animales. De antemano podemos afirmar que todos estos intentos estarían condenados al fracaso, porque al clasificar así separaríamos lo que está unido, y uniríamos artificialmente lo que no tiene conexión natural. Según veremos más adelante, las propiedades químicas y la acción patógena están representadas, de la manera más variable, en cada grupo particular y en las subdivisiones, en relación con su adaptación filogenética (por ejemplo, grupo de bacilos tíficos, grupo de bacilos disentéricos y formas saprofíticas afines).

Como principio de clasificación más práctico nos ha parecido preferible utilizar las características morfológicas para delimitar los grandes grupos; dentro de ellos, diferenciar las familias por sus caracteres biológicos, y, finalmente, para definir las especies, ha sido necesario muchas veces atenerse a la capacidad patógena y a las reacciones específicas de inmunidad como únicos criterios posibles.

II. Morfología general y métodos de estudio de los microparásitos

A. Caracteres morfológicos de los microparásitos

En este capítulo se estudiarán detalladamente estos caracteres, atendiendo especialmente a las bacterias en lo que no haya sido citado al tratar de la clasificación de microbios, dejando para la segunda parte de este libro, en capítulos especiales, el estudio de las particularidades de las demás clases de los microparásitos. La distinción especial hecha para las bacterias está justificada por varias razones. Si bien, para las enfermedades infecciosas de los climas cálidos, es, por lo menos, igualmente importante el conocimiento de los protozoarios, dadas las circunstancias de nuestro país, las bacterias, por su número y variedades, tienen una importancia especialísima para el clínico y el bacteriólogo. No en vano desde los grandes descubrimientos de Koch fueron el punto de partida de los métodos de estudio al microscopio, y aun hoy es más corriente emplear el término bacteriología que su sinónimo microparasitología.

1. Formas normales y degeneradas

Clasificación de las bacterias según su morfología

El sistema morfológico, fundado por F. Cohn (1872), basándose en la constancia de la forma tanto en los individuos como en las agrupaciones de las bacterias, conserva hoy todo su valor. Según tal sistema se distinguen tres formas fundamentales de bacterias: la esferoidal, la cilíndrica o de bastoncito y la helicoidal. Estas tres formas fundamentales corresponden a tres grupos morfológicos bien caracterizados: cocos, bacilos y espirilos. La ley de la permanencia de la forma, en virtud de la cual, de una bacteria esferoidal se origina siempre otra bacteria esferoidal, y de una cilíndrica otra de esta misma forma, puede únicamente experimentar una alteración cuando por desfavorables condiciones de cultivo surgen, con caracteres de permanencia, formas degeneradas o de involución que se diferencian mucho de las primitivas, pero estos individuos anormales no pueden admitirse más que como



Fig. 1. Distintos tipos morfológicos de cocos (aumento 1 : 1000)
a, estreptococos; *b*, estafilococos; *c*, gonococos; *d*, tetrágenos; *e*, diplococos; *f*, sarcinas

estados pasajeros de los normales. Trasladados a un medio de cultivo apropiado reaparecen de nuevo las formas típicas.

Dentro de los tres grupos citados se observa una gran variedad de formas; así, entre los cocos esféricos, como son, por ejemplo, los estafilococos y estreptococos, se encuentran variedades de forma lanceolada como los neumococos, y los gonococos y meningococos aplastados por una de sus caras en forma de bollo. Los bacilos se diferencian, según la relación del grueso a la longitud, en delgados cuando esa relación varía entre 1 : 4 y 1 : 10, y gruesos o cortos en los que la misma relación es próximamente de 1 : 2; estos últimos y las bacterias ovoidales son un tipo intermedio entre los bacilos y los cocos. Los extremos de los bacilos son planos o redondeados, y las caras laterales paralelas o incurvadas; hay también bacilos con los extremos aguzados en punta (bacilos fusiformes), que se encuentran siempre en la angina de Vincent. La división de los bacilos se produce siempre según un plano perpendicular al eje longitudinal. Los bacilos nuevamente formados pueden separarse por completo del que los originó, constitu-

yendo así individuos enteramente independientes. Puede ocurrir también que el bacilo nuevo guarde cierta dependencia con el primitivo, y ocurre entonces que, a medida que la reproducción aumenta, se van formando cadenas de agrupaciones en las que es muy difícil apreciar la separación celular, sobre todo en preparaciones no teñidas. De este modo se forman los llamados seudofilamentos o cadenas de bacilos, como puede verse en el capítulo sobre el bacilo del carbunco, en el cual aparece más clara esta tendencia al cultivarlo en medios artificiales. Otros bacilos que no forman cadenas, como el de la difteria, pueden constituir agrupaciones características en forma de Y o de V, o agruparse paralelamente a manera de empalizada.

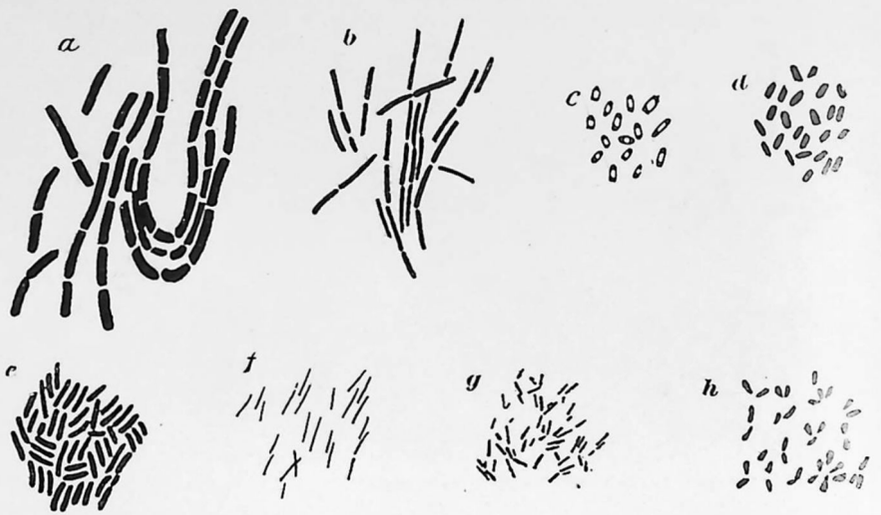


FIG. 2. Diversos tipos morfológicos de bacilos (aumento 1 : 500)
a, bacilo del carbunco; *b*, bacilo subtilis (sin esporos); *c*, esporos del bacilo subtilis; *d*, colibacilo; *e*, bacilo de la fiebre tifoidea; *f*, bacilo del mal rojo del cerdo; *g*, bacilo de la difteria; *h*, bacilos seudodiftéricos

Los espirilos presentan también variedades importantes según la forma y proporción entre el espesor y la longitud, así como en el número de vueltas de la espiral. Se llaman vírgulas o vibriones, aquellos microorganismos ligeramente incurvados (como una coma), semejantes a una fracción de vuelta de espiral; próximamente llegan a representar hasta la mitad de una de estas vueltas. Los espirilos propiamente dichos se componen de una o de varias vueltas completas.

Para la clasificación de las bacterias ha de tenerse en cuenta no sólo la diversidad de formas de los individuos, sino también la manera de reunirse en grandes agrupaciones, manera que, a su vez, guarda relación con los fenómenos de división de las bacterias. En los cocos se forman agrupaciones semejantes a racimos (estafilococos) si la división ocurre sin orientación determinada, o se forman agrupaciones en cadena si la división se verifica constantemente siguiendo una

dirección determinada (estreptococos). Aparecen disposiciones en forma de tableta por la división bacteriana según dos planos perpendiculares, como en el micrococo tetrágeno. Por último, la división puede verificarse regularmente en tres planos perpendiculares, resultando entonces montones de cocos en forma de paquetes o fardos de mercancías, como sucede en las sarcinas (*V.* fig. 1, pág. 7).

Además de estas agrupaciones típicas, existen otras formas de crecimiento que se separan de la regla, generalmente por acercarse a formas de crecimiento de orden más elevado (formas teratológicas según MAASSEN), indicando así el parentesco de ciertas especies de bacterias con los estreptotrices e hifomicetos, y en condiciones favora-

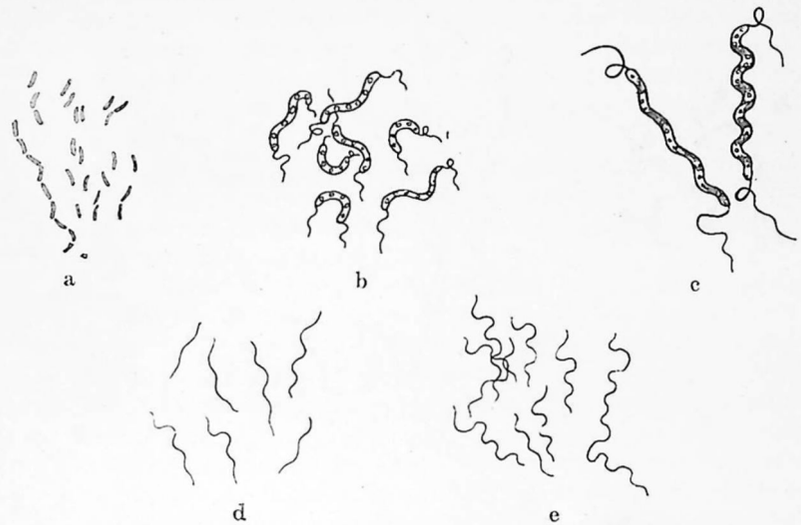


FIG. 3. Diversos tipos de vibriones, espirilos y espiroquetos (aumento 1 : 1000)
a, Vibrión del agua; *b*, gran espirilo de la putrefacción; *c*, *Spirillum undulans*; *d*, espiroqueto dental; *e*, espiroqueto de la fiebre recurrente

bles, no bien conocidas aún, aparecen verdaderas dicotomías y formas de maza, como ocurre en los bacilos del muermo, de la difteria y de la tuberculosis; según A. MEYER, estas formas constituyen casos atávicos.

Como apariciones atípicas merecen mencionarse, en segundo término, las formas degeneradas o formas de involución, que representan, por lo general, una disminución de las energías vitales. Aparecen, en consecuencia, bajo la acción de condiciones desfavorables a su desarrollo. Las formas de involución pueden resultar también de un crecimiento exagerado, sin guardar proporción con los fenómenos de división. Aparecen entonces formas gigantescas o seudofilamentos más o menos largos.

En cultivos viejos, se observan cambios de forma considerables, singularmente, cuando la reacción del medio de cultivo se ha alterado, o cuando son insuficientes las substancias nutritivas necesarias para

el buen desarrollo del cultivo. Las bacterias pierden en estos casos sus formas normales. Sus cuerpos están deformados y aparecen formas fusiformes, esferoidales y de levadura, en las que reconoceríamos con dificultad la descendencia de las típicas bacterias obtenidas poco antes en cultivos puros.

Ciertas formas degeneradas tienen importancia práctica para el diagnóstico, como podrá verse en la parte especial al tratar de los bacilos de la difteria y de la peste.

Ofrecen gran interés los productos de la destrucción o degeneración de bacilos patógenos en el organismo infectado. En los neumococos, por ejemplo, se destruye antes el protoplasma que las cápsulas, quedando éstas vacías como formas de transición. Los bacilos

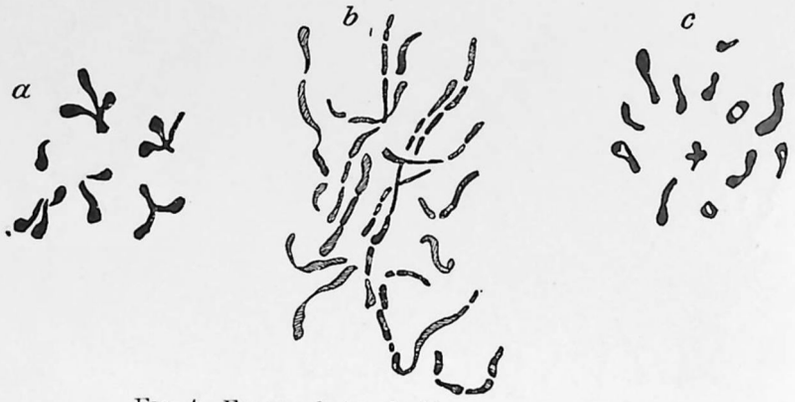


FIG. 4. Formas de involución (aumento 1 : 1000)
a, difteria ; *b*, carbunco ; *c*, bacilo de la peste

de la peste, en el pus de los bubones y especialmente en el organismo de las ratas, adoptan formas particulares redondeadas o vesiculares. Respecto de las formas degeneradas del vibrión del cólera y del bacilo tifóidico, cuando se les somete a la influencia de suero bacteriolítico, véase lo expuesto en el capítulo correspondiente.

Trasladando las formas degeneradas a un medio de cultivo favorable se comprueba que estas formas atípicas recobran las antiguas formas normales, lo cual demuestra que aun conservaban su vitalidad.

Modificando la presión osmótica pueden producirse otras alteraciones en la forma de las bacterias. La membrana de éstas, como el protoplasma, posee distinta permeabilidad frente a diferentes materias en solución. Entre el interior de las células bacterianas y el líquido exterior, existe una diferencia de presión de un valor determinado. Al secarse el líquido y aumentar el contenido en sales, ha de producirse un cambio en la presión osmótica, y las células bacterianas tratan de compensarlo variando su propia presión osmótica interior.

Según las investigaciones de A. FISCHER acerca de la permeabilidad de las membranas respecto a las sales, etc., se pueden establecer dos grupos distintos :

1. Grupo de especies, relativamente permeables, que restablecen con rapidez el equilibrio osmótico.

2. Grupo de especies relativamente impermeables, en las que, al elevarse repentinamente la presión osmótica, la compensación es muy lenta o no se verifica, por lo cual el protoplasma se contrae, y poco a poco se despega de la cubierta pudiendo llegar a separarse de ella.

Este fenómeno se llama *plasmolisis*. Con ello puede resultar la muerte de la célula, o el proceso retrocede al desaparecer el exceso de presión y el protoplasma recobra su situación en la membrana celular.

Se puede observar en algunos casos la plasmolisis dejando secar unas gotas de una suspensión de bacterias sobre el cubreobjetos. En algunas especies se observa con regularidad el fenómeno de la coloración polar utilizable para el diagnóstico diferencial ; los extremos de la bacteria a los cuales se ha retirado el protoplasma, están intensamente teñidos, en tanto que el centro resalta por vérsele vacío e incoloro, como ocurre en los bacilos de la peste y en los del cólera de las gallinas.

Las bacterias, especialmente las impermeables, se hinchan al trasladarlas de un medio rico en sales a otro más pobre, sobreviniendo una rotura de la cubierta por la cual sale el plasma. Este fenómeno se llama *plasmotisis*.

Ambos fenómenos pueden desarrollarse en cualquier parte al perecer las bacterias, bien sea en el cuerpo de los animales, en los cultivos o en medios externos, en el agua, por ejemplo. Estos trastornos osmóticos son de gran importancia para comprender algunos fenómenos biológicos, entre ellos la influencia del contenido salino de los medios de cultivo, y, sobre todo, las alteraciones que aparecen rápidamente en algunas especies sensibles hasta en una solución de suero fisiológico : por esta razón se estudia siempre el movimiento de las bacterias en caldo y no en solución fisiológica.

2. Núcleo

Como se ha dicho al principio, en los protozoarios existe siempre un núcleo perceptible (en ocasiones en la mayoría de los individuos) ; las bacterias, en cambio, aparecen homogéneas, lo mismo sin coloración que si se las tiñe con anilinas, no señalándose en ellas diferenciación entre núcleo y plasma, como se percibe en todas las demás células. Esta apariencia homogénea del cuerpo de las bacterias indujo a admitir que carecían de núcleo; pero como, por otra parte, demuestran una afinidad muy grande para teñirse con las anilinas básicas, que son excelentes colorantes nucleares, esta afinidad conduce a la hipótesis inversa, es decir, a considerar todo el cuerpo de la bacteria como un núcleo celular, en tanto que el plasma permanecería invisible. La verdad está quizá entre las dos hipótesis. Las bacterias no parecen tener un núcleo en sentido morfológico, como todas las demás células, pero tienen, probablemente, abundante substancia nuclear irre-

gularmente repartida por toda la bacteria, como se deduce al teñirlas por el método de Romanowsky-Giemsa. Existiría en ellas, por consiguiente, una diferenciación química, pero no morfológica respecto al protoplasma y núcleo.

El cuerpo de las bacterias contiene, según esto, substancia nuclear (cromatina) mezclada con el protoplasma (endoplasma). Además, poseen las bacterias una cubierta exterior, visible mediante métodos especiales, llamada ectoplasma. El cuerpo de la bacteria propiamente dicho, consiste en una substancia que forma su armazón, clara y débilmente tingible, el endoplasma, con la arquitectura de panal característica del protoplasma, en cuyas celdillas se encuentra la substancia nuclear tan afín de las materias colorantes, la cromatina, la cual en algunos puntos es tan abundante que llega a cubrir por completo el endoplasma. La cromatina y el endoplasma reunidos componen el llamado cuerpo central. Este se halla rodeado de ectoplasma, que es más abundante en los polos, y de él parten los órganos de locomoción, los flagelos. Algunas bacterias parecen compuestas exclusivamente de cromatina. En ellas el endoplasma existe, probablemente, en cantidad muy escasa y está mezclado muy íntimamente con la cromatina.

A veces se encuentran en el cuerpo de las bacterias uno o varios gránulos, condensaciones del protoplasma, que se distinguen por su gran afinidad con las materias colorantes. Como la mayor parte de las veces ocupan los extremos o polos, se les llama también gránulos polares. Más corriente es aún designarlos con el nombre de sus descubridores, denominándolos corpúsculos de Babés-Ernst. Su significación morfológica y fisiológica no está clara todavía. En los bacilos de la difteria se les puede teñir de color distinto del resto del protoplasma mediante el método de doble coloración debido a M. Neisser; respecto de la importancia de este método para el diagnóstico diferencial, véase el capítulo Difteria.

El ectoplasma, que en la coloración corriente permanece incoloro, es una substancia concentrada relativamente pobre en agua, como se deduce de su gran resistencia a teñirse y de su influencia desfavorable para la coloración. Del ectoplasma salen los flagelos. En el límite entre el ectoplasma y el cuerpo interior se forma en algunas bacterias una verdadera membrana, en la cual, en el bacilo de la tuberculosis, por ejemplo, se encuentran substancias grasas o céreas. Por hinchazón y endurecimiento del ectoplasma se pueden formar verdaderas cápsulas (*V.* el capítulo Formación de cápsulas).

3. Producción de formas de resistencia (esporos)

Formas de resistencia bien caracterizadas (esporos) se observan en los hifomicetos y blastomicetos, así como en algunas bacterias. Lo que llamamos esporulación de los protozoarios es completamente distinto de la formación de esporos en los microorganismos vegetales, y representa más bien una modalidad especial de reproducción

(*V.* la sección especial correspondiente). La formación de esporos en los hifomicetos se verifica de una manera muy diferente, correspondiendo a la elevada diferenciación de estos hongos (*V.* el capítulo correspondiente en la parte especial).

Los blastomicetos y las bacterias producen solamente una forma de esporos, la endógena.

La aparición de estas formas de resistencia se produce siempre bajo la influencia de la edad de los cultivos, de su agotamiento o de otras influencias repentinas y exteriores siempre desfavorables. La formación de esporos sirve, por consiguiente, para la conservación de la especie. Hasta hoy sólo ha sido estudiada en los bacilos, y entre las variedades patógenas de éstos, sólo se observa en el bacilo del carbunco, en los anaerobios patógenos (bacilo del tétanos, del edema maligno y del carbunco sintomático) y también en algunas bacterias tóxicas (bacilos botulinos y bacilos peptonizantes de la leche); en los cocos y espirilos no se ha observado aún la formación de esporos.

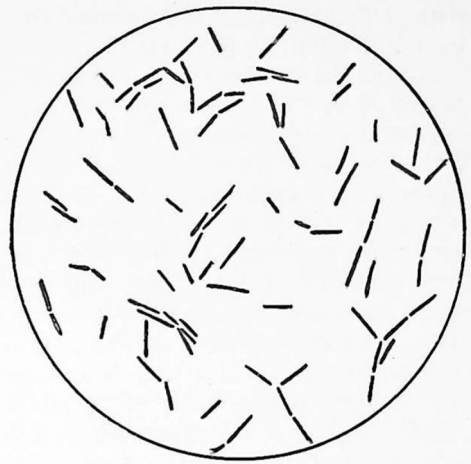


Fig. 5. Bacilo *subtilis*, cultivo reciente. Coloración de Gram (aumento 1 : 500)

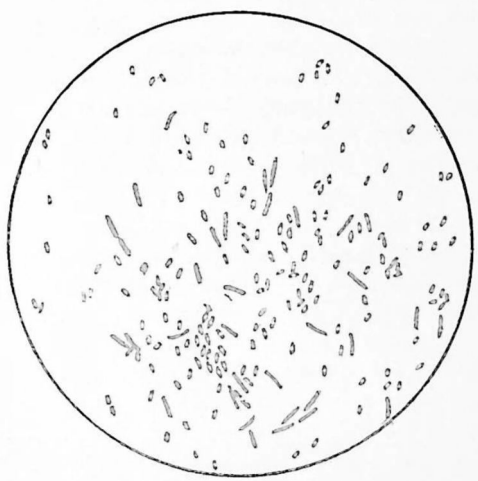


Fig. 6. Bacilo *subtilis*, cultivo viejo. Bacilos y esporos. Coloración con fucsina fenicada diluída (aumento 1 : 500)

Respecto de las circunstancias en que se forman estos esporos endógenos, puede afirmarse que cuando el desarrollo es abundante y constantes las condiciones favorables, no se producen nunca esporos. De esto depende el que no se lleguen a formar en el interior de los organismos enfermos. Aparecen principalmente al alterarse los medios de cultivo y cuando los gérmenes son transportados repentinamente a un medio desfavorable, agua destilada, por ejemplo. Con frecuencia se necesitan, además, otras condiciones, como la presencia de ácidos libres en los aerobios, una temperatura determinada, etc.

Los esporos aparecen muy refringentes, con figura esférica o elíptica, dentro del cuerpo de los bacilos, o como esporos sueltos después de destruídos aquéllos. Ofrecen una gran resistencia a la sequedad, el calor y las substancias químicas. La forma, el tamaño y la situación de los esporos son constantes para cada especie de bacteria. En el bacilo del carbunco, por ejemplo, los esporos aparecen en el centro y en el del tétanos en los extremos. En este último caso es cuando se habla de formas en palo de tambor, de clavo, de alfiler o de cazo. En el bacilo del carbunco el diámetro transversal del esporo es tan grande como el de la célula madre. Cuando el diámetro es mayor que el de la célula madre, surgen en ella abultamientos, las formas llamadas de clostridio. En general, cada célula madre contiene únicamente un esporo, que al destruirse aquélla queda libre y en circunstancias favorables engendra de nuevo formas bacterianas vivas. En cada esporo se distingue un cuerpo interior, llamado también cuerpo brillante, y una membrana a la cual quedan adheridas alguna vez, después de liberarse de la célula madre, restos de protoplasma.

El gran poder refringente y difícil coloración de los esporos se debe, en parte, a la condensación del protoplasma y en parte también a las substancias grasas de la membrana. Los esporos de las bacterias no se tiñen con las soluciones usadas ordinariamente en bacteriología, por lo cual resaltan como puntos claros en el protoplasma teñido de la bacteria. Para teñir los esporos se requieren procedimientos más enérgicos (*V.* Coloración de esporos en los MÉTODOS ESPECIALES DE COLORACIÓN).

La formación de esporos se observa en gota pendiente y platina caliente, apareciendo, según MÜHLSCHLEGEL, finísimos corpúsculos en el protoplasma de la bacteria, tanto que ésta parece como espolvoreada ; por la acción mutua y fusión de estos corpúsculos esporógenos con el protoplasma aparece una zona muy refringente, que se separa luego por una membrana del resto del protoplasma (fig. 7).

Puede aprovecharse para el diagnóstico diferencial, pues es distinta en las diferentes bacterias, la manera cómo los esporos engendran de nuevo formas vegetativas colocados en condiciones de desarrollo favorables.

En el bacilo del carbunco, por ejemplo, el esporo, después de perder su gran poder refringente se alarga ; la membrana se rompe por un extremo y el nuevo bacilo sale por la ruptura; su nacimiento es polar, por consiguiente. El bacilo empieza entonces a reproducirse por división transversal. El bacilo subtilis, en cambio, se engendra lateralmente. BURCHARD ha descrito también el nacimiento bipolar.

BEHRING ha conseguido bacilos sin esporos, razas llamadas asporógenas, mediante cultivo prolongado en medios adicionados de lejía de sosa, ácido rosólico , safranina, verde malaquita, etc. ROUX obtuvo el mismo resultado por cultivos en medios a los que añadía escasas cantidades de fenol, o eran mantenidos a temperaturas de 40° y 41°.

Los artroesporos descritos por algunos investigadores como de BARY, HUEPPE, WINOGRADSKY, que según ellos resultaban de la destrucción de bacterias o de la multiplicación gemípara, son sencillamente formas de involución y en manera alguna representan formas de resistencia, en el sentido de las descritas anteriormente como esporos endógenos; son formas que carecen de la resistencia a los agentes exteriores característica de los esporos.



FIG. 7. Formación de esporos (aumento 1 : 1000) *a*, en el bacilo del carbunco ; *b*, en el bacilo *subtilis*; *c*, el mismo en doble coloración

Los esporos de las bacterias se utilizan para ensayos de desinfección por su gran capacidad de resistencia. Los objetos empleados como testigos de la prueba (generalmente hilos de seda con bacilos de carbunco secos) en parte al descubierto y envueltos otros, se exponen al vapor a presión o circulante, o se introducen un tiempo dado en una solución desinfectante. Terminada la desinfección se comprueba la capacidad de desarrollo de los esporos por el cultivo.

4. Cápsulas

En muchas bacterias patógenas y saprofíticas se puede comprobar la existencia de una envoltura clara, mucosa, que rodea el cuerpo de la bacteria. Estas envolturas o cubiertas denominadas cápsulas se tiñen muy débilmente con las materias colorantes ordinarias y presentan en su contorno, cuando se logra su coloración, una orla delgada teñida intensamente que forma el límite exterior de la cápsula. Las cápsulas son características en algunas clases de bacterias y se las tiene en cuenta para la nomenclatura; así se dice, por ejemplo, bacilo capsulado de PFEIFFER, diplococo capsulado de FRAENKEL-WEICHSELBAUM, bacilo capsulado de FRIEDLÄNDER.

También el bacilo del carbunco forma cápsulas, pero sólo en el cuerpo de los animales, como ocurre con muchas otras bacterias patógenas. (Respecto de la coloración de las cápsulas del bacilo del carbunco para el diagnóstico diferencial, véase el capítulo especial correspondiente.) Se llama zooglea la agrupación de muchas bacterias dentro de una cubierta común. En algunos cultivos (bacilos de la peste) se puede comprobar ya macroscópicamente la presencia de una substancia mucosa intercelular por la formación de filamentos viscosos en el cultivo. La cápsula se produce por hinchazón y endurecimiento del ectoplasma. Contiene mucina o una substancia semejante. Se obtienen bellas preparaciones de cápsulas con las bacterias proce-

dentes directamente de organismos animales; en los cultivos la cápsula está sólo bosquejada la mayor parte de las veces; únicamente en suero sanguíneo no coagulado y en leche, llega a presentarse con intensidad.

La formación capsular significa evidentemente una defensa de los gérmenes patógenos contra las fuerzas del organismo que les son hostiles o contra circunstancias desfavorables del cultivo. Con frecuencia es simultánea con otras alteraciones de significación parecida en el cuerpo de las bacterias, por ejemplo, su resistencia a los sueros, y el llamado «estado animal» de las bacterias, esto es, la adquisición de



FIG. 8. Bacilos del carbunco
Coloración de cápsulas (aumento 1 : 500) según JOHNE

medios de protegerse de las fuerzas defensivas del organismo animal. En otros casos y, especialmente en la formación abundante de substancia mucosa intercelular en cultivos antiguos, se trata probablemente de un fenómeno de degeneración.

La coloración de cápsulas se obtiene, según JOHNE, del siguiente modo:

1. Teñir al calor con solución acuosa de violeta de genciana al 2 %, uno o dos segundos.
2. Lavado con agua.
3. Decoloración con ácido acético al 1 %, seis a diez segundos; lavar y examinar en agua (la preparación no puede conservarse), porque con aceite de cedro o bálsamo del Canadá desaparece la diferencia de refracción. Las bacterias se verán violeta obscuro y las cápsulas violeta claro.

5. Flagelos

Como ya hemos indicado, hay microorganismos que se mueven y otros inmóviles. Los estreptotrices, hifomicetos y blastomicetos no tienen

movimiento propio; mientras que entre las bacterias y protozoarios los hay con y sin movimiento propio; los espiroquetos están siempre dotados de movimiento. Entre las bacterias, también los espirilos (vibriones) tienen siempre movimiento; en cambio, los cocos, fuera de algunas sarcinas, no se mueven. La investigación del movimiento se hace en gota pendiente, pero no de agua, que puede alterar el movimiento, sino de caldo; si no puede apreciarse con seguridad, se lleva la gota a la estufa a fin de proporcionar circunstancias favorables a la locomoción. El movimiento se verifica por medio de expansiones protoplasmáticas con movimientos amiboideos (amibas, plasmodium),

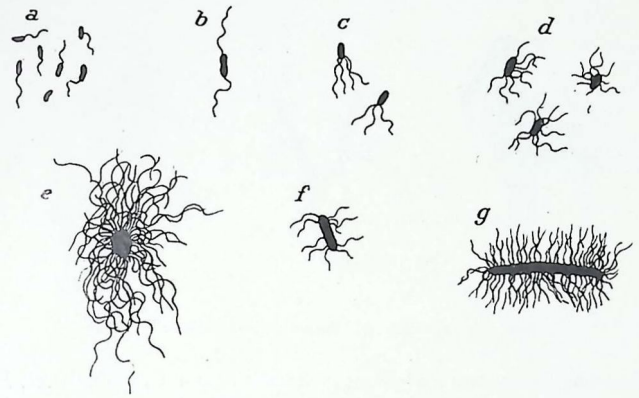


FIG. 9. Diversos tipos de flagelos (aumento 1 : 1000)

o mediante flagelos que, por sus vivos movimientos en espiral o de látigo, hacen progresar los microbios. Los flagelos de las bacterias son de muy distinta naturaleza que los de los protozoarios. En las bacterias son formaciones del ectoplasma, puramente superficiales; en cambio, en algunos protozoarios surgen los flagelos de una formación que contiene cromatina, llamada blefaroplasto, situado en el interior del cuerpo de la célula y distinto del núcleo, aunque semejante a él; desde el blefaroplasto, los flagelos se hallan incluídos en una membrana ondulante.

Es preciso distinguir el movimiento propio de los microbios, del movimiento molecular de BROWN, que se observa no sólo en los microorganismos, sino en todos los cuerpos minúsculos faltos de vida (por ejemplo, en una disolución de tinta china vista en gota pendiente). Este movimiento molecular consiste en pequeñas oscilaciones de partículas pequeñísimas sin que llegue a realizarse un cambio de lugar, una verdadera traslación. La velocidad del movimiento es muy diferente para las distintas clases de bacterias; algunas se mueven tan

de prisa en el campo visual que apenas se puede distinguir su forma (vibrión del cólera); otras, por el contrario, van tan despacio que es difícil distinguir su movimiento del molecular, que se percibe, en cambio, claramente en muchas bacterias como en los cocos y en el bacilo de la disentería. La movilidad de una bacteria puede suspenderse por determinadas influencias exteriores; las temperaturas elevadas (49°-55°) y las muy bajas dificultan el movimiento (rigidez por calor y frío). Transportando los correspondientes cultivos a temperaturas que pudiéramos llamar normales recobran las bacterias su movilidad. En los cultivos viejos de las colecciones de laboratorio, varias especies de bacterias llegan a perder por completo su movilidad.



FIG. 10. Trenzas de flagelos (aumento 1 : 1000)

Los flagelos fueron vistos por primera vez por F. COHN y R. KOCH en preparaciones secas e incoloras de grandes espirilos. Después del perfeccionamiento de la técnica microscópica con el empleo de la iluminación en campo obscuro, que permite observar los microorganismos vivos sin teñirlos, es posible estudiar los flagelos de las bacterias en pleno movimiento, pero su coloración sólo se consigue con procedimientos complicados y muy lentos.

Los flagelos teñidos presentan el aspecto de filamentos finos, cuyo espesor es una pequeña fracción del diámetro de la bacteria, ligeramente ondulados, y sus extremos muchas veces no son agudos. Con la coloración de los flagelos, aparecen teñidos no sólo éstos, sino también la cubierta ectoplásmica del cuerpo de la bacteria, viéndose mucho más voluminosa y espesa que con la coloración ordinaria.

Por razón del número y disposición de los flagelos, las bacterias se denominan:

1. *Atricas*, bacterias sin flagelos, inmóviles (bacilo del carbunco).
2. *Monótricas*, bacterias con un solo flagelo en un polo (vibrión del cólera).
3. *Anfitricas*, bacterias con un flagelo en cada polo (algunos vibriones).

4. *Lofótricas*, aquellas que tienen un haz de flagelos en un polo o en los dos (grandes espirilos).
5. *Perítricas*, las que tienen los flagelos en número variable distribuídos alrededor del cuerpo de la bacteria (bacilo de la fiebre tifoidea).

Los flagelos se desprenden muy fácilmente del cuerpo de la bacteria, observándose entonces repartidos irregularmente por el campo de la preparación. En cultivos recientes, sobre todo si se trata de medios

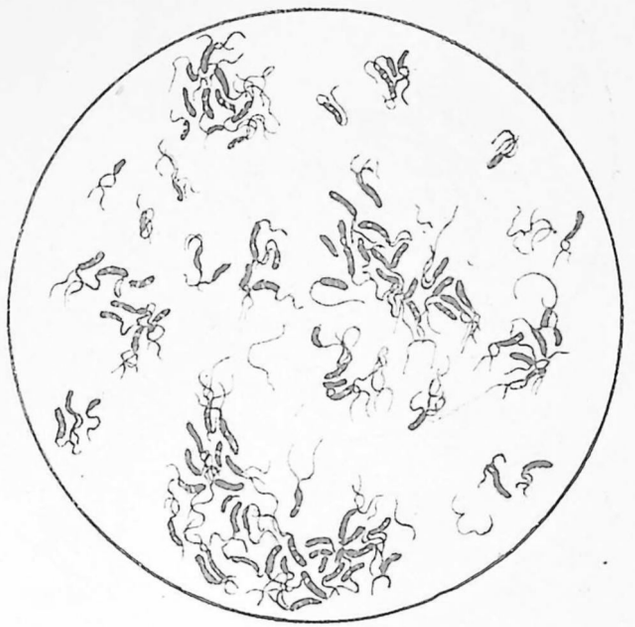


FIG. 11. Grandes espirilos de la putrefacción, con flagelos y vacuolas (aumento 1 : 500)

líquidos, se mantienen con mayor seguridad unidos a la bacteria; en cultivos viejos o en medios sólidos, por el contrario, el motivo más insignificante basta para desprenderlos, por lo cual suelen encontrarse sueltos; basta para ello la extensión grosera con la aguja de platino sobre el cubre, así como el dejar secar rápidamente las gotas. En algunas bacterias, por ejemplo, en el bacilo del carbunco sintomático, al entrelazarse los flagelos sueltos aparecen las llamadas trenzas de flagelos.

Los flagelos se presentan arrollados en espiral. El número de vueltas es mayor en los bacilos, cuyos flagelos cuentan con frecuencia hasta 6 y 7 vueltas de espiral; en los vibriones son menos largos (1-3 vueltas). La mayor parte de los espirilos tienen sólo flagelos de 1-1 $^1/_2$ vueltas. El movimiento de los flagelos es helicoidal como su forma.

Según modernas investigaciones, los flagelos influyen en la aglutinación específica, para lo cual reúnen condiciones favorables por su

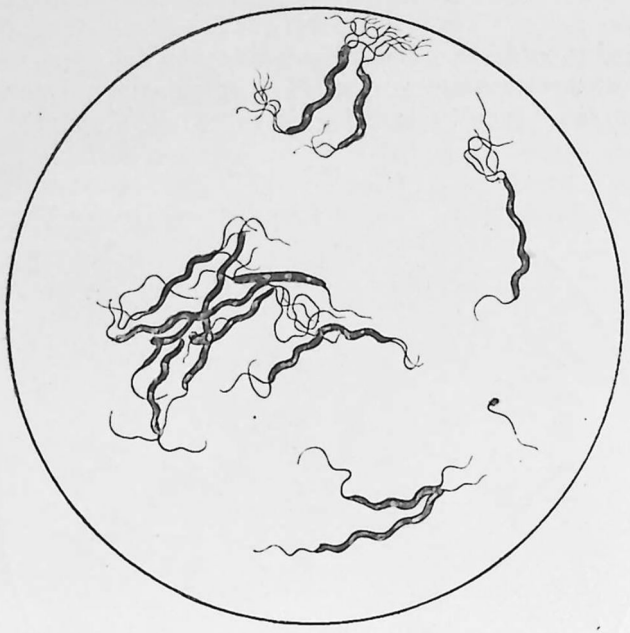


Fig. 12. *Spirillum volutans*. Flagelos teñidos (aumento 1 : 500)

gran desarrollo superficial y por lo que aumenta con ello la capacidad de absorción.

B. Métodos de estudio de los microparásitos

1. El microscopio y su empleo en los trabajos microbiológicos

No entra en el tema de esta obra exponer la teoría y describir al detalle el microscopio como el aparato más necesario para los trabajos bacteriológicos ; ello supondría un conocimiento exacto de todas las cuestiones físicas y matemáticas con él relacionadas. Prácticamente, es suficiente una breve exposición de las partes principales del microscopio.

En el microscopio distinguimos la parte mecánica, o estativo, y los aparatos de aumento e iluminación, que constituyen la parte óptica.

El **estativo**, a su vez, comprende :

1. Pie del microscopio, cuya forma puede ser variada, pero que siempre va unido a la columna por una articulación de charnela,

con el fin de poder inclinar aquélla hacia atrás hasta la posición más cómoda para la observación. Para la microfotografía, el tubo se pone en posición completamente horizontal.

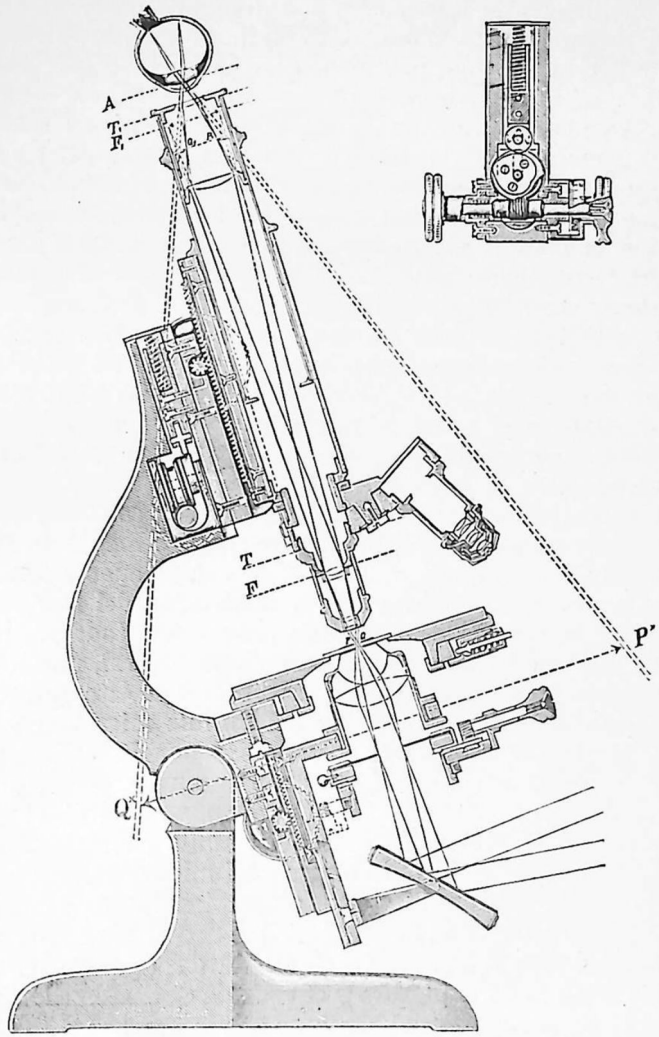


Fig. 13. Paso de los rayos por el microscopio y formación de la imagen aumentada (según E. Leitz, Wetzlar)

El pie debe ser lo bastante pesado para que en cualquiera posición del tubo esté garantizada la seguridad del microscopio y no pueda temerse su caída.

2. Platina.
3. Cremallera para movimiento rápido.

4. Tornillo micrométrico para movimiento lento.
5. Portaobjetivos de revólver.
6. Tubo alargable.
7. Espejo de iluminación, giratorio, plano-cóncavo.
8. Mecanismo de iluminación y diafragmas (condensador ABBÉ).

Para trabajos bacteriológicos, la platina ha de tener una anchura de unos 100 mm., porque con frecuencia han de mirarse cultivos de bacterias en caja de PETRI, y será preciso moverla para enfocar exactamente. Además de esto, una platina espaciosa ofrece mayores garantías al manejar material infeccioso (cólera, carbunco). La abertura circular que tiene en el centro recibe el sistema de lentes del aparato de iluminación o sencillos diafragmas. En los instrumentos más perfeccionados, la platina es giratoria y tiene dos tornillos laterales de movimiento lento para colocarla en la posición que se desea, con el fin de enfocar exactamente cualquier punto de la preparación, lo que sería muy difícil de obtener ayudándose groseramente con la mano. Los modelos mejores y más caros tienen una platina móvil con tornillos micrométricos que, por medio de dos escalas milimétricas con nonios, situadas en el plano de la platina y perpendiculares entre sí, permite determinar cualquier punto de la preparación y buscarlo de nuevo, cuando ésta se haya movido.

El tornillo micrométrico sirve para enfocar con más exactitud. El enfoque aproximado se obtiene, primero, por medio de la cremallera de movimiento rápido, y después se enfoca exactamente con el tornillo micrométrico. En lugar de la disposición del tornillo micrométrico sobre la cabeza del portatubo, muy usada todavía, las construcciones más modernas han adoptado otra lateral, paralela al eje del movimiento rápido y debajo del mecanismo de éste. Los microscopios, con esta disposición moderna del tornillo micrométrico (según BERGER), pueden transportarse tomándolos por la columna que a este fin es convexa hacia atrás, lo cual era un inconveniente con la antigua disposición, porque en ella la columna contenía el muelle en espiral necesario al funcionamiento del tornillo micrométrico, y este muelle padecía soportando todo el peso del microscopio al levantarlo tomándolo por la columna. Estos microscopios deben cogerse por debajo de la platina, cerca de la charnela que une el pie con la columna.

La **parte óptica** del microscopio consta del aparato de aumento situado por encima de la platina y el aparato de iluminación colocado debajo de la misma.

El portaobjetivos de revólver es el mecanismo giratorio para cambiar de objetivo; para investigaciones bacteriológicas, el revólver de dos objetivos es más apropiado que el de tres, porque éste molesta al mirar las placas y al moverlas.

El aparato de aumento se compone de un objetivo y un ocular. El objetivo proyecta una imagen del objeto, aumentada, invertida y real; el ocular produce una imagen de la anterior más aumentada todavía y virtual; su efecto es análogo al de una lupa. Los objetivos,

llamados así porque colocados en el extremo inferior del tubo están más próximos al objeto que se examina, son de sistema seco y de sistema húmedo o de inmersión.

En el sistema seco el objetivo no toca directamente la preparación, sino que hay una capa de aire intermedia entre el objetivo y ésta; en cambio, en el sistema de inmersión, la capa de aire queda excluída por el empleo de un líquido, cuyo índice de refracción es lo más semejante posible al del cristal cubreobjetos y a la lente frontal del objetivo.

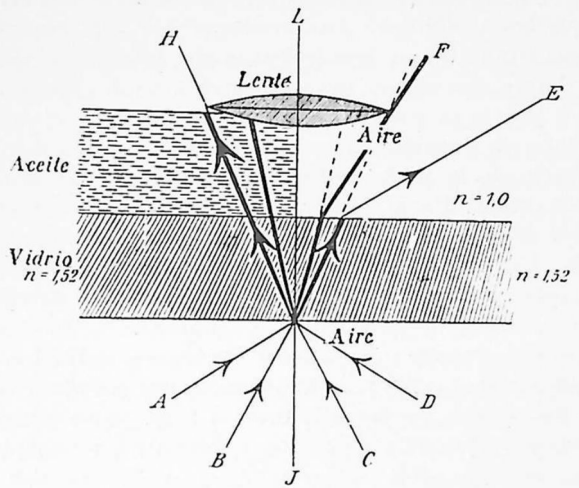


FIG. 14 Desviación de los rayos a través del aire, del aceite y del cristal (según E. LEITZ, Wetzlar)

Con la interposición del líquido de inmersión se evita la desviación y pérdida de rayos que se sufre en el sistema seco al pasar la luz del cristal al aire y viceversa, y así se facilita el empleo de la iluminación intensa indispensable en los grandes aumentos (*V.* fig. 14). La calidad de un objetivo no depende solamente del aumento de la imagen determinada por la distancia focal del mismo, sino también de su refracción en relación con el ángulo de abertura de los rayos incidentes.

Antes se usaba como líquido de inmersión el agua, cuyo índice de refracción 1 se diferencia todavía notablemente del índice del cristal que es 1'52; las inmersiones en agua únicamente se emplean hoy para determinados fines en la investigación biológica del agua. En todos los demás casos se usa como líquido de inmersión el aceite de cedro, empleado ya en 1850 por STEPHENSON y DE AMICI, cuyo índice de refracción es de 1'5.

Los descubrimientos de ABBÉ permitieron un nuevo perfeccionamiento de la calidad del objetivo mediante el empleo de sistemas de lentes apocromáticas en lugar de las acromáticas usadas anteriormente.

Por la combinación de diversos cristales ópticos, obtenidos añadiendo sales de boro, fósforo, bario y flúor al vidrio fundido, se consigue en las lentes apocromáticas una corrección más completa de las aberraciones de esfericidad y cromática inherentes a todo sistema óptico, y se logra con ello una mayor claridad de la imagen en todas sus partes y una mayor pureza en los colores. Por otra parte, el empleo de oculares especiales (oculares de compensación) en lugar de los de HUYGHENS, usados ordinariamente con los objetivos acromáticos, permite conseguir aumentos mayores hasta de 1 : 2200. Con lentes apocromáticas se construyen, naturalmente, sistemas de inmersión y sistemas secos fuertes y débiles. Las ventajas del objetivo apocromático resaltan especialmente en los trabajos de fotografía microscópica ; para los trabajos corrientes sirven perfectamente los sistemas acromáticos cuyo precio es próximamente la mitad.

El aparato de iluminación y su acertado empleo son un complemento necesario de la parte óptica, al menos cuando se emplean sistemas de inmersión. Para sistemas secos basta con saber regular la luz por medio del espejo y el diafragma, según se enseña en los cursos de histología. El uso de sistemas de inmersión, en cambio, exige una iluminación intensa como la que se consigue con el condensador ABBÉ colocado inmediatamente debajo de la platina.

Este aparato, gracias a su sistema de lentes, reúne los rayos luminosos reflejados por el espejo, de tal manera, que resultan concentrados en el plano del objeto, es decir, a unos 2 mm. por encima de la platina. Con portaobjetos muy delgados, el foco de los rayos estaría, por consiguiente, un poco alto; para evitar esto y aprovechar mejor toda la luz, el aparato de iluminación se monta un poco más bajo y sobre una cremallera. El sistema de iluminación sirve para obtener una magnífica imagen en colores, porque lleva tal cantidad de luz sobre el objeto, que desaparecen todas las sombras y sólo permanecen visibles las partes coloreadas. El caso será diferente al investigar la estructura de imágenes sin colores (preparaciones de bacterias sin teñir). Entonces el torrente de luz despedida a través del condensador de ABBÉ con el diafragma abierto haría desaparecer todas las sombras y contornos y no permitiría distinguir la estructura ni ninguna clase de detalles. Por consiguiente, en las preparaciones sin teñir está indicado prescindir del condensador ABBÉ, ya sea corriéndolo hasta abajo, ya sea cerrando más o menos el diafragma iris situado en su parte inferior ; moviendo en uno u otro sentido el topecito que actúa sobre el diafragma, aumenta o disminuye la abertura central del mismo, y con ello se elimina una parte más o menos grande de rayos situados en el borde del cono luminoso.

Como foco de iluminación para los trabajos microscópicos puede tomarse una luz artificial o la del día, y al usar ésta será preferible emplear la reflejada por una pared blanca. Entre las artificiales se emplean la luz AUER, la eléctrica de bombilla esmerilada, o la luz de NERNST. También es utilizable la luz de petróleo, haciéndola pasar por un globo de cristal lleno de una disolución de sulfato de cobre y amoníaco para compensar el exceso de rayos amarillos y rojos contenidos en la luz del petróleo. El mismo efecto se consigue colocando sobre el diafragma un disco de cristal ligeramente teñido de azul.

Para el alumbrado artificial usamos el espejo cóncavo, a causa de la proximidad de la lámpara, y con la luz del día el espejo plano.

Junto a la descripción precedente de los elementos principales del microscopio, citaremos algunos aparatos auxiliares, como la platina caliente, contador ocular y objetivo micrométrico y aparatos de dibujo accesorios que no son necesarios al objeto de un curso.

Al adquirir un microscopio, el precio tiene naturalmente gran importancia. Un microscopio suficiente para trabajos bacteriológicos podía comprarse por unos 400 marcos (precio anterior a la guerra), prescindiendo, claro está, de los apocromáticos muy caros, de los cuales, el primero a tener en cuenta para fines prácticos (Apocromático ZEISS de 2 mm., apertura 1'30), costaba ya 300 marcos. Son recomendables las siguientes lentes :

Objetivo acromático de inmersión homogénea, débil aumento ZEISS AA o LEITZ III, así como dos oculares ZEISS II y IV o LEITZ I y III : además, un sistema seco de gran aumento para trabajos de histología, el ZEISS DD o el LEITZ VII. Es recomendable no economizar en la adquisición del estativo, porque es fácil completar más tarde el sistema óptico, pero no lo es tanto el perfeccionar el montaje mecánico.

Terminado el examen microscópico, no debe retirarse la preparación hasta después de levantar el tubo por medio del movimiento rápido, porque sin esta precaución es muy fácil estropear las lentes. El aceite de cedro adherido a la lente de inmersión se quita con papel de filtro fino, y luego se frota con un trozo de piel o gamuza bien limpia. Ha de evitarse la limpieza repetida con xilol o bencina, porque estos líquidos, especialmente el xilol, pueden disolver la almáciga de las monturas de las lentes.

Terminado el trabajo se guarda el microscopio en su caja para protegerlo contra la luz y el polvo ; cuando no se desatornillan los objetivos para meterlos en sus estuches de metal, sino que, como ocurre con los objetivos usados a diario, se dejan atornillados al microscopio, debe ponerse un papel blando y limpio que evite el contacto directo entre el aparato de iluminación ABBÉ y la lente del objetivo.

Con los medios ópticos enumerados pueden conseguirse aumentos lineales de 1 : 60 hasta 1 : 1000, que son muy suficientes para la práctica bacteriológica ordinaria. Al emplear lentes de inmersión se trabaja, ordinariamente, con 500 a 600 aumentos, los oculares más potentes hacen la imagen mayor, pero no más clara. La finura de un microscopio, es decir, la percepción de detalles en la imagen del objeto, depende exclusivamente de la calidad del objetivo. Nos parece indicado tratar brevemente en este lugar del límite de la capacidad óptica del microscopio. Ese límite está en los aumentos de 1 : 2000 ya

conseguidos ; pues aun cuando es evidente que sobre una pantalla de proyección podemos obtener imágenes mucho mayores, no por eso aparecen en ellas nuevos detalles. El hecho de que la capacidad del microscopio tenga un límite, hecho anotado ya al ocuparnos de los virus ultramicroscópicos, págs. 2 y 5, tiene su fundamento, no en la dificultad técnica de construir objetivos de distancia focal más corta, sino en la naturaleza misma de la luz. Por razones cuyo análisis exigiría profundos conocimientos matemáticos y que no son de nuestro tema, únicamente es posible obtener imágenes (en el sentido de que estas imágenes sean copia fiel del objeto representado) de objetos cuyo tamaño no sea menor que la longitud de las ondas luminosas del espectro visible. Se ha intentado con éxito aumentar al doble la capacidad microscópica, empleando en lugar de la luz natural los rayos violeta, que si son invisibles para el ojo se perciben, en cambio, por sus efectos en la fotografía ; pero el procedimiento de KOHLER, fundado en ese principio y conocido hace ya unos quince años, no ha encontrado aplicación práctica en la técnica bacteriológica. Menos probabilidades prácticas tiene aún el ultramicroscopio de SIEDENTOPF y ZSIGMONDY, fundado en el principio de hacer visibles pequeñísimas partículas (hasta de menos de 1-100000 mm. de diámetro), alumbrándolas por una iluminación lateral muy intensa y presentándolas sobre un fondo obscuro al mismo tiempo, de una manera semejante a lo que ocurre con el polvo del aire cuando un rayo de luz penetra en una habitación obscura. El ultramicroscopio así construído no muestra las imágenes de esos objetos tan pequeños, sino únicamente puntos luminosos. Prácticamente no es posible tener en cuenta para la microbiología este método moderno, aunque ha dado grandes resultados en la experimentación física y química, porque los líquidos o productos orgánicos y medios líquidos en que observamos los microparásitos, por las substancias coloidales y orgánicas que contienen en disolución, están llenos de partículas visibles al ultramicroscopio, que serían difíciles de distinguir de los parásitos.

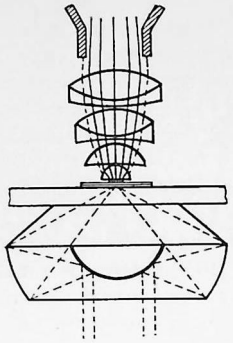


FIG. 15. Paso de los rayos a través del condensador de espejo con diafragma de embudo (LEITZ)

Aun cuando el ultramicroscopio no haya sido aplicado por la técnica de la microparasitología, su descubrimiento promovió la introducción, en el examen microscópico, de los métodos de iluminación en campo obscuro, de gran resultado práctico para el estudio de los microbios en vivo y, sobre todo, de los espiroquetos de la sífilis. Con este método, los microbios aparecen iluminados sobre un fondo obscuro.

La iluminación en campo obscuro se consigue con los condensadores de espejo, que en unión de un diafragma en forma de embudo, suspendido del sistema de inmersión, apagan por completo los rayos

directos y sólo llegan al objetivo los reflejados por el objeto microscópico. Hay varios tipos de condensadores de espejo (ZEISS, LEITZ, REICHERT), los cuales se colocan sobre la platina del microscopio o encajan en igual forma que el condensador de ABBÉ. Requieren una iluminación potente (lámpara NERNST o arco voltaico LILIPUT) ; el diafragma ha de estar abierto por completo y se utilizará el espejo plano. Portaobjetos y cubreobjetos deben elegirse lo más finos que sea posible, y entre el condensador y el portaobjetos se interpone una capa de aceite de cedro ; lo mismo se hará, naturalmente, con sistemas de inmersión entre la lente frontal del objetivo y el cubreobjetos.

2. Examen de los microorganismos en preparaciones teñidas e incoloras

El examen microscópico de los microorganismos puede hacerse estando éstos muertos o vivos, en preparaciones teñidas o incoloras.

Las bacterias vivas incoloras pueden observarse sencillamente, por ejemplo, en el jugo gástrico, sedimentos de la orina o materias fecales, colocando entre el porta y el cubre una gota de la substancia que se va a examinar, substancia que puede hacerse más flúida mezclándola con solución fisiológica, con agua o con caldo ; pero este método sencillo ofrece el doble inconveniente de que, como el líquido se seca rápidamente, no es posible un examen de larga duración, y, por otra parte, cuando se trata de materias infecciosas, el líquido que fluye por el borde del cubreobjetos puede molestar fácilmente o ser peligroso. Este método es ventajoso únicamente cuando, para el examen, basta una capa finísima en la preparación y resulta imprescindible en la investigación sobre campo obscuro. En la práctica microscópica ordinaria, los microorganismos vivos y sin colorear se estudian en gota pendiente, con lo cual la preparación se hace inaccesible al aire, se evitan las dos circunstancias desfavorables de las preparaciones ordinarias sin teñir y puede hacerse una observación larga, de horas y aun días, del cultivo, como en una cámara húmeda.

Las preparaciones en gota pendiente se hacen como sigue :

En lugar del portaobjetos plano, ordinario, se emplea el excavado. El borde circular de la excavación se unta de vaselina. Se toma luego con el asa una gota pequeña del cultivo líquido y se deposita sobre el cubreobjetos ; si el cultivo es sólido se toma con la aguja de platino una porción pequeñísima del medio sólido y se la diluye en una gota de caldo ; ni el agua, ni el suero fisiológico son recomendables a este fin, porque muchos gérmenes sufrirían alteraciones osmóticas al emplearlos. Para observar bien el movimiento y la situación de los gérmenes aislados es condición indispensable que el contenido de gérmenes sea lo más pequeño posible para cada gota. El portaobjetos, con la parte cóncava vuelta hacia abajo, debe colocarse sobre el cubre, de modo que la gota quede en el centro de la concavidad. Oprimiendo ligeramente ambos cristales quedan bien adheridos entre sí ; después de invertir con cuidado el portaobjetos, la preparación, dispuesta para el examen, constituye una cámara herméticamente cerrada, dentro de la cual las gotas están protegidas contra la evaporación y la desecación. El examen se hace con el diafragma bastante cerrado y al principio con débil aumento. El borde de la gota se coloca de manera que cruce el campo precisamente por el centro y de adelante atrás (*V.* fig. 18 *a*) ; se pone luego una gota de aceite de cedro sobre el cubreobjetos y se examina la preparación con lente de inmersión. Al hacerlo se procederá con cuidado. Los princi-

piantes oprimen y rompen a menudo el cubreobjetos; para evitarlo, lo mejor es mover muy lentamente, con la mano, el portaobjetos mientras se enfoca, porque así se percibe inmediatamente cuando se ponen en contacto el cubre y el objetivo. Después de afinar el enfoque, se elige para observar la parte menos densa, o sea el borde de la gota, que es donde mejor se consigue la visión más clara de los microorganismos y donde pueden verse en toda su longitud, porque casi siempre se hallan en posición horizontal. Cuando se trata de bacterias aerobias se las verá agruparse en el borde de la gota.

Terminado el examen, se desplaza el cubreobjetos hasta que uno de sus ángulos sobresalga del borde del porta; se le levanta luego con unas pinzas, teniendo cuidado de que la gota con bacterias no toque el portaobjetos, y se le introduce en una disolución de sublimado. El portaobjetos queda en disposición de usarse nuevamente.



FIG. 16. Asa de platino con su mango; según KOLLE

La experiencia nos ha enseñado que la preparación en gota pendiente ofrece dificultades a los principiantes, pero por lo mismo ha de ser practicada con esmero, porque este procedimiento es imprescindible para resolver una serie de cuestiones, tales como el movimiento de los microbios, la germinación de esporos, la bacteriolisis y otras varias.

Más sencillo y mucho más frecuente en la técnica microscópica es el examen de preparaciones teñidas (1). Antes de detallar las reglas técnicas para la coloración de los microorganismos adelantaremos algunas observaciones breves sobre la teoría de la coloración, extendiéndonos hasta donde sea necesario conocerla, para comprender los efectos de las diversas soluciones colorantes. Para teñir las bacterias se emplean principalmente las anilinas colorantes básicas (fucsina, azul de metileno, violeta de genciana, violeta de metilo, verde malaquita, verde metilo, vesuvina, safranina y otras), derivadas de la rosanilina, y que por el carácter básico de ésta reciben todas el nombre de «colorantes básicos», aunque por razón de su composición química son sales neutras (la fucsina, por ejemplo, es un clorhidrato de rosanilina). La coloración no resulta sencillamente de impregnar la bacteria con la materia colorante, sino que representa una reacción microquímica; la combinación química del colorante con el plasma se verifica de manera análoga a la formación de sales dobles, es poco coherente y disociable con facilidad en buenos disolventes de la materia colorante. En esto se funda la acción decolorante del alcohol y el hecho paradójico de que una materia colorante es tanto menos eficaz cuanto más completa sea su disolución; por esto

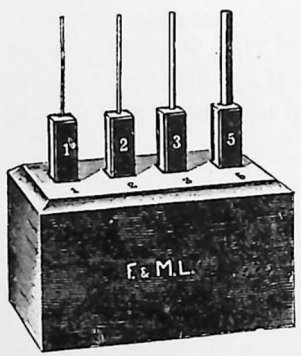


FIG. 17. Escala de asas de platino, de CZAPLEWSKI

(1) Es posible también, aunque rara vez se emplea, teñir los microbios vivos; para lograrlo, se procede en la forma siguiente:

Se añade una cantidad pequeña de solución colorante a la gota pendiente, o se deja secar una solución acuosa o alcohólica de azul de metileno sobre el porta bien seco y limpio, y se coloca después el cubre con la gota que se desea examinar.

las disoluciones colorantes en alcohol puro no tiñen en absoluto las bacterias; por la misma razón las disoluciones alcohólicas concentradas, almacenadas en los laboratorios, deben diluirse antes de usarse,

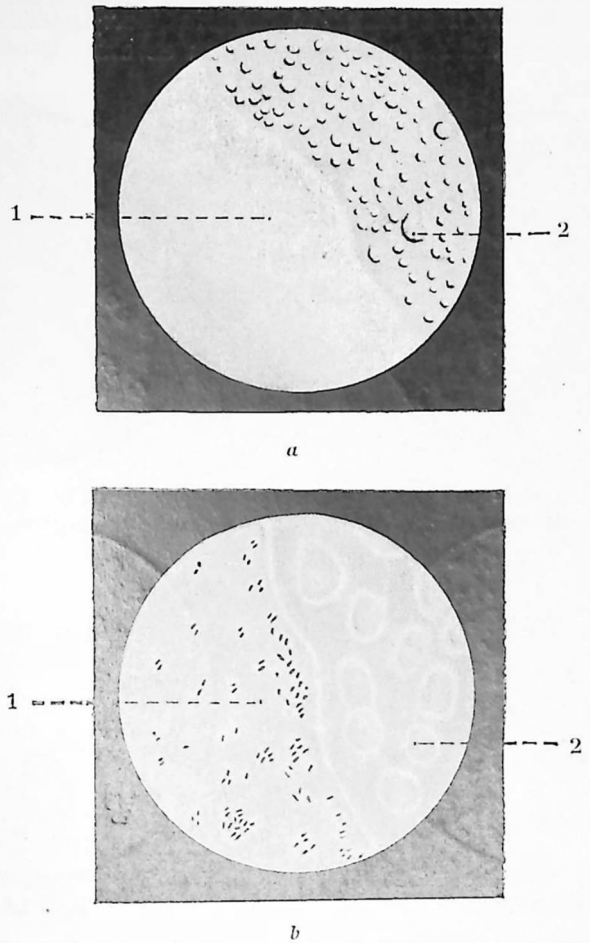


FIG. 18 *a* y *b*. Gota pendiente (colibacilo); *a*, con débil aumento (1 : 40); *b*, con fuerte aumento (1 : 500)

1. Interior de la gota pendiente (en *b*, los bacilos son claramente visibles).
2. Gotitas de agua condensada fuera de la gota pendiente.

añadiendo al efecto diez partes de agua destilada por una de solución alcohólica. El añadir substancias que aumenten la solubilidad de la materia colorante, produce una disminución en la eficacia de ésta; estas soluciones con «débil poder colorante» pueden ser empleadas con ventaja en algunos casos por la electividad de ciertas partes del cuerpo de la bacteria con el colorante; así, por ejemplo, una disolución de azul de metileno que contenga ácido acético se em-

plea en la coloración de los corpúsculos polares de los bacilos de la difteria por el método de M. Neisser, según veremos en el capítulo especial correspondiente. Recíprocamente podemos aumentar el poder colorante de las disoluciones añadiendo las substancias que disminuyen la solubilidad de la materia colorante disuelta (por ejemplo, añadiendo álcalis o agua de anilina o las dos cosas); en este último caso hasta

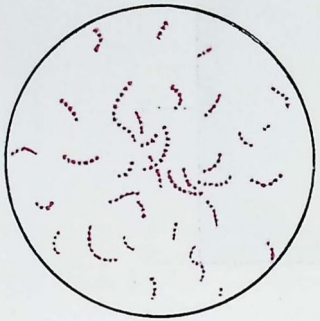


Fig. 19 *a*

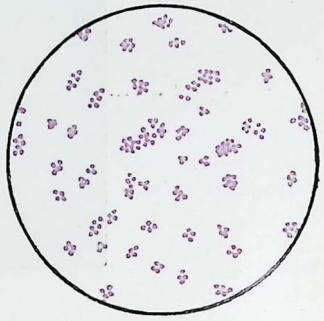


Fig. 19 *b*

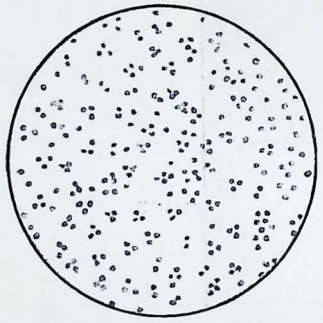


Fig. 19 *c*

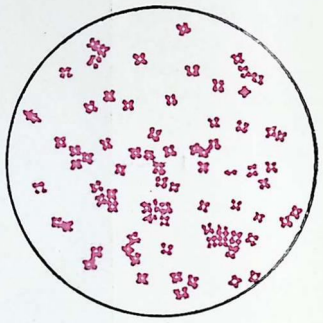


Fig. 19 *d*

Fig. 19. Coloración de diversos microorganismos con las soluciones colorantes simples usadas de ordinario (aumento 1 : 500). *a*, estreptococos ; *b*, estafilococos ; *c*, micrococos del aire ; *d*, sarcinas

se inicia la precipitación de la materia colorante. De esto depende que estas soluciones de poder colorante reforzado no sean permanentes (prescindiendo de las preparadas añadiendo ácido fénico), sino que la mayoría, al cabo de algunos días, resultan inútiles por precipitación de la materia colorante.

En cuanto a la duración de la coloración con las disoluciones no pueden darse siempre datos determinados. Varía con la concentración de la disolución y con la especie de bacterias. En general, puede decirse que, con disoluciones concentradas, el tiempo necesario para teñir

es menor, pero con mayor tiempo y soluciones diluídas (1 a 5 minutos) las imágenes obtenidas son más claras y hermosas.

La obtención previa de preparaciones para la coloración puede realizarse de diversas maneras, según la clase de material que haya de emplearse. Lo más corriente son las extensiones o frotis que se disponen sobre el cubre o sobre el portaobjetos, siendo esto último más

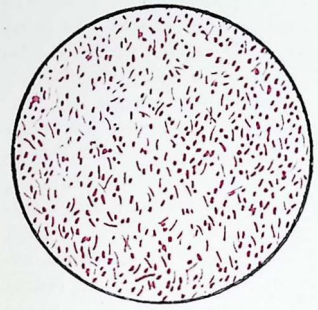


Fig. 19 *e*

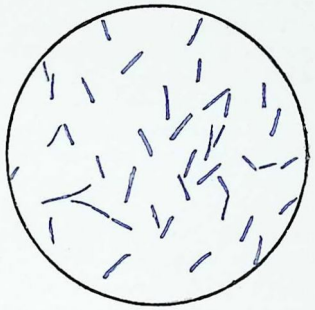


Fig. 19 *f*

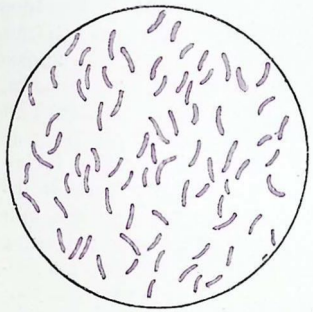


Fig. 19 *g*

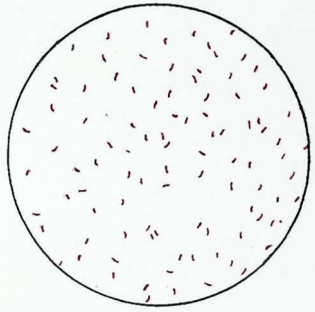


Fig. 19 *h*

e, *Bacillus prodigiosus* (con formas de involución) ; *f*, *bacillus megatherium* ; *g*, *spirillus volutans* ; *h*, espirilo de Finkler-Prior

cómodo y más económico en la labor diaria, porque se rompen menos cubres, cuyo cristal es muy fino.

Para la obtención de preparaciones que deban conservarse es necesario siempre taparlas con el cubre, aunque se hayan hecho en el portaobjetos, montando aquél con bálsamo del Canadá. Los líquidos que contienen gérmenes pueden ser manejados directamente sin diluirlos más, cuando el frotis obtenido no resulta demasiado grueso ; los líquidos que contienen numerosos elementos formes (líquidos orgánicos), así como los cultivos puros en medios sólidos se diluyen en un poco de agua. Para ello se deposita una gota de agua sobre el porta o sobre el

cubre, y se diluye en ella el material que ha de examinarse por medio de una aguja de platino esterilizada a la llama, de manera que la capa sea muy fina y uniformemente espesa. Si el líquido no se extiende uniformemente sobre el cristal, ello será debido a que el porta o el cubreobjetos no están bien limpios y tienen una ligerísima capa de grasa, que desaparecerá frotándolos con alcohol o calentándolos a la llama (*V.* el capítulo Coloración de flagelos, donde se trata de la limpieza especial de los cubreobjetos). El aplastamiento violento del material examinado, únicamente se aplica cuando se trata de comprobar la existencia de microbios en el interior de masas duras y difíciles de extender sobre los cristales, por ejemplo, en los pedacitos de caseum de los esputos de tuberculosos, y cuando no se trata de conservar escrupulosamente los elementos morfológicos celulares ; en todos los demás casos ha de extenderse la preparación con el mayor cuidado posible, para evitar groseras deformaciones de los elementos celulares, lo cual pudiera ser motivo de errores para los principiantes. Especialmente de los núcleos celulares, salen al tratarlos con violencia toda clase de gránulos y filamentos, algunas veces fantásticos, como especies de espermatozoos o colas de cometa. Sobre la técnica de las preparaciones de sangre, véase el capítulo Paludismo, en la parte especial. Si se quieren obtener preparaciones en las que pueda verse con exactitud la disposición y agrupamiento de gérmenes sembrados en medios sólidos, lo que es muy característico en muchas especies de bacilos (del carbunco, de la peste, de la difteria y de la tuberculosis entre otros), lo mejor será recurrir a las preparaciones por impresión, llamadas así porque al colocar el cubreobjetos sobre las colonias de la preparación se produce una verdadera impresión de las mismas ; el poner y quitar el cubre ha de hacerse con cuidado, sin presión fuerte y sin desplazarlo lateralmente (desde luego, a causa del peligro de infección no ha de cogerse el portaobjetos con los dedos, sino con una pinza y mejor con una especial para cubreobjetos que tiene los extremos encorvados) ; las demás manipulaciones son análogas a las de los frotis ordinarios. Inmediatamente debe dejarse secar al aire la preparación; luego se fija calentándola o tratándola por el alcohol absoluto, para que los microbios y los elementos celulares no sean arrastrados en las manipulaciones siguientes en que intervienen soluciones acuosas. La fijación se produce en ambos métodos por la coagulación de las albúminas. El procedimiento de fijación más corriente en la práctica bacteriológica consiste en pasar tres veces la preparación por el mechero de Bunsen ; para las preparaciones de protozoarios así como para la obtención de detalles delicados, este método es demasiado violento y debe substituírsele por fijación en alcohol absoluto durante 15 a 30 minutos. Al pasar la preparación a través de la llama deben evitarse varias faltas : si la preparación no estaba seca por completo, las células estallan, por efecto del calor repentino y aparecen rotas ; el calor demasiado fuerte perjudica el colorido de las bacterias ; si la temperatura es escasa puede ocurrir que las bacterias sean arrastradas al verter las

soluciones colorantes o en los lavados con agua posteriores. Una vez fijada la preparación se procede a teñirla, ya sea con soluciones de colores de anilina, ya cuando se persiguen fines particulares, por métodos especiales, que expondremos en el párrafo siguiente. Terminada la coloración se lava escrupulosamente con agua la preparación y se seca entre papel de filtro. El cubreobjetos se monta luego mediante

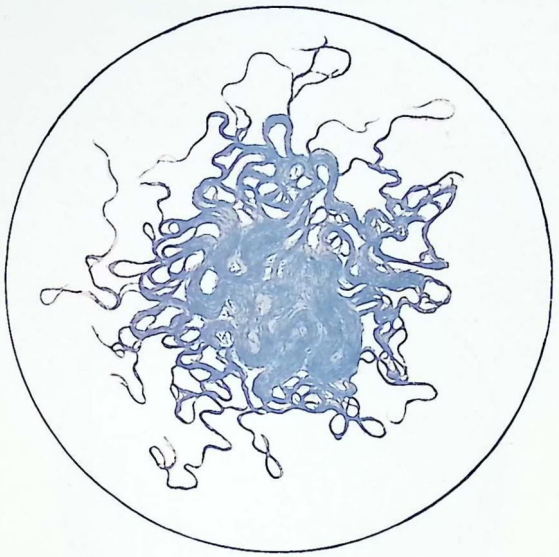


Fig. 20. Colonia de carbunco. Preparación por impresión; coloración con violeta de genciana (aumento 1 : 60)

unas gotas de bálsamo del Canadá o de aceite de inmersión vertidas sobre el portaobjetos. Para el examen se deposita sobre el frotis una gota de aceite de cedro y se emplea la lente de inmersión.

A veces, el examen de preparaciones teñidas sólo puede hacerse en agua, por ejemplo, en la coloración de cápsulas, porque en el aceite, que es muy refringente, dejan de verse las sutiles cápsulas ; pero es de notar que en el agua, por la refringencia que determina, todas las bacterias parecen mayores que en el aceite de cedro o en el bálsamo del Canadá.

Durante los diversos procedimientos de coloración que hemos descrito, el porta o el cubreobjetos se mantienen en posición horizontal cogidos con una pinza de Cornet ; debe emplearse un modelo de esta pinza para coger el cubre y otro distinto para el porta. Como medios más baratos son recomendables : para los cubreobjetos el colocarlos sobre corchos que van adheridos a una tabla o sobre una plancha de

goma con púas como las usadas en las tiendas para recoger cómodamente las monedas; los portaobjetos se dejan sobre banquillos que puede construirse uno mismo con barras de cristal convenientemente



FIG. 21. Pinza de CORNET, mitad del tamaño natural

dobladas, los que a su vez descansan en los cristalizadores o cápsulas sobre los cuales se practica la coloración.

La coloración de frotis con tinta china, debida a BURRI, exige una explicación particular, pues, en cierto modo, representa la inversión



FIG. 22. Bacilo del carbunco en preparación a la tinta china (aumento 1 : 500)

del fundamento de la coloración ordinaria. Mientras que con los métodos habituales se tiñen solamente los microorganismos y el fondo debe quedar incoloro en lo posible, con el método de BURRI, que consiste en el empleo de una solución de tinta china de granos muy finos, es precisamente el fondo el que aparece coloreado (moreno hasta negro u opaco), en tanto que los microorganismos resaltan incoloros y brillantes sobre el fondo obscuro de la preparación. Una preparación a la tinta china, bien hecha, produce una impresión que recuerda la iluminación sobre campo obscuro (*V.* pág. 26), aunque en ella las intensidades de luz contrastan menos. Se emplea con iguales fines que este último método, y entre ellos, en primer lugar, para comprobar la existencia del espiroqueto sifilítico. La preparación a la tinta china se realiza en la forma siguiente:

Sobre el portaobjetos bien limpio se mezcla una gota de tinta china marca « Pelikan » n.º 541 (GRUBLER, Leipzig), con otra del material con gérmenes que se quiere observar, y se extiende uniformemente la mezcla; una vez seca la preparación, se examina directamente en aceite de inmersión. También pueden emplearse en lugar de tinta ciertas substancias colorantes, tales como la cianoquina y otras.

Para comprobar en cortes la existencia de microbios, habrá que tratar primeramente las porciones de los órganos correspondientes, para



FIG. 23. Glomérulo renal en la infección por estafilococos (coloración de GRAM) (aumento 1 : 500)

su fijación e inclusión, según la técnica histológica, a la que remitimos al lector. Si no se trata de preparar cortes muy finos, los trozos de tejido, una vez fijados en alcohol, sin incluirlos, se adhieren sobre un corcho con un poco de goma o celoidina y se endurecen luego en alcohol, y así se les puede cortar con el microtomo. Para investigaciones más delicadas es indispensable la inclusión en parafina. Los cortes se colocan sobre el portaobjetos, se fijan sometiéndolos durante varias horas a una temperatura de 37°, y una vez libres de parafina por tratamiento con xilol y alcohol, se les tiñe por los métodos ordinarios lo mismo que los frotis. El examen es más fácil cuando las bacterias que investigamos pueden ser teñidas por alguno de los métodos de coloración distinto al de los tejidos, que detallaremos en el párrafo siguiente (coloración de GRAM o de los bacilos de la tuberculosis). Para la coloración de contraste del tejido se trata el corte por

el picrocarmín antes de teñirlo con el GRAM, o bien por la eosina después de teñido. Pero si los gérmenes patógenos no pueden teñirse de un color diferente del de los tejidos (como en los bacilos de la fiebre tifoidea, de la peste, del muermo y del cólera), es más difícil reconocerlos, porque los tejidos y especialmente los núcleos de las células toman también con intensidad los colores básicos. En tal caso habrá que intentar con cuidado la decoloración parcial del corte por medio del ácido acético o el alcohol diluídos, y a continuación, lavar escrupulosamente en agua para conseguir la posible diferenciación práctica entre las bacterias y los núcleos celulares, intensamente teñidos, y el resto de los elementos constitutivos de los tejidos. Para los protozoarios tanto en frotis como en cortes, el mejor método de coloración es el de ROMANOWSKY-GIEMSA.

Respecto de otros métodos aplicables, véase el capítulo especial correspondiente.

3. Métodos especiales de coloración

a) La **coloración de Gram**, que toma su nombre del de su inventor, es un procedimiento de tinción electiva, que sólo sirve para determinadas especies de microorganismos, mientras que otras especies y especialmente los núcleos celulares de los tejidos permanecen incoloros. que, si se quiere, pueden hacerse visibles con un color que contraste (tratándolos con solución de fucsina muy diluída). Por consiguiente, este procedimiento es de gran valor, tanto para la coloración de los cortes, como para diferenciar las diversas especies de bacterias. Según el resultado que en ellas da la coloración de GRAM, las calificamos de GRAM positivas o GRAM negativas, porque esta característica es constante en casi todas, y rigurosamente fija en cada especie. Sólo pocas bacterias se exceptúan de esta regla (bacilo del tétanos, del carbunco sintomático y del edema maligno), que si bien son negativas la mayor parte de las veces, en ocasiones dejan de serlo, y aun procediendo de un mismo cultivo, algunos bacilos aparecen coloreados y otros no. En el cuadro que sigue están agrupadas las bacterias más importantes, según el efecto que en ellas produce la coloración de GRAM.

Gram positivas	*Gram negativas*
Estafilococos	Gonococo
Estreptococos	Meningococo
Neumococos	Micrococus catarralis
Todas las sarcinas	» melitensis
Bacilo del carbunco	Colibacilo
» subtilis	Bacilo tífico
» mesentérico	» paratífico A y B.
» de la difteria	» disentérico (todas las especies)
» » tuberculosis	» de la peste
» » lepra	» » septicemia hemorrágica (todas las especies)

Gram positivas	*Gram negativas*
Actinomices	Bacilo de la gripe
Levaduras	» » neumonía de FRIEDLANDER
Oidium	» piociánico
	» proteus
	» del muermo
	Vibrión del cólera y
	Vibriones afines
	Espirilos, espiroquetos

Las reglas de la coloración de GRAM son las siguientes : Las preparaciones ya fijadas se tiñen primero con una materia colorante del grupo de las pararosanilinas (violeta de genciana, violeta de metilo), empleando simultáneamente un mordiente por ejemplo, el ácido fénico o anilina (1) (dos minutos) y después con una solución yodo-yodurada (LUGOL) (otros dos minutos). Aplicando a continuación el alcohol hasta que la preparación cese de soltar color (aproximadamente medio minuto), se destiñen completamente las bacterias GRAM negativas, los núcleos celulares y los tejidos. Con la aplicación posterior de eosina o de fucsina muy diluída, se obtiene una coloración de contraste.

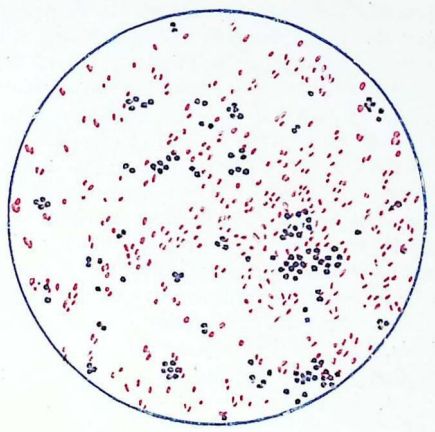


FIG. 24. Estafilococos y colibacilos. Coloración de GRAM y recoloración con fucsina (aumento 1 : 500)

Las bacterias positivas aparecen teñidas de un color violeta intenso; las negativas y los tejidos, de rojo. Con el método de GRAM, la coloración no es de violeta de genciana, sino de yodo-pararosanilina, la cual, según que la unión química del yodo-pararosanilina con el protoplasma sea íntima o no, puede desaparecer por el tratamiento con alcohol, o permanecer indiferente a él. Los colorantes derivados de la rosanilina (fucsina, azul de metileno) no son aplicables a la coloración de GRAM.

(1) La adición de ácido fénico (2·5 %) tiene sobre el procedimiento primitivo la ventaja de que la solución se conserva indefinidamente, mientras que la solución de violeta de genciana con agua de anilina sólo puede emplearse durante algunos días y luego se altera rápidamente. Al preparar esta última solución colorante es preciso observar algunos pequeños detalles, sin los cuales no es posible obtener buenos resultados ; la solución bien preparada tiene gran poder colorante.

La anilina (llamada en el comercio « aceite de anilina ») se mezcla con una cantidad de agua 10 veces mayor, se agita con fuerza, y la emulsión lechosa resultante se filtra a través de un filtro húmedo para obtener un filtrado completamente claro ; al filtrado se añade 1/10 de su volumen de solución alcohólica saturada de violeta de genciana. La solución colorante, una vez preparada, se filtra siempre antes de usarla.

b) **Coloración de bacilos ácido-resistentes.** Todo un grupo de bacterias cuyo representante de mayor importancia es el bacilo de la tuberculosis se conducen de manera peculiar frente a la coloración; no toman el colorante sino con dificultad y sólo después de aplicaciones enérgicas del mismo, pero una vez que lo han tomado lo pierden también con gran dificultad y resisten los procedimientos más enérgicos de decoloración por medio del alcohol y de los ácidos diluídos. Por todo esto se dice que son alcoholácido-resistentes. Esta particularidad se debe a una cubierta córea que tienen estas bacterias, a la cual se debe la resistencia y hace posible la coloración de contraste con los tejidos. En este caso aparecen los bacilos ácido-resistentes con color que primeramente tomaron (rojo con la solución de ZIEHL) y las demás bacterias, así como los tejidos, presentan el color de contraste (azul) empleado después de la decoloración. En el primer método de coloración usado por R. KOCH se teñía por la acción prolongada de una solución ligeramente alcalina de violeta de genciana en agua de anilina y la coloración de contraste se obtenía con vesuvina (pardo); actualmente, la primera coloración se hace casi siempre con fucsina fenicada (solución de ZIEHL (1) y para la recoloración se emplea la solución acuosa de azul de metileno. El agua de anilina y el ácido fénico sirven de mordientes (como en la coloración de GRAM), y se utilizan para facilitar la penetración del color, análogamente a lo que sucede en el tinte de la lana. En los frotis ordinarios el proceso se acelera calentando, mientras que (para los cortes) a la temperatura ambiente se requiere que el colorante actúe durante veinticuatro horas.

El primitivo procedimiento para teñir los bacilos de la tuberculosis, en el cual estaban separados los dos tiempos de decoloración con ácidos y por el alcohol, era el siguiente:

1. Fijada la preparación, se tiñe con fucsina fenicada o fucsina con agua de anilina, calentando repetidas veces hasta desprender vapores, pero sin llegar a hervir; duración aproximada cinco minutos.
2. Decoloración durante dos a tres segundos con ácido sulfúrico al 5 % o ácido nítrico al 25 %.
3. Decoloración con alcohol de 70° hasta que la preparación parezca casi incolora; si hace falta se repiten las operaciones números 2 y 3.
4. Recoloración con solución acuosa de azul de metileno sólo unos diez segundos.
5. Lavar en agua, secar, etc.

El tratamiento por los ácidos y el alcohol no hay inconveniente en hacerlo al mismo tiempo con una mezcla al 1 % de ácido clorhídrico en alcohol, que actuará durante dos a tres segundos e irá seguido de un lavado en alcohol ordinario (medio minuto) hasta conseguir los efectos del número 3.

Menos recomendable es, en cambio, simplificar el método haciendo la recoloración y decoloración con la misma solución. porque no será posible comprobar por separado la decoloración y el teñido de contraste. Entre los métodos recomendados a este fin indicaremos únicamente el del azul de metileno y la coralina, en el que por la acción suave del decolorante no es de temer una decoloración exagerada. El tratamiento de la preparación, después de teñida con fucsina y sin lavar ésta, se hace con la siguiente solución que actuará un minuto:

Coralina	1
Solución alcohólica de azul de metileno saturada.	100
Glicerina	20

c) La **coloración de esporos** se funda en el mismo principio que la que acabamos de describir para los bacilos ácido-resistentes, sólo que debido a la extraordinaria resistencia de la membrana de los esporos se requieren medios especialmente enérgicos a fin de lograr la penetración del color. Entre estos medios merecen citarse: el pasar a través de la llama diez veces en lugar de tres para fijar bien la preparación, tratamiento previo con mordientes (ácido crómico) y calentar más tiempo en el momento de teñir. Terminada la coloración, es difícil quitar el color de los esporos por medio de líquidos decolorantes, lo que no ocurre con el cuerpo de las bacterias, y en esta particularidad se funda la coloración de bacterias y esporos.

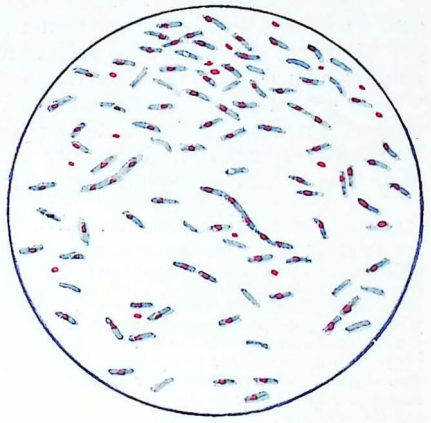


FIG. 25. Bacilo subtilis. Coloración de esporos. Formas no esporuladas en azul, esporos en rojo (aumento 1 : 500)

La primera y más sencilla coloración de esporos se debe a H. BUCHNER (1884), quien sometió la preparación después de fijada, a la acción del H_2SO_4 concentrado o al de la lejía de potasa durante veinticinco minutos. Las primeras coloraciones dobles fueron publicadas por A. NEISSER y F. HUEPPE en 1884. Los métodos posteriores para la coloración de esporos están íntimamente relacionados con el empleado para los bacilos de la tuberculosis.

1. La preparación seca se pasa 10 veces por la llama para fijarla (1).
2. Teñir con fucsina en agua de anilina calentando hasta desprendimiento de vapores y formación de burbujas, dejar pasar uno o dos minutos, calentar de nuevo, cesar otra vez, y así de tres a cinco veces.
3. Tratar la preparación rápidamente con alcohol absoluto.

(1) La fucsina fenicada, según ZIEHL-NEELSEN, se compone de 100 c. c. de solución al 5 % de ácido fénico, que ha de calentarse para que esté completamente clara, más 10 c. c. de solución alcohólica saturada de fucsina. Es inalterable y diluída en 10 volúmenes de agua destilada, es aplicable a la coloración de las demás bacterias y, en esta forma, se usa corrientemente en todas partes para los trabajos diarios. La solución de fucsina con agua de anilina se prepara como la misma solución de violeta de genciana, según se ha explicado anteriormente.

(1) Después de fijar, con el fin de obtener una buena coloración, es recomendable quitar la grasa de la preparación, introduciéndola en cloroformo durante dos minutos, se lava luego con agua y a continuación se emplea como mordiente una solución acuosa de ácido crómico al 5 % (dos segundos a diez minutos), según las especies microbianas; después se repite el lavado y se colorea.

4. Después con alcohol de 60° hasta que no suelte color.
5. Secar.
6. Recolorar con solución acuosa de azul de metileno (dos minutos).
7. Lavar con agua. Secar. Montar en aceite de cedro o bálsamo del Canadá.

Los esporos aparecen coloreados de rojo resaltando en el cuerpo teñido de azul de las bacterias.

d) La **coloración de flagelos** es, en cuanto a técnica, la más exigente; se necesitan procedimientos especiales de mordentado para lograr que los flagelos se coloren con soluciones de substancias cuyo poder colorante ha sido reforzado añadiéndoles un álcali, agua de anilina o ácido fénico.

Como mordientes sirven mezclas tintóreas de solución de tanino con sales metálicas y fucsina; en el mordiente primitivo, indicado por Löffler, se empleaba el sulfato ferroso como sal metálica; en la modificación de Peppler, descrita a continuación, el ácido crómico, y en el procedimiento de Zettnow el antimonio. Este último procedimiento es notable teóricamente, porque los flagelos, después del efecto mordiente, no se hacen visibles por un proceso de coloración, sino por el de platear con una solución de plata y etilamina.

Reglas del método de Peppler

Para evitar precipitaciones se limpiarán escrupulosamente el porta o el cubreobjetos, a cuyo fin se les lavará perfectamente con alcohol diluído, y después de frotarlos en un paño limpio, se les coge con las pinzas y se les deja unos minutos sobre una plancha de hierro caliente, o bien se les limpia en H_2SO_4 concentrado y caliente, y después de neutralizar con lejía de sosa, se lavan con agua corriente y se les seca con un paño limpio. Ha de evitarse con el mayor cuidado tocar el cubreobjetos con los dedos, porque con la ligera capa de grasa que éstos tienen perdería su limpieza. Para obtener buenas preparaciones de flagelos, las bacterias deben estar libres por completo de la más mínima partícula del medio de cultivo sólido o líquido. A este fin, se toman tres cubreobjetos, limpios según el procedimiento anterior, y se coloca sobre cada uno de ellos, sirviéndonos del asa de platino, una gota de agua común (no destilada, por los cambios osmóticos que puede originar). En una de estas gotas se pone con cuidado, sin frotar fuerte, el material que se va a examinar, de ésta se traslada algo a la segunda gota y desde ésta a la tercera. Las gotas se extienden cuidadosamente. La preparación, después de seca, se pasa una vez por la llama y se trata con el mordiente de Peppler, reciente y filtrado (1). A continuación se lava perfectamente la preparación en el chorro del agua. Después que se ha escurrido toda el agua, se procede a la coloración propiamente dicha con violeta de genciana recién filtrada (dos o tres minutos). Se lava luego con agua, se seca la preparación muy por encima de la llama y se monta en aceite o bálsamo.

III. Biología general y métodos de cultivo de los microorganismos

Por muy importante que sea, para el estudio de los microparásitos, el conocimiento morfológico que ha sido objeto del capítulo anterior, no basta, sin embargo, por sí solo en la mayor parte de los casos para

(1) Preparación del mordiente: Se prepara en caliente 100 c. c. de solución acuosa de tanino al 20 %, y después de dejarla enfriar hasta 20°, se añaden 15 c. c. de solución acuosa de ácido crómico puro al 2'5 % por pequeñas porciones y agitando la mezcla; el mordiente estará dispuesto para el uso después de cuatro a seis días de reposo y tras filtración cuidadosa.

establecer un diagnóstico seguro; todo lo más este conocimiento morfológico es suficiente para diagnosticar los protozoarios, en los cuales, por ejemplo, al investigar el paludismo, una preparación microscópica de la sangre no sólo permite establecer si se trata o no de un caso de paludismo, sino que también permite sentar el diagnóstico diferencial entre las tres diversas especies de gérmenes causantes de dicha enfermedad. En las bacterias es mucho más difícil el diagnóstico puramente morfológico, porque acompañando a las patógenas se encuentran casi siempre en gran número otras especies muy parecidas que viven sin desarrollar acción patógena. La morfología, estudiada en la preparación microscópica, sólo nos ilustra, en muchos casos, acerca del grupo natural a que pertenecen los microbios que vemos, sin que sea posible identificar su especie; ésta únicamente puede averiguarse fundándose en las cualidades biológicas de la bacteria correspondiente. Esto es aplicable incluso a bacterias tan características por sus propiedades morfológicas y colorantes, como lo es, por ejemplo, el bacilo de la tuberculosis. Cuando el conocimiento de la procedencia del material investigado no permita diagnosticar con certeza ni excluir la confusión con especies saprofíticas parecidas, hay que recurrir al estudio biológico para decidir, en último término, el diagnóstico. Así, por ejemplo, el diagnóstico de bacilos de la tuberculosis puede hacerse con seguridad ya mediante una preparación microscópica de esputos del tísico, pero no ocurre lo mismo con el material de la leche de vaca, en la que pudiera tratarse muy bien de inofensivos bacilos ácido-resistentes seudotuberculosos.

El estudio de las cualidades biológicas de un microparásito, de las condiciones que son necesarias para su vida, así como de las manifestaciones de la misma, sólo es posible satisfactoriamente cuando se consigue reproducir el microbio fuera del organismo enfermo en medios artificiales, es decir, cultivarlo. Por esta reproducción, de un solo individuo se originan agrupaciones de otros muchos que, finalmente, son visibles a simple vista, formando entonces lo que llamamos colonias aisladas o cultivos. Su aspecto al microscopio y, más aún, al mirarlas con pocos aumentos, proporciona a menudo características tan sorprendentes, que sólo por ellas puede fundamentarse un diagnóstico cierto, como ocurre con el aspecto característico de las colonias del carbunco y del bacilo de la peste. En otros casos, estos caracteres no bastan desde luego, porque no son propios de una especie particular, sino de todo un grupo, como sucede con las bacterias pertenecientes a los grupos de bacilos de la disentería y de la fiebre tifoidea; entonces el diagnóstico bacteriológico de la especie, que es el importante en la práctica médica, no puede fundamentarse sobre una característica particular, sino que ha de apoyarse en la existencia constante y relacionada de una serie de características biológicas.

En la elección de medios nutritivos artificiales nos vemos obligados a imitar al organismo enfermo, con tanta más aproximación cuanto más acomodado esté el correspondiente microbio a la existencia de

parásito. Los parásitos obligados, que no tienen existencia posible y duradera en condiciones naturales fuera de su huésped, sólo podremos sostenerlos en cultivos artificiales proporcionándoles como medio



FIG. 26. Esterilizador de aire caliente (calefacción por gas)

nutritivo sangre humana (protozoarios), o albúmina humana o animal (espiroquetos); algunos gérmenes, como las bacterias llamadas hemoglobinófilas (bacilo de la gripe), están acostumbradas a substancias albuminoideas claramente determinadas (hemoglobina); pero, en cambio, les es indiferente la clase de sangre, y ésta lo mismo puede proceder del hombre que de conejos o de palomas.

Los parásitos facultativos capaces de crecer fuera del organismo infectado son menos exigentes y se satisfacen con substitutivos (leche, peptona, gelatina, caldo de carne o patatas), y hasta con medios libres

por completo de albúmina, como, por ejemplo, el medio de cultivo de USCHINSKY, en el cual las bacterias construyen sintéticamente su protoplasma celular de sencillas combinaciones nitrogenadas (amidas y amidoácidos) y de hidratos de carbono. Las reglas generales para la preparación de los medios de cultivo más generalmente empleados se exponen a continuación.

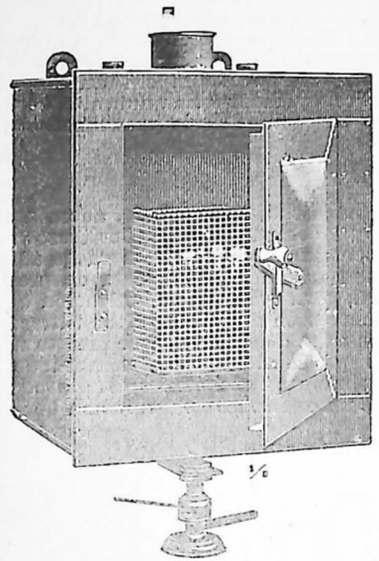


FIG. 27. Esterilizador de aire caliente, de R. KOCH (mod. pequeño)

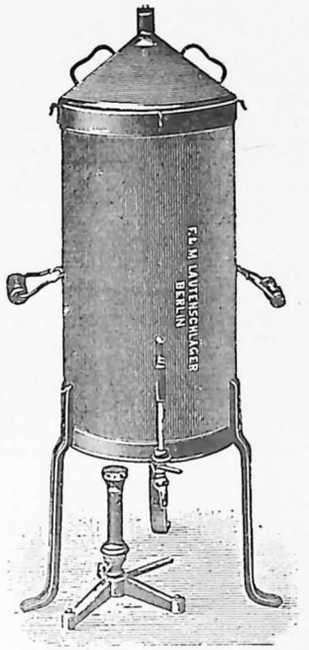


FIG. 28. Esterilizador de vapor, marmita de vapor, de R. KOCH

Preceptos abreviados para la preparación de los medios de cultivo más importantes y más generalmente usados en la técnica bacteriológica

(Todo lo que se refiere a medios de cultivo especiales será expuesto en el capítulo de la parte especial)

1. CALDO DE CARNE

Se pican cuidadosamente 500 gramos de carne sin grasa, se maceran durante varias horas en un litro de agua común a la temperatura de la habitación, se hierve luego durante tres cuartos de hora y, por último, se filtra y se exprime a través de un lienzo bien limpio. Al caldo filtrado se añaden 10 gramos de peptona en polvo (WITTE, ROSTOCK) y 5 gramos de sal, y se hierve de nuevo durante media hora; para suprimir el ácido láctico y los fosfatos ácidos procedentes de la carne, se neutraliza con solución de carbonato sódico anhidro al 10 % (la cual puede preparar uno mismo por calcinación del carbonato de sosa), comprobando la alcalinización con el papel de tornasol y mejor aún con el que prepara E. MERCK, Darmstadt. (Charta exploratoria). El punto neutro al tornasol se alcanza cuando ya no se pone rojo el papel azul, momento en que el papel rojo, en cambio, se pondrá azul de manera clara. Para la mayor parte de las especies patógenas es preferible cierto exceso de alcalinidad. Hiérvase entonces una vez más durante un cuarto de hora y fíltrese a través de doble papel de filtro. Si el filtrado no sale completamente claro, se clarifica con una clara de huevo o 20 c. c. de suero sanguíneo por cada

dos litros de caldo, hiviéndolo brevemente por última vez. Hecho ya el caldo, se distribuye en recipientes (matraces, tubos, etc.) previamente esterilizados por el calor seco (media hora a 160°), y para destruir cualquier germen del aire que pueda haber penetrado en las vasijas al llenarlas, se esterilizan otra vez durante diez minutos.

Como substitutivos de la carne sirven el extracto de carne, la placenta humana, el caldo MAGGI y los extractos de patatas, soja y otros semejantes.

2. GELATINA

Al caldo de carne preparado como antecede, se le añade, además de peptona y sal común, un 10 a 20 % de gelatina (en hojas blancas) y se le hierve media hora: después se neutraliza, se clarifica, se filtra y se distribuye en tubos u otros recipientes previamente esterilizados. Como el punto de licuación de la gelatina desciende después de estar sometida largo tiempo a grandes temperaturas, la esterilización se hará teniendo esto en cuenta, o sea hirviéndola en la marmita de vapor o al autoclave durante diez minutos en tres días consecutivos (esterilización fraccionada).

3. AGAR

Al caldo de carne preparado, según se ha dicho, se le añade, además de la peptona y sal común, 1 ½ a 3 % de agar-agar cortado en pequeños trozos (o en polvo). Como el agar-agar se disuelve muy lentamente al hervir en vasija abierta, se recomienda el empleo del autoclave (una hora a ½ atmósfera de presión). Después de esto se neutraliza y filtra, lo cual, para evitar la solidificación que se inicia ya a los 40°, se hará en embudo caliente o en el autoclave. Se filtrará por papel o en forma más sencilla, por una ligera capa de algodón, y se facilita mucho la operación dejando previamente al medio que se sedimente y decantando después. Preparado el medio nutritivo se distribuye en recipientes esterilizados, y, por último, se esteriliza nuevamente durante un cuarto de hora a media hora.

4. PATATAS ESTERILIZADAS

Se empleará, en lo posible, ejemplares perfectos, que, en primer término, se limpiarán impecablemente de toda la suciedad, tierra, etc., adherida a la superficie frotándolas con cepillo fuerte, mientras les cae el chorro del agua corriente: los « ojos » en los que la suciedad se acumula principalmente, se suprimirán con un cuchillo de punta. Ya limpias, se introducen durante una hora en una solución de sublimado a 1 por 1000, y después se les quitan los restos de este desinfectante químico, lavándolas otra vez en agua corriente. Dispuestas así las patatas se las envuelve por parejas en papel de filtro y se esterilizan durante dos horas en la marmita, o mejor una nada más, en el autoclave a 1 atmósfera de presión, quedando con ello preparadas para el uso. A pesar de la esterilización combinada, química y por calor, con frecuencia queda algún germen en las patatas, porque en su piel pueden quedar algunos esporos, extraodinariamente resistentes. Se conservan más tiempo y quedan mejor protegidas contra la sequedad, si después de mondar la patata con un cuchillo esterilizado a la llama, se cortan lonchas de su interior, o con un sacabocados esterilizado se extraen trozos cilíndricos que se colocan en placas o en tubos esterilizados y se someten nuevamente a la esterilización durante media hora.

La ausencia absoluta de gérmenes en el medio de cultivo empleado, es condición indispensable para obtener cultivos puros en los que se pueda observar la especie de un microorganismo sin que perturben la observación otras especies extrañas; esa carencia absoluta de gérmenes han de ofrecer también los tubos, los matraces, las placas de cultivos, los cristalizadores y cuantas otras vasijas puedan emplearse para guardar los medios de cultivos. Los objetos de cristal se esterilizan manteniéndolos durante tres cuartos de hora en un esterilizador seco de aire caliente a 160°.

Para esterilizar la mayor parte de los líquidos basta exponerlos de 30 a 60 minutos a la acción del vapor en el esterilizador de KOCH. Es

más seguro aún emplear una ligera presión de 0'15 de atmósfera a 103° durante una hora. Los gérmenes muy resistentes, como los esporos del heno, mueren con seguridad valiéndose del vapor a presión. Los aparatos en que se utiliza el vapor a presión a una atmósfera como mínimo se llaman autoclaves. En vapor a presión, a 120°-130° mueren los esporos más resistentes al cabo de algunos minutos.

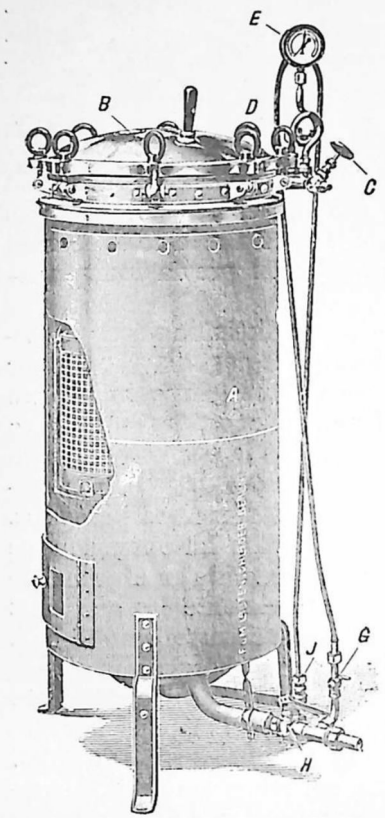


FIG. 29. Autoclave con manómetro regulable automáticamente

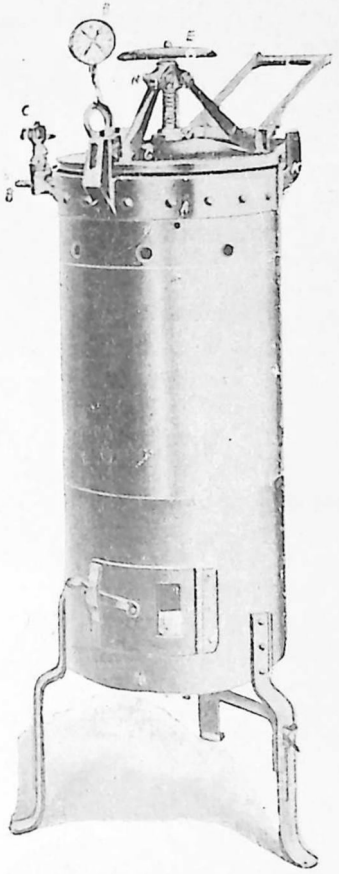


FIG. 30. Autoclave

Los objetos más pequeños, usados para la siembra y cultivo de los microorganismos, tales como agujas de platino, cuchillos, varillas de cristal, tijeras y pinzas se esterilizan al rojo en la llama.

El instrumental de operaciones se esteriliza hirviéndolo durante quince minutos en una solución de carbonato de sosa al 2 %.

Para ciertas substancias que no soportan la ebullición, ni el calor seco, sin sufrir alteraciones, como ocurre con el suero, la albúmina de huevo, etc., se recomienda la esterilización fraccionada o el filtrado por filtros CHAMBERLAND, BERKEFELD, PUKALL, ISNY o amianto.

Con el primer procedimiento se mantienen tales substancias o soluciones que las contienen de una a cuatro horas a temperaturas de 56° a 60° durante ocho días consecutivos, y el resto del tiempo de esos mismos días se mantienen en la estufa a temperaturas de 20° a 37° ; por la elevación diaria de la temperatura se matan cada vez las formas existentes no provistas de esporos, y por la permanencia en la estufa se facilita la germinación de los esporos dando lugar al desarrollo de nuevos gérmenes, los cuales son destruídos en los calentamientos sucesivos. Con todo, este método no es seguro, porque no todos los esporos germinan entre dos elevaciones térmicas ; además, algunas bacterias, las termófilas, alcanzan su mayor desarrollo a los 60°. Por eso es recomendable extraer estériles los líquidos orgánicos (líquido ascítico), y cuando hay que guardarlos mucho tiempo añadir un 1 % de cloroformo y agitar fuertemente para conservarlos.

Para impedir que gérmenes extraños procedentes del aire o del polvo penetren en las vasijas después de esterilizadas, basta un espeso tapón de algodón. Hasta aquí por lo que respecta a la esterilización de medios de cultivo y objetos usados, condición previa indispensable para obtener cultivos puros.

Vamos a tratar ahora de la separación de las distintas clases de gérmenes, existentes generalmente en el material de partida, para aislar y cultivar la especie deseada, libre de todos los otros gérmenes intrusos y extraños. En muchos casos, la primera medida para obtener un cultivo puro es la inoculación en animales, con la cual, de la primitiva mezcla existente (por ejemplo bacilos de la tuberculosis en las heces), se desarrollan en el cuerpo del animal únicamente los gérmenes patógenos y desaparecen los saprofíticos que pudieran existir. La obtención de cultivos puros en medios artificiales se funda siempre en el principio de diluir tanto el material de partida, que finalmente los gérmenes queden aislados unos de otros, y de este modo al desarrollarse formen colonias compuestas de individuos de la misma especie sin mezcla de microbios extraños. Primeramente se trató de lograr el aislamiento (Pasteur, Klebs) por diluciones progresivas en vehículos líquidos para obtener luego cultivos puros en medios también líquidos (caldo). El procedimiento es complicado e inseguro, porque es muy difícil comprobar si el cultivo obtenido es efectivamente puro y apenas puede evitarse la contaminación casual de algún germen extraño que pulula muy pronto en el cultivo. La siembra en medios sólidos (patatas) es más apropiada para obtener cultivos puros, porque el aislamiento entre colonias vecinas es más riguroso y no se verifica con tanta facilidad la superposición de una especie con otra ; sin embargo, la separación de gérmenes mediante la extensión en un medio sólido es más imperfecta que por dilución en un líquido. R. Koch resolvió satisfactoriamente el problema con la introducción de medios de cultivo gelatinosos y transparentes, en estado líquido primero para diluir en ellos el material de siembra, y luego sólidos para favorecer el crecimiento aislado de los gérmenes hasta constituir colonias separadas de la misma

especie, reuniendo así las ventajas de los medios líquidos y sólidos sin los inconvenientes de unos y otros.

El primer medio gelatinoso usado por R. Koch fué la gelatina, cuyo uso estaba limitado por su bajo punto de fusión (29°), ya que existen bacterias que a los 37° alcanzan su máximo de desarrollo, y naturalmente para ellas no puede emplearse. El substitutivo de la gelatina, el agar-agar, introducido por Hesse, significó un progreso notable en la técnica bacteriológica. El agar-agar funde de los 90° a los 100°, y a los 40° comienza a solidificarse. Otra ventaja aun mayor del agar consiste en que no se licúa por los fermentos bacterianos y, por consiguiente, las placas se conservan más tiempo que las de gelatina.

En lugar de las placas usadas al principio por Koch, se emplean hoy generalmente las de Petri, que son más cómodas de manejar y con su tapa quedan mejor protegidas de las impurezas del aire.

El trabajo en una serie de placas de gelatina debe ajustarse a las indicaciones siguientes :

1. Sobre la tapa de 3 placas de Petri se escribe con lápiz blando el nombre del investigador, la clase del material estudiado, la fecha y las cifras romanas I, II, III.
2. Con las cifras I, II, III, se señalan también tres tubos de gelatina líquida introducidos en baño maría a 37° de temperatura.
3. Con el asa de platino esterilizada se toma el material de estudio y se siembra el tubo I, habiendo quemado antes el borde del tubo y chamuscado el tapón de guata. Rodando e inclinando el tubo, se mezcla bien el material con la gelatina, teniendo cuidado de no mojar el algodón.
4. Del tubo I se trasladan tres asas al II y se procura la mezcla en igual forma que para el I, el cual habrá vuelto al baño maría, donde también pondremos el tubo II.
5. Cuando el material es muy rico en gérmenes, se siembran algunas asas del tubo II en el III, etc.
6. Después de pasar el borde de los tubos por la llama, se les vierte sobre las placas del mismo número, que estarán colocadas sobre la tapa, exactamente horizontal, de una cubeta llena de agua helada. El líquido vertido se extiende uniformemente sobre la placa mediante ligeros movimientos que se imprimen a ésta. Después se llevan las placas, con el fondo vuelto hacia abajo, a la estufa, a 22°. A los dos o tres días, los gérmenes separados y fijos por la repentina solidificación de la gelatina, se han desarrollado en colonias aisladas.

Ha de tenerse en cuenta que los tubos que contienen el medio de cultivo deben mantenerse inclinados en el momento de las siembras cuando están sin tapar, porque en posición vertical es más fácil que se introduzcan en ellos polvo y bacterias procedentes del aire.

Luego de haber vertido los tubos de gelatina que han servido para la siembra, no deben abandonarse por el laboratorio, sino que, para evitar una posible infección, se colocarán inmediatamente en un recipiente con sublimado dispuesto para este fin.

Cuando no se dispone de placas ni cubetas, puede emplearse en caso de necesidad el procedimiento de Esmarch.

La gelatina (5 c. c.) se liquida en el tubo de cultivo y después se solidifica uniformemente sobre la superficie interior del tubo, haciendo girar a éste rápidamente en posición horizontal sobre trozos de hielo, o bien exponiéndolo en igual forma al chorro del agua.

El procedimiento de la gelatina no es apropiado para bacterias, que la funden. Se hace difícil pasar luego el cultivo a otros medios, y es fácil que se funda la gelatina sólo con tomar el tubo teniendo las manos calientes.

En forma semejante a la descrita para la gelatina se puede preparar también una serie de placas de agar.

Los tubos de agar se mantienen líquidos a la temperatura de 45°. Es preciso trabajar de prisa, porque los gérmenes sembrados en los tubos de agar pueden perjudicarse por la temperatura de 45° del baño maría y, por otra parte, si descendemos la temperatura del baño en que están los tubos es de temer que el agar se solidifique.

Para evitar esto, resulta práctico, cuando se trabaja con placas de agar, conseguir primeramente la dilución conveniente de los gérmenes, sembrando éstos primero en tres tubos de caldo que contengan 1 centímetro cúbico, aproximadamente, cada uno, y luego, inmediatamente antes de llenar las placas, mezclar cada uno de estos tubos con otro de agar líquido. Las placas de agar sólido se ponen invertidas en la estufa a 37° para evitar la condensación de vapor de agua sobre la superficie del agar, pues al correrse las gotas de agua condensada pudieran reunir las colonias aisladas, con lo que fracasaría la obtención del cultivo puro.

Con más frecuencia que el procedimiento anterior, se emplea para el aislamiento de gérmenes el de sembrar superficialmente sobre el agar el material que ha de investigarse. Para ello, sirviéndonos del asa de una varilla de cristal o de una torunda de algodón, el material que hay que examinar se extiende en líneas paralelas o restregándolo uniformemente sobre la superficie del agar, que a este fin estará en placas recién preparadas y secas en la estufa. Lo más apropiado a este objeto son las varillas dobladas en ángulo recto empleadas para el diagnóstico de la fiebre tifoidea, de v. Drigalski y Conradi, pero que también pueden emplearse en otros casos.

Si es necesario puede también conseguirse el aislamiento de gérmenes, sin placas, directamente, utilizando tubos que contengan el agar sólido inclinado. Para la siembra se procede trazando con el asa una estría recta u ondulada, que parte desde el agua de condensación del fondo del tubo hasta el límite del agar próximo a la boca. Para obtener cultivos puros hay necesidad de sembrar varios tubos con la misma aguja infectada una sola vez en la substancia ; para aumentar notablemente la diseminación de los gérmenes se puede quemar la aguja después de sembrar cada tubo, y para la siembra del siguiente se toma el material del agar del anterior situado cerca de la boca, que es donde los gérmenes serán más raros.

El procedimiento a la tinta china indicado por Burri en 1909, es la forma más lógica del método de dilución aplicado al aislamiento de gérmenes; mediante el mismo se consiguen, con las mayores garantías de precisión, cultivos de colonias procedentes de una única célula bacteriana, necesarios principalmente para algunos estudios teóricos sobre la variabilidad.

De una emulsión esterilizada de tinta china, preparada especialmente, se toman algunas gotas que se depositan sobre un portaobjetos bien limpio y esterilizado. Del material que contiene gérmenes se extiende un poco sobre la primera gota; de ésta, por medio de un asa de un milímetro de diámetro, se toma una pequeñísima porción y se lleva a la segunda gota, y de ésta, haciendo lo mismo, se pasa a la tercera y así sucesivamente, sin quemar a la llama el asa. En la última gota, en la cual la dilución de gérmenes es mayor, se moja una pluma de dibujo y con ella se señalan cuidadosamente una serie de puntos sobre una placa de gelatina. Los puntos de tinta, cubiertos con un cubreobjetos, se observan al microscopio con grandes aumentos. Así se pueden ver con facilidad las bacterias brillantes entre las obscuras partículas de tinta. Aquellos puntos de tinta que sólo contengan una bacteria se marcan con un signo sobre la cara inferior de la placa, y de la colonia que salga de esa célula aislada se hacen siembras posteriores.

En algunos casos se puede favorecer el aislamiento de una especie determinada, creando en el medio de cultivo las condiciones más favorables a la misma (alcalinización para el cólera), o añadiendo substancias que sean indiferentes a tal especie y que impidan al mismo tiempo el desarrollo de las otras bacterias que habitualmente la acompañan (*V.* el capítulo Fiebre tifoidea).

Para el cultivo de bacterias es indispensable una estufa termoestática, o termostato, es decir, provista de un termo-regulador automático que mantiene la temperatura constante. Para las necesidades ordinarias bastan dos estufas, una de las cuales, a temperatura de 37°, se destina a las placas de agar, y la otra, a 22°, a las de gelatina. Para fines especiales son necesarias otras temperaturas ; así, los bacilos de la tuberculosis se cultivan a 38°, los de la peste a 30° o 35°, y el bacilus botulinus de 23° a 25° solamente.

En la incubación de placas a 37°, en muchos casos pasadas diez a veinticuatro horas existen ya colonias que, observadas al microscopio con pocos aumentos, permiten definir la especie de bacterias a que pertenecen. Otras bacterias necesitan más tiempo para su desarrollo; así ocurre con el bacilo de la tuberculosis, el de la fiebre de Malta y el de la peste. La colonia que convenga para fines determinados se siembra con la aguja de platino esterilizada, auxiliándose si es preciso, al tomar la semilla, del microscopio con débil aumento. Esta «pesca» de la colonia con el auxilio del microscopio requiere cierta práctica y presenta dificultades, debidas, en parte, a la inversión de imágenes en el microscopio y, en parte también, a la posibilidad del choque con el objetivo. Tomado el material, se puede observar teñido o vivo y sin teñir, o bien sembrar con él, por estría o por picadura, otros medios para obtener o preparar cultivos puros que hayan de observarse o identificarse más tarde.

En muchos casos, por ejemplo, en la investigación de la difteria, conviene obtener imágenes fieles de la situación característica de las bacterias dentro de la colonia, situación que se altera naturalmente en las preparaciones ordinarias por extensión ; esto se logra mediante la preparación por impresión colocando un cubreobjetos sobre la colonia y levantándolo luego sin desplazarlo lateralmente.

Hay toda una serie de bacterias para las cuales no bastan los métodos de cultivo ordinarios, como sucede con los anaerobios obligados o pro-

piamente dichos, es decir, con las bacterias capaces de crecer únicamente con exclusión del oxígeno. A continuación indicaremos brevemente los métodos de cultivo peculiares a esta clase de microbios.

He aquí los medios de eliminar el oxígeno:

1.° Hervir el medio ya sea caldo, gelatina o agar, ocluyéndolo inmediatamente del aire, cubriéndolo con una capa de otra substancia. Si la siembra se verifica en agar líquido a 40° de temperatura, es necesario la solidificación inmediata y rápida del medio; en la siembra de las capas profundas de agar no es necesario colocar otras encima. Sin embargo, es conveniente cubrir el medio con una capa de agar líquido, de aceite esterilizado o con parafina líquida. Este método es apropiado para la siembra de cultivos en tubos bien llenos de agar o caldo, pero ofrece el inconveniente de no ser limpio, porque al hacer siembras posteriores molesta la capa de substancia grasa o de agar-agar. La mejor manera de examinar los anaerobios, cultivados en agar por picadura o sencilla siembra, es la siguiente:

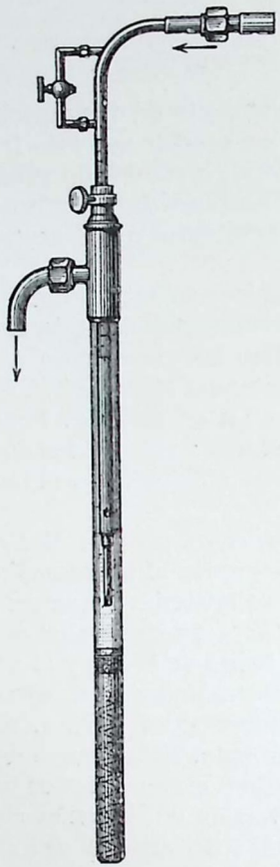


Fig. 31. Termo-regulador (F. y M. Lautenschläger, Berlín)

Con un diamante de vidriero se corta el tubo de ensayo por el centro o se quiebra golpeando el fondo del tubo sobre una cubeta con sublimado y se sacude el agar sobre una placa de Petri esterilizada, o bien se calienta el tubo sumergiéndolo en agua hirviendo, con lo que la parte exterior del agar se funde. Así, se vierte luego con facilidad la parte todavía sólida del agar sobre una placa preparada de antemano. Con el último procedimiento se conserva el tubo de ensayo. Con un cuchillo esterilizado se corta luego el agar en pequeños discos, de los cuales se toma, por medio de la aguja de platino, el cultivo para hacer preparaciones y siembras. El estudio y siembra de los cultivos en caldo cubiertos con una capa de vaselina líquida, por ejemplo, se hace tomándolos del tubo con una pipeta capilar, cuyo extremo superior ancho se tapa con el dedo, luego se introduce rápidamente a través de la capa de aceite que sirve de cierre al tubo, para que se llene en el fondo del caldo, donde los cultivos serán más puros.

2.° Añadir un reductor al medio de cultivo, por ejemplo, azúcar, formiato de sosa, o trozos de patatas o de órganos animales (Tarozzi).

3.° Por procedimientos químicos, mediante una solución alcalina de ácido pirogálico.

Según el procedimiento de Buchner, el tubo sembrado, ocluído simplemente con algodón, se coloca dentro de otro tubo fácil de tapar herméticamente, en cuyo fondo hay una armazón de alambre para sostener el tubo introducido, y debajo, la solución alcalina de ácido pirogálico (1 gr. de ácido pirogálico, más 1 c. c. de solución de

potasa cáustica al $^1/_{10}$ por 100). A las veinticuatro horas, el oxígeno del aire existente en el tubo quedará eliminado por completo.

Con las placas de Petri es muy adecuado el sencillísimo procedimiento siguiente, debido a O. Lentz:

Un anillo de fieltro impregnado de ácido pirogálico, del mismo tamaño que una placa de Petri, se coloca sobre una lámina cuadrada de cristal de unos 12 centímetros de lado. Sobre el anillo de fieltro, empapado previamente con 15 c. c. de lejía de potasa al 1 %, se coloca invertida la placa de agar sembrada, e inmediatamente se ajusta alrededor del borde de la placa un anillo de plastilina que impide herméticamente la entrada del aire. Este procedimiento permite observar al microscopio el crecimiento de las colonias estando cerrada la placa. Con barras de pirogalol usadas en igual forma, se consiguen también cultivos de anaerobios en tubos. Lo mismo se logra, según Heim, con bolas de algodón embebidas en solución pirogálica alcalina. En el cultivo en placas se puede conseguir también impedir la entrada del oxígeno del aire, cubriendo con discos de mica las placas, inmediatamente después de sembradas.

4.° Eliminar el aire con auxilio de una trompa de vacío.

5.° Desalojar el oxígeno por medio del hidrógeno,

que sale del aparato de Kipp, haciéndolo pasar antes a través de dos frascos lavadores que contengan una solución yodo-yodurada o una solución alcalina pirogálica, para limpiarlo de los vapores ácidos y del aire. Desde los frascos el gas pasa por un tubo que se introduce hasta el fondo del recipiente que contiene el medio líquido empleado para el cultivo, y, junto con el aire que hubiera en el interior, sale por un tubo corto situado en la parte superior del mismo recipiente. Para comprobar si el aire ha sido desalojado del todo, se enciende el gas expulsado recogiéndolo en un tubo de ensayo; si el hidrógeno sale puro, se inflamará con un estallido agudo y breve, mientras que si se produce un ruido silbante indicará el gas explosivo, es decir, la mezcla de hidrógeno y aire. Cuando éste ha sido expulsado por completo se cierran a la lámpara los tubos de entrada y salida.

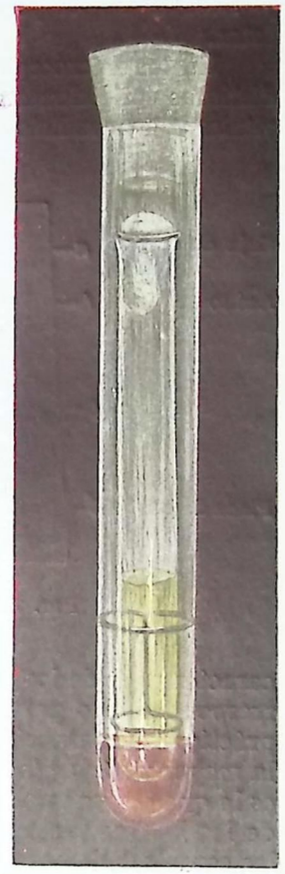


Fig. 32. Cultivo de anaerobios, según Buchner

Este procedimiento es apropiado para los cultivos en tubo, en frascos y en matraces. Cuanto mayor sea el espacio lleno de gas que exista sobre el medio de cultivo dentro del recipiente empleado, con tanto más cuidado habrá que fijarse en que el aire haya sido desalojado por completo por el hidrógeno, y más peligroso será encender —como suelen hacerlo impremeditadamente algunos principiantes— el gas directamente en el orificio de salida, porque si queda dentro del recipiente alguna mezcla de aire e hidrógeno (gas explosivo) puede retroceder la llama y dar lugar a una explosión que destruirá el frasco. Las heridas que pudiera sufrir el experimentador son muy peligrosas, porque muchos de los gérmenes anaerobios (gangrena gaseosa, tétanos) pueden infectarlas. Esta advertencia se tendrá muy en cuenta espe-

cialmente al usar el aparato de BOTKIN para los cultivos en placas; su disposición y manejo puede deducirse de la figura 34. La prueba del gas a la salida se verifica de manera segura y sin peligro, haciéndolo salir por un tubo introducido en agua y recogiéndolo con otro de ensayo, como hemos dicho anteriormente. El aparato de BOTKIN destinado a los cultivos en masa se suple prácticamente con los pequeños aparatos de BLÜCHER, que sirven únicamente para una sola placa y habrán de emplearse, por consiguiente, en número igual al de éstas.

En los microorganismos sembrados sobre diferentes medios y en distintas condiciones exteriores pueden estudiarse sus **manifestaciones vitales** y las **condiciones necesarias a su vida.** Rara vez basta una sola

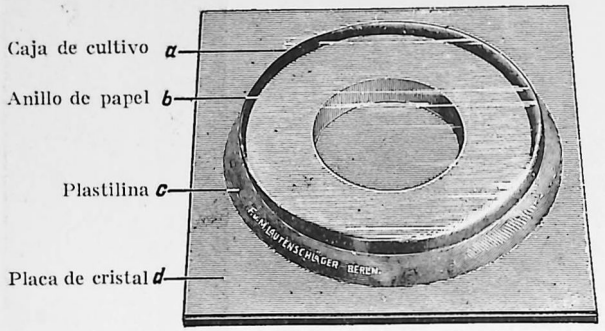


FIG. 33. Placa de anaerobios, según LENZ

característica de los cultivos así observados para definir la especie correspondiente o para identificarla con seguridad, que es el resultado práctico más importante del diagnóstico diferencial microscópico. En la mayor parte de los casos el enlace regular de una serie de caracteres es lo que define una especie, como ocurre principalmente en los grupos de los bacilos tíficos, paratíficos y de la disentería. La constancia de las características de cultivo, junto con las morfológicas (*V.* Capítulo II) y sobre todo el resultado de la inoculación en animales y las reacciones de inmunidad (*V.* Capítulo V), definen la especie de cada microbio. Desde luego ocurren incidentalmente ciertos apartamientos del tipo normal, excepciones de la regla general, que enumeraremos brevemente. Estas excepciones, que se reúnen en el concepto común de variabilidad, pueden presentar tres modalidades distintas :

1. *Degeneración*, que se manifiesta por la pérdida de determinadas propiedades tales como la cromógena, o la de producción de toxinas y fermentos, causada por ser antiguo el cultivo o desarrollarse en condiciones desfavorables. En esto estriba la pérdida de virulencia en razas de gérmenes de laboratorio cultivados durante mucho tiempo.

2. *Adaptación o acomodación, es decir, modificaciones debidas a la influencia del medio*, que dan origen, al parecer, a especies nuevas o variedades. Las cualidades adquiridas pueden ser morfológicas o funcionales; cambio de forma, de coloración, de virulencia, de movilidad, formación de esporos, de fermentos y de toxinas, acomodación a temperaturas no soportadas antes, a nuevas substancias nutritivas, a la tensión de oxígeno, etc. Todas ellas pueden desaparecer más tarde, recobrando

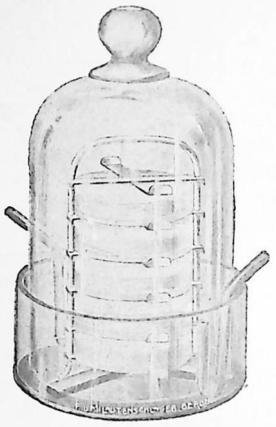


FIG. 34. Aparato de BOTKIN

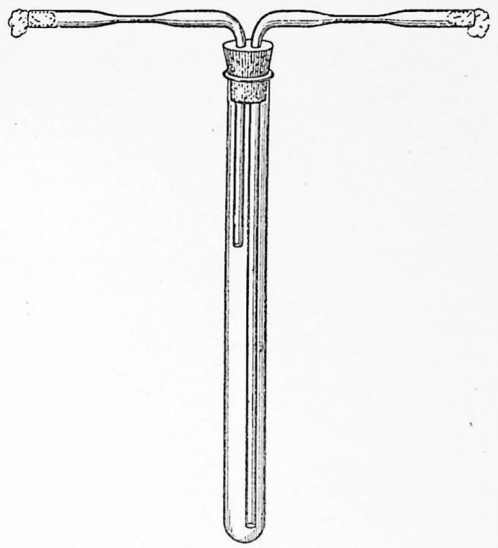


FIG. 35. Tubo de anaerobios, según FRAENKEL y HUEPPE

la especie su antiguo tipo, tan pronto como cesa la influencia anormal del medio vital y se pone el cultivo en circunstancias favorables.

3. *Mutación* (de VRIES). Así se llama la aparición repentina y espontánea, no determinada por circunstancias exteriores, de nuevas razas, tipos y especies cuyas cualidades son transmisibles y permanentes, y que difícilmente y muy rara vez recobran las formas primitivas.

Aun cuando es importante no perder de vista las posibles variaciones de los microorganismos, para no dejarse engañar respecto a la aparición de formas atípicas de la especie a que pertenecen (sobre todo al principio y al fin de una epidemia), no es menos importante, sin embargo, someter esos casos sorprendentes a la más severa crítica y pensar siempre en los errores que pueden cometerse con motivo de esas apariencias, cuando por cualquier causa los cultivos han sufrido alguna contaminación. Unicamente, después de excluir por com-

pleto los errores que pudieran provenir de no haber seguido con rigor los requisitos para obtener cultivos puros, puede establecerse que existe una mutación en los microbios.

Trataremos a continuación de las condiciones particulares de la vida y sus manifestaciones en los microorganismos, que constituyen sus características de cultivo.

1. Condiciones necesarias para la vida de los microorganismos

No puede afirmarse que las bacterias, ni aun las de la misma especie, tengan una composición química típica, comprobable por el análisis o por una reacción química determinada, porque oscila extraordinariamente y depende mucho de la composición del medio de cultivo. Las bacterias son altamente adaptables por razón de su composición química a la del medio de cultivo, y este hecho capacita de manera particular a muchas de ellas para vivir indistintamente en condiciones saprofíticas o como parásitos, es decir, que encuentran las condiciones necesarias para vivir y reproducirse, ya sea en organismos animales, ya sea en la libre naturaleza. Por mucho que varíe la composición química cuantitativa de las bacterias, debemos, sin embargo, aceptar para cada especie, una característica química completamente específica. Esto se deduce de la constante formación de varios productos (fermentos, toxinas específicas, etc.), y sobre todo de la distinta composición específica de las albúminas del cuerpo de las bacterias, según se demuestra por las reacciones serológicas (*V.* Capítulo V).

La célula de los microorganismos consta, como todos los seres vivos, de albúmina, grasas, hidratos de carbono, agua y sales. Además de las albúminas ordinarias, se ha comprobado también la existencia de nucleínas, lo cual viene a confirmar la presencia de una substancia nuclear, demostrada ya por el estudio morfológico. Entre los hidratos de carbono se han determinado la celulosa y la hemicelulosa (reacción del yodo). Las grasas se han comprobado en las bacterias, tanto por la reacción química de grasas del extracto etéreo, como también químicamente por coloración especial con materias colorantes de las grasas. En el bacilo de la tuberculosis la grasa es una verdadera cera. Según Koch, la cubierta de los bacilos de la tuberculosis, a la que deben su resistencia a los ácidos, está constituída por ácidos grasos no saturados. Abona la exactitud de esta hipótesis el que, con el extracto etéreo, la substancia ácido-resistente pasa al éter, y los bacilos, libres de grasa, pierden al mismo tiempo su resistencia a los ácidos. También los esporos deben su gran resistencia, al menos en parte, a su contenido en grasa, el cual determina también su aspecto refringente. Entre las sales parece ser que las de ácido fosfórico tienen especial importancia en la composición de algunas bacterias (meningococos).

Lo que acabamos de indicar acerca la composición química de las bacterias es aplicable, en general, a los estreptotrices, a los hifomicetos y a los blastomicetos. De la constitución química de los espiroquetos, protozoarios y virus filtrables nada sabemos todavía, porque aun no se ha conseguido obtener estos microbios, cuando es posible cultivarlos artificialmente separados del medio de cultivo, en cantidad suficiente para la investigación química.

Respecto de sus necesidades nutritivas, las tres clases de microorganismos nombrados últimamente presentan en común una perfecta diferencia con relación a los vegetales, demostrando en cambio las bacterias, por su nutrición, un carácter decididamente vegetal. Los protozoarios, espiroquetos y gérmenes infecciosos filtrables, como parásitos obligados se alimentan exclusivamente de substancias orgánicas completamente formadas (1), mientras que las bacterias estreptotrices, hifomicetos y blastomicetos son capaces tanto de destruir la complicadísima substancia celular del organismo huésped, como de construir su propia célula bacteriana de las más sencillas combinaciones orgánicas. Las especies rigurosamente parásitas cubren sus necesidades de nitrógeno, exclusiva o principalmente con albúmina o con sus derivados inmediatos, albúminas, peptonas, gelatina, y las especies parásitas facultativas extraen el nitrógeno de combinaciones sencillas que le contienen (amidoácidos, aminas, amoníaco). Anteriormente hemos dicho que hay microorganismos patógenos, por ejemplo, el bacilo de la tuberculosis, capaces de desarrollarse en medios libres en absoluto de albúmina. Si comparamos su nutrición con la de las plantas de órdenes más elevados, existe una doble diferencia. En primer lugar, los microorganismos vegetales no pueden aprovechar el nitrógeno de los nitratos, y, por otra parte, como los microorganismos carecen de clorofila, no pueden extraer el carbono, que les es indispensable, del anhídrido carbónico de la atmósfera; para nutrirse de carbono les sirven de preferencia los hidratos de carbono, así como la glicerina, ácidos grasos y otras substancias parecidas.

Con respecto a la concentración y reacción del medio de cultivo aparecen diferencias considerables en las exigencias y óptimas condiciones vitales de los distintos microorganismos vegetales. Las bacterias prefieren, generalmente, medios líquidos o muy acuosos, mientras que los hifomicetos crecen hasta en medios muy concentrados, casi secos al parecer. Para la mayor parte de las bacterias, lo mejor es un medio que dé una reacción débilmente alcalina, mientras que los hifomicetos y blastomicetos prefieren una reacción ácida. Sin embargo, también respecto de la reacción del medio se comportan muy distintamente las diversas especies de bacterias. Así, el vibrión del cólera, por ejemplo, prefiere para su desarrollo un medio con un grado de alcalinidad elevado, y es, en cambio, muy sensible a los ácidos. En

(1) Algunos protozoarios (amibas) se han de nutrir precisamente con albúmina orgánica preformada y no se sostienen con sólo materias disueltas. El cultivo de estas amibas se consigue únicamente en presencia de bacterias que les sirven de alimento. También los flagelados se nutren con bacterias, especialmente en el agua.

contraposición con estas bacterias sensibles a los ácidos hay otras a las que favorece un cierto grado de acidez, por ejemplo, las bacterias del vinagre (2 por 100 de acidez), y lo mismo ocurre con ciertas bacterias fecales de los niños de pecho y con el bacilo de la fiebre tifoidea. Estas especies que prefieren los ácidos reciben el nombre de «acidófilas».

La necesidad de oxígeno varía para las distintas especies de bacterias. Llamamos «aerobios obligados» a los microorganismos que necesitan de manera imprescindible el oxígeno libre para vivir y multiplicarse, y «anaerobios obligados» a los que únicamente son capaces de desarrollarse con exclusión del oxígeno. Entre ambos grupos están los «anaerobios facultativos», es decir, aquellos microorganismos que pueden desarrollarse en presencia del oxígeno o sin él. Los anaerobios toman el oxígeno de los medios que descomponen, en tanto que los aerobios asimilan directamente el oxígeno del aire. También los espiroquetos requieren la exclusión del aire en sus cultivos.

Las bacterias exigen una temperatura determinada para el desarrollo de sus manifestaciones vitales. Al acercarnos a los límites de esa temperatura observaremos ciertas alteraciones en sus cualidades normales. El bacillus prodigiosus, por ejemplo, que a la temperatura ambiente produce una hermosa substancia de color rojo y cuyos cultivos desprenden un olor característico a trimetilamina, pierde ambas propiedades si se le cultiva a la temperatura de 37°. Si sobrepasamos los límites de la temperatura por exceso o por defecto, la vida cesa. Con temperaturas más bajas cesan, en efecto, las manifestaciones vitales de las bacterias, pero éstas quedan en estado de vida latente y puestas en condiciones favorables recobran sus anteriores propiedades. Las temperaturas más bajas conseguidas hasta hoy (-180°, temperatura del aire líquido) no consiguen aniquilar la vitalidad de las bacterias, ni destruyen sus cualidades patógenas. De manera muy distinta obran las temperaturas elevadas. Su efecto nocivo bien marcado se percibe ya a temperaturas que sobrepasan en poco a la óptima de crecimiento. La muerte llega muy pronto ; en las bacterias no esporuladas en estado húmedo ocurre de 55° a 60°. Los esporos son notablemente más resistentes (*V.* Capítulo II).

Es interesante que ciertas condiciones vitales desfavorables pueden ser compensadas por otras favorables. El bacilo del carbunco, por ejemplo, crece a la temperatura ambiente y a la de la estufa, pero en el primer caso se desarrolla menos. Si a la gelatina sembrada de carbunco se le añade sublimado en proporción de 1 : 400000, a la temperatura ambiente cesa el desarrollo, pero a la temperatura de la estufa continúa el crecimiento, y para detenerlo hay que añadir sublimado en cantidad diez veces mayor. La temperatura favorable compensa en esta experiencia las circunstancias desfavorables creadas al añadir el antiséptico.

El límite superior de calor en el cual es posible el desarrollo de las bacterias se denomina máxima de temperatura (para bacterias patógenas casi nunca excede de 42°), el más bajo se llama mínima de temperatura (no inferior a 5°). Entre ambos existe una zona particularmente favorable que llamamos temperatura óptima.

Es posible habituar a las bacterias a temperaturas que desde luego no les sean apropiadas, como se ha conseguido, por ejemplo, para el bacilo del carbunco y el neumococo. Algunas bacterias viven fuera por

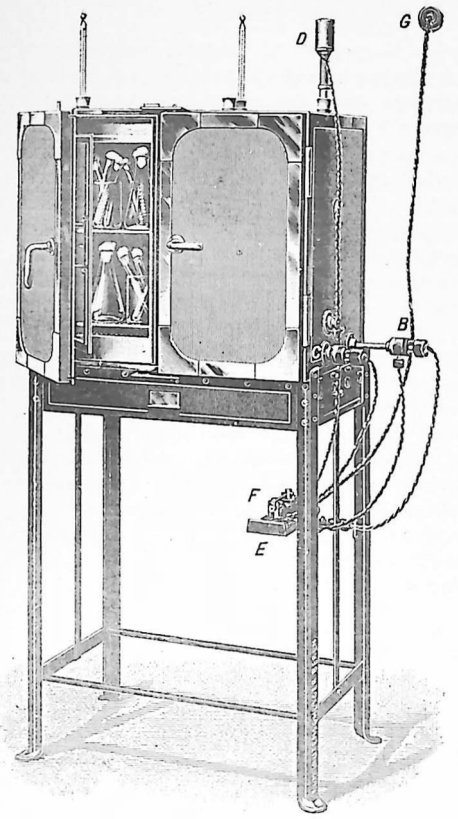


Fig. 36. Estufa eléctrica

completo de los límites ordinarios de temperatura, de tal modo que se desarrollan entre los 60° a los 70°, y no son capaces de soportar temperaturas inferiores a 45°. Estas bacterias termófilas se han encontrado principalmente en manantiales calientes. Se encuentran, además, muy repartidas en las capas superficiales del suelo y abundan especialmente en los trópicos. Junto a estas bacterias estrictamente

termófilas hay otras termotolerantes, que si bien crecen a temperaturas elevadas, les es más favorable la temperatura ordinaria de la estufa. Lo contrario de estas bacterias son aquellas que se desarrollan extraordinariamente aun a la temperatura de 0°; se las encuentra principalmente en el suelo y en el agua del mar.

2. Manifestaciones vitales de los microorganismos

Los cambios de energía y de materia motivan aquí, como en todos los seres vivos, las necesidades de :

1. Reposición de las cantidades de energía gastada constantemente.
2. Formación de nuevo plasma vivo por crecimiento y proliferación.

El conocimiento de los productos del metabolismo en las bacterias es de gran valor práctico. Permite explicar los efectos patógenos de las bacterias en el organismo infectado a consecuencia de los productos tóxicos elaborados por ellas, y es un auxiliar muy valioso en el diagnóstico para distinguir especies parecidas, difíciles y quizá imposibles de diferenciar morfológicamente. Hay manifestaciones vitales que son específicas para una u otra clase de bacterias, porque aparecen constantemente si las condiciones del medio no cambian. Los productos metabólicos son extraordinariamente variados ; algunos de ellos son peculiares de bastantes especies, mientras que otros sólo son elaborados por especies determinadas.

La cualidad esencial de las bacterias consiste, generalmente, en la eliminación de substancias orgánicas en forma de sencillos elementos químicos. En esta actividad de las bacterias se funda el importante papel que desempeñan en la economía de la naturaleza, en virtud del cual se cierra el círculo de la transformación de la materia orgánica entre el reino animal y el vegetal.

Casi todas o probablemente todas las bacterias tienen la propiedad de actuar como reductoras. Esta propiedad se hace visible al añadir una substancia colorante a los medios nutritivos, con lo cual se demuestra la presencia de productos que decoloran el medio. Las materias colorantes más apropiadas para estas reacciones son, principalmente, el tornasol, el azul de metileno y el rojo neutro, substancias que desempeñan importante papel en el diagnóstico diferencial. La actividad reductora de las bacterias se demuestra en forma muy ingeniosa con un medio de cultivo al que se añade seleniato o telurato de sodio. El metal queda libre, con lo cual el cultivo se tiñe en rojo, si al medio se le adicionó selenio, y en negro si se añadió teluro.

Otra propiedad de las bacterias es la formación de hidrógeno sulfurado que se desprende en todos los procesos de putrefacción. Como materias para demostrar esta propiedad, además de la albúmina y la peptona, pueden emplearse todos los cuerpos que contienen azufre en forma fácilmente reductible (sulfatos, hiposulfitos, etc.) En los cultivos se comprueba la existencia de H_2S por medio de papel de filtro impregnado de acetato básico de plomo, el cual se colorea en negro

si existe H_2S. Otros productos gaseosos derivados del metabolismo microbiano son el CO_2, NH_3, H y CH_4.

Mencionemos también la formación de indol, peculiar de varias especies de bacterias ; la presencia de indol o su falta se utiliza en el diagnóstico diferencial (*V.*, más adelante, diagnóstico de la fiebre tifoidea).

Es interesante también la capacidad de ciertas bacterias para producir pigmentos, de manera que las colonias adultas ofrecen un aspecto magníficamente coloreado. Entre las bacterias patógenas que elaboran pigmentos se encuentran los staphilococcus pyogenes aureus y citreus con pigmento dorado y amarillo limón, respectivamente, y el bacillus pyocyaneus, germen del pus verdoso. Entre las bacterias saprofíticas que forman pigmentos, citaremos el bacillus prodigiosus con su conocido color rojo y el bacillus cianogenes, germen que da un tono azulado a la leche. En la formación de pigmentos, además del medio nutritivo, intervienen ciertas sales minerales, como la magnesia en combinación con el azufre ; el fenómeno de la fluorescencia es debido a la presencia del fósforo. La presencia del oxígeno y el sostenimiento de determinadas temperaturas son, a menudo, condiciones necesarias para la formación de pigmentos.

Es de mencionar también el desarrollo de luz de ciertas bacterias (fotobacterias), observadas en el agua marina, con gran frecuencia en los peces del mar, en carnes y en materias en putrefacción, bacterias cuyo cultivo se ha logrado. La presencia de oxígeno libre es indispensable para que desprendan luz.

De las diversas transformaciones de la materia puede resultar un cambio en la reacción del medio de cultivo, ya sea por la formación de ácidos (láctico, butírico, oxálico, cítrico, acético, fórmico, málico, tartárico, etc.), ya sea por álcalis. La formación de ácidos proviene de la descomposición de los hidratos de carbono, y la de los álcalis por descomposición de la albúmina a consecuencia de un proceso sintético relacionado con el desarrollo y multiplicación de las bacterias. La formación de ácidos y de álcalis puede utilizarse en el diagnóstico diferencial para distinguir especies afines, por ejemplo, el bacilo de la fiebre tifoidea del bacillus faecalis alcaligenes, que es muy semejante. La formación de ácidos en las placas de gelatina se manifiesta haciendo a éstas opacas mediante la adición de creta, con lo cual, al formarse los ácidos, absorben la creta y aparecen cercos claros alrededor de las colonias ; también se comprueba la formación de ácidos añadiendo tornasol al medio de cultivo (*V.* FIEBRE TIFOIDEA en el capítulo especial).

Algunas bacterias elaboran fermentos aislables (enzimas) y otras producen fermentación. Mientras que los fermentos no van inmediatamente unidos al protoplasma vivo y están sólo en relación indirecta con el proceso de la vida de las bacterias, en cambio, la fermentación es una función directa del plasma vivo (1) y sirve de origen de energía del mismo.

(1) En el plasma de un organismo muerto puede producirse también la fermentación (zimasas de BUCHNER).

Los fermentos se dividen en :

I. Que desdoblan los hidratos de carbono. A este grupo pertenecen :
   1. Diastasas, que dan lugar a la formación de azúcares a partir del almidón.
   2. Invertasas, aquellas que descomponen la sacarosa y otros disacáridos.

II. Que transforman los albuminoides.
   1. Peptonizantes o trípticos, que transforman los albuminoides en productos solubles ; así se explica la fusión de la gelatina producida por muchas especies.
   2. Quinasas, que coagulan la albúmina (fermento lab).



Fig. 37. Cultivo en patata
Bac. prodigiosus



Fig. 38. Cultivo en patata
(Sarcinas amarillas)

III. Que transforman la urea (urasas).
IV. Que desdoblan las grasas (lipasas).
V. Oxidasas y reductasas.

Los fermentos y la fermentación producida por los microorganismos desempeñan un papel importante en la economía de la naturaleza y se aplican también a fines técnicos y económicos. La descomposición y putrefacción de los cadáveres animales y la descomposición de las plantas se inician por fermentación. Esta es la causa del desdoblamiento y disolución de todas las substancias orgánicas muertas; y a las fermentaciones tenemos que agradecer la formación del humus y la nitrificación de las tierras de cultivo. Por la fermentación se transforman todos los residuos animales y vegetales en materiales de construcción para nuevos edificios orgánicos. Sin la descomposición y la putrefacción faltaría el enlace imprescindible en la circulación de la

materia orgánica. Muchas de las ramas de nuestra industria necesitan la colaboración de las bacterias, como ocurre a las fábricas de cerveza, panaderías, queserías, tenerías, elaboraciones de vino y de tabaco, etc. Por otra parte hay fermentaciones causadas por microorganismos que son muy perjudiciales económicamente, por ejemplo, varias « enfermedades de la cerveza », así como varias perturbaciones determinadas por hongos observadas en las fábricas de azúcar, en las panaderías y en las industrias lecheras, etc.

Para la Medicina es de interés muy especial la putrefacción de cadáveres y lo que acontece en el conducto intestinal. Entendemos por putrefacción, la descomposición de cuerpos albuminoideos con desprendimiento de gases mal olientes. En las putrefacciones que ocurren espontáneamente en la naturaleza se forman diversos productos como CO_2, CH_4, H_2 NH_3, H_2S. En la putrefacción pueden tomar parte bacterias muy distintas, en su mayor parte anaerobios obligados. En el proceso de la putrefacción ejerce una influencia decisiva la presencia o la falta de oxígeno. Se habla de putrefacciones fétidas cuando hay falta o carencia absoluta de oxígeno (reducción). La destrucción rápida con abundancia de oxígeno y desarrollo de ciertas gases inodoros se denomina descomposición ; en ella se trata de procesos de oxidación.

La más importante de todas las manifestaciones vitales de los microorganismos es la reproducción, que especialmente en las bacterias se realiza con una celeridad pasmosa. La división de éstas en medios favorables termina en veinte minutos. Pero aunque aceptemos un plazo mucho más largo para la generación de cada individuo, el de una hora por ejemplo, siempre resultará que al cabo de un día las bacterias procedentes de una sola llegarán a 16 millones, y veinticuatro horas más tarde su número se contará por billones. Un fenómeno concomitante de la reproducción es el desarrollo de calor, que puede llegar a bastantes grados (combustión espontánea del heno). La proliferación de los microorganismos llegaría a lo inconmensurable si no estuviese limitada por circunstancias desfavorables, como el agotamiento del medio nutritivo y la secreción de productos metabólicos perjudiciales a ellos mismos. En estas circunstancias desfavorables los microorganismos degeneran y mueren. En algunas especies aparecen formas particularmente resistentes, denominadas esporos.

IV. Los microorganismos considerados como gérmenes patógenos

(Causas y condiciones de la infección)

Las enfermedades infecciosas o contagiosas son originadas por gérmenes vivos capaces de reproducirse ; este concepto del « contagio animado » se adquirió sencillamente por razón de observaciones epi-

demiológicas en tiempos en los que los métodos técnicos y especialmente el perfeccionamiento del microscopio no bastaban, ni con mucho, para servir de fundamento experimental a la investigación de las infecciones. La importancia inmediata de los agentes infecciosos radica en que reúnen condiciones para reproducirse dentro de los tejidos del organismo atacado, al que perjudican por los productos tóxicos de su metabolismo y por los venenos de su protoplasma. Los daños causados por los microbios y las reacciones consiguientes del organismo son en extremo variados; unos son locales, como las necrosis, las proliferaciones e inflamaciones ; otros, de orden general, como la fiebre, la aceleración del pulso, los trastornos cardíacos, los síntomas nerviosos, las alteraciones renales, la leucopenia o la leucocitosis. Pero siempre se trata, en último término, de una intoxicación, cualquiera que sea la infección, aun en aquellas en las cuales el germen invade todo el organismo (septicémicas). Nunca producen un daño puramente mecánico a la manera de cuerpos extraños, en cuya posibilidad debiera pensarse, sin embargo, cuando redes capilares completas, del cerebro, de los pulmones, del hígado, de los riñones, son obstruídas por la ilimitada proliferación de los microparásitos. El veneno va íntimamente unido a la substancia corporal del germen (endotoxina del cólera y la fiebre tifoidea), o es soluble como en la difteria, la disentería y el tétanos. Según las condiciones en que se formen, las toxinas pueden producirse en el organismo al multiplicarse el germen, o ser introducidas ya formadas. En este último caso, como sucede en el botulismo y en el cólera de la infancia causado por toxinas de la leche, no se trata, en rigor, de una infección, porque el germen correspondiente no penetra en los tejidos, y puede ocurrir que no llegue a reproducirse ni siquiera en el intestino; se trata sólo de simples envenenamientos por saprofitos tóxicos. El carácter epidemiológico de contagio de un enfermo a otro falta en absoluto en estas enfermedades; en cambio, como en todas las intoxicaciones, pueden presentarse varios casos a la vez o sucesivamente y hasta masivamente, como ocurre en el botulismo, por haber ingerido la misma substancia tóxica. Sin embargo, también en estos casos se habla de infección, porque las toxinas causantes de la enfermedad son producidas por gérmenes vivos capaces de reproducirse, y es evidente que también en ellos los microorganismos son, en último término, la causa de la enfermedad infecciosa. Vemos, pues, que hay microorganismos patógenos cuya existencia no es parasitaria, y, por otra parte, existen también microparásitos sin propiedades patógenas. A éstos pertenecen numerosas especies de parásitos inofensivos (epifitos, comensales), que vegetan en las superficies interior o exterior del organismo (en la piel, en las mucosas de la parte superior de las vías respiratorias, en el intestino, etc.), por ejemplo, los estafilococos de las capas inferiores de la piel, los neumo o estreptococos de la mucosa de la faringe, los bacilos y los espiroquetos del sarro de los dientes, así como el amoeba buccalis, que se encuentra en la cavidad bucal de la mayor parte de los individuos, y el colibacilo del tubo intestinal. Al

nombrar estas especies sorprende desde luego que las mismas u otras muy próximas biológicamente son conocidas como patógenas; pero esta propiedad patógena aparece únicamente cuando una alteración previa del organismo (enfriamiento, traumatismo, infecciones de otra clase) crea un *locus minoris resistentiae*, por el cual, ya sea solos o en forma de infección mixta, penetran en los tejidos los hasta entonces inofensivos epifitos y realizan su obra destructora ; por eso la neumonía se presenta regularmente como autoinfección. En otros casos, parece ser suficiente el que una bacteria llegue a un tejido del organismo, distinto al habituado a soportarla por el contacto ordinario, para que el germen, hasta entonces inocuo, desarrolle efectos patógenos en el nuevo tejido ; así ocurre con el inofensivo colibacilo del conducto intestinal en casos de peritonitis por perforación, de pielitis y de cistitis. Continuemos avanzando en el tema. En los casos analizados, la existencia epifítica inofensiva constituye la regla, y la propiedad patógena la excepción; pero también ocurre el caso inverso, en el cual gérmenes infecciosos viven por excepción como huéspedes inofensivos del organismo. Háblase entonces de infecciones latentes, y a los portadores de estas infecciones se les llama portadores de gérmenes (portadores de bacilos de la fiebre tifoidea, de la disentería, del cólera, portadores de cocos en la meningitis y otros muchos). Los gérmenes de infección latente pueden tener debilitada su capacidad patógena y hasta perderla por completo, pero también pueden haberla conservado, como se demuestra por las múltiples observaciones en que los portadores de bacilos han sido origen de contagio de nuevos casos clínicos manifiestos, y los casos de portadores mismos en los que el proceso latente se ha convertido en activo por autoinfección. El estudio de estos casos extremos en el campo de la infección abunda en enseñanzas porque proporciona puntos de apoyo para el conocimiento del proceso biológico de la infección, tanto en su conjunto como en los casos particulares. Dos cuestiones fundamentales se plantean de todo lo que acabamos de exponer; primero: ¿qué relación guardan los microorganismos patógenos con las especies saprofíticas afines?; segundo: ¿cómo se origina la infección y la enfermedad en los casos particulares?

Respecto a lo primero puede asegurarse que las especies patógenas y las saprofíticas no están rigurosamente separadas por razón de sus cualidades biológicas, sino que con preferencia existe una serie de estados de tránsito. La realidad no es que las especies patógenas pertenezcan a uno o a pocos grupos bien caracterizados morfológica o biológicamente, sino que encontraremos gérmenes patógenos entre todas las clases de microorganismos y en casi todos los grupos secundarios de los mismos. Al lado del único o de los escasos representantes patógenos de un grupo, puede existir una numerosísima parentela de especies saprofíticas; así, junto al germen del cólera, único vibrión patógeno para el hombre, hay un ejército de vibriones semejantes ; al lado de los contados representantes patógenos del grupo tífico (bacilo de la fiebre tifoidea, paratíficos y bacillus enteritidis de GÄRTNER) están

los innumerables bacilos semejantes a los tíficos, etc. Las propiedades patógenas aparecen graduadas en las diferentes especies de gérmenes patógenos, y sus manifestaciones presentan también diferentes grados y modalidades ; según ello, podemos distinguir las siguientes clases :

1.ª *Saprofitos tóxicos* (bac. botulinus); son incapaces de existencia parasitaria en el organismo, y obran únicamente por sus toxinas, de manera semejante a cualquier planta venenosa.

2.ª *Microparásitos con desarrollo limitado a la puerta de entrada*, siendo producida la enfermedad general, no por el microbio mismo, sino por la difusión de sus toxinas por todo el organismo (tétanos, difteria).

3.ª *Gérmenes patógenos con capacidad de invasión superficial*, pero extensa, de ciertas mucosas, aunque sin extenderse en profundidad y sin generalizarse ; a esta clase pertenecen las infecciones específicas del epitelio, como la gripe, el cólera y la disentería.

4.ª *Gérmenes patógenos de grave extensión en la profundidad de los tejidos* con propagación por continuidad, pero sin invasión general de todo el organismo, como en los procesos purulentos, meningitis, tuberculosis pulmonar, disentería amibiana con absceso hepático consecutivo.

5.ª *Gérmenes patógenos con extensión general por el organismo*, pero acomodación específica en tejidos determinados ; así son los gérmenes de la rabia y de la poliomielitis, parásitos específicos del sistema nervioso, y el germen del tifus exantemático localizado especialmente en las paredes de los vasos.

6.ª *Gérmenes infecciosos de invasión septicémica* que afecta a todos los sistemas y a todo el organismo, como en la estreptococia, peste, fiebre tifoidea, sífilis y paludismo.

El grado de desarrollo de la existencia parasitaria, según el esquema precedente, es característico en cada especie patógena y en unión de sus propiedades morfológicas y biológicas, así como de su comportamiento respecto de las reacciones de inmunidad del organismo (que describiremos en el próximo capítulo), imprime a los microparásitos un sello común, que constituye lo que llamamos especificidad de los gérmenes. A cada enfermedad infecciosa bien definida corresponde un germen igualmente bien caracterizado ; esta es la ley de especificidad de los gérmenes infecciosos, que sirve de fundamento al desarrollo de la microparasitología moderna. Sobre esta ley de especificidad se basa, por una parte, el diagnóstico microbiológico, que probando la existencia de un germen determinado hace posible el diagnóstico cierto de la enfermedad infecciosa correspondiente, aun cuando los síntomas clínicos sean todavía incompletos, y, por otro lado, la misma ley sirve de base al tratamiento específico y a la curación de la enfermedad por medio de la vacuna preventiva, la seroterapia, la bacterioterapia y la quimioterapia.

En casos aislados, el grado de extensión de la enfermedad puede variar (proceso general o local) según las condiciones exteriores de la infección y la virulencia del germen ; aun en estos casos se trata desde luego de diferencias cuantitativas dentro del campo de la ley de especificidad. La virulencia se puede disminuir o aumentar artificialmente ; disminuirá por todas las influencias nocivas, que traen siempre como consecuencia una degeneración del germen, según se observa en muchas especies, sencillamente al cultivarlas largo tiempo en medios artificiales ; inversamente, la virulencia se aumenta o se restablece, si había disminuído, con el paso del germen por animales.

La ley de que cada enfermedad infecciosa corresponde a un germen determinado ofrece excepciones aparentes, que se comprenden con sólo considerarlas más detenidamente de cerca, si en el concepto de enfermedad infecciosa damos cabida, no sólo a su sentido clínico, sino también al epidémico. Sucede, a veces, que el mismo germen da lugar a dos o más cuadros clínicos tan distintos, que a una observación superficial parecerán completamente independientes ; así el bacilo de la peste produce por sus inflamaciones ganglionares la peste bubónica, y otras veces determina el cuadro de una inflamación pulmonar y se la llama peste pulmonar ; de igual manera, el bacilo del carbunco origina la pústula maligna, el carbunco pulmonar o el intestinal ; el bacilo de la tuberculosis, ora da lugar al cuadro característico de la tisis pulmonar, ora al de las alteraciones ganglionares llamadas escrofulosas, ya a la afección de la piel llamada lupus ; por último, el virus sifilítico unas veces produce los cuadros característicos de la avariosis en sus diversas fases, y otras las manifestaciones de la tabes dorsal y de la parálisis progresiva, originadas por la localización del germen en los centros nerviosos, y de síndrome tan distinto de las anteriores. En todos estos casos, la puerta de entrada es lo que motiva las diferencias en los cuadros clínicos determinados por un mismo germen ; las diferencias que de ello resultan en la localización del proceso patógeno y en las modalidades de contagio pueden traer consigo el que también, desde el punto de vista epidémico, los cuadros clínicos parezcan completamente distintos y sin conexión mutua, pues la peste bubónica, por ejemplo, no se transmite directamente de hombre a hombre, y la peste pulmonar, en cambio, es extraordinariamente contagiosa ; parecidas diferencias existen entre la forma ganglionar de la tuberculosis y la forma pulmonar. En todos estos casos, sin embargo, el examen atento de los caracteres epidémicos demuestra que entre estos cuadros clínicos, completamente independientes en apariencia, existen conexiones hasta el punto de que uno puede ser consecuencia de otro, pues la peste pulmonar puede presentarse como complicación de un caso de peste ganglionar, y la tuberculosis pulmonar desarrollarse como consecuencia de una escrofulosis anterior. Respecto de la sífilis y sus secuelas nerviosas, la detenida investigación epidemiológica demostró la relación entre una y otras en una época en la que todavía no era posible comprobar al microscopio la existencia del germen.

Si bien es cierto que el mismo germen puede producir cuadros clínicos completamente distintos en apariencia, no lo es menos, por otra parte, que el mismo cuadro clínico puede presentarse a causa de gérmenes totalmente distintos ; así sucede que el conjunto de síntomas carac-

terísticos del cólera puede causarlos el bacilo paratífico, otras bacterias tóxicas intestinales (cholera nostras) y hasta venenos inorgánicos (arsénico). En este caso, la existencia de contagio, si se trata del cólera, y la falta del mismo en las otras enfermedades, permite establecer, sin más, la distinción esencial del proceso morboso. En bastantes casos, este punto de vista epidemiológico puede dejarnos en la duda, particularmente cuando cuadros clínicos muy parecidos se deben a gérmenes infecciosos diferentes y, sin embargo, ni en su poder contagioso, ni en sus síntomas clínicos presentan diferencias, como ocurre en la disentería; que puede ser causada por amibas o por bacilos, y entre estos últimos, por especies distintas. Pero precisamente en la disentería, el estudio detenido enseña que la diferencia etiológica entre los diversos cuadros clínicos comprendidos con el nombre común de disentería, no es caprichosa, sino que responde a diferencias reales y esenciales de las distintas formas clínicas de la enfermedad. Basta recordar que ciertas complicaciones, como el absceso del hígado, sólo se presentan en la disentería amibiana, pero no en la bacilar, y que también la posibilidad de influir por el tratamiento específico en el proceso de la enfermedad es muy distinto en ambos casos, como también es diferente entre las varias clases de disentería bacilar. En la disentería amibiana se aplica la terapéutica química por la emetina, mientras que se prescribe la seroterapia específica en la disentería causada por el bacilo de Kruse-Shiga, pero no en la seudodisentería. Por consiguiente, en el caso de la disentería, el estudio desde el punto de vista etiológico es decisivo, no sólo para el conocimiento y lucha contra epidemia, sino también para su acertado tratamiento clínico.

El tercer caso de excepción aparente de la ley de especificidad es la presencia latente de gérmenes infecciosos en el organismo, sin que éste enferme al mismo tiempo. Pero el hecho epidemiológico de que esta infección latente no se halle extendida por todas partes, sino que sus portadores son casi siempre personas que han estado en contacto con enfermos, demuestra que también en este caso hay un enlace causal entre el germen y la enfermedad. Cabe explicar esto de varias maneras. Es admisible que el portador del germen, sano en apariencia, esté en realidad ligeramente enfermo, quizá ignorándolo él mismo por completo, pero no por ello dejará de ser tan contagioso como el enfermo clínicamente manifiesto. Precisamente a la investigación etiológica se debe el conocimiento importantísimo de estos casos muy leves, que apenas pueden diagnosticarse clínicamente, con diarrea ligera, sin otros síntomas, en el cólera, fiebre tifoidea y disentería; y las manifestaciones catarrales ligeras de las vías respiratorias superiores, en la difteria y en las infecciones meningocócicas. Otra explicación correspondería a que el portador de gérmenes no está por el momento enfermo, pero que por haber sufrido la enfermedad correspondiente hace más o menos tiempo, elimina todavía gérmenes vivos. Lo más frecuente en estos casos es que se trate de eliminaciones pasajeras en la convalecencia o más tarde, puesto que las eliminaciones pueden prolongarse

semanas y hasta meses (eliminaciones tardías en la fiebre tifoidea, disentería, cólera, difteria, etc.) Menos frecuentes, pero de mayor importancia para la propagación del contagio, son los portadores cuya eliminación de gérmenes dura muchos años y hasta toda la vida, sobre todo si las eliminaciones son masivas. Esta reproducción constante de los gérmenes infecciosos en el organismo es consecuencia de un proceso patológico crónico, localizado, por ejemplo, para la fiebre tifoidea, en las vías biliares o urinarias, para la difteria, en la rinofaringe, y para la disentería, en el apéndice. El proceso morboso existe con frecuencia, no sólo desde el punto de vista anatomopatológico, sino también desde el clínico; los eliminadores permanentes de gérmenes deben ser considerados, por consiguiente, como verdaderos enfermos que constituyen un peligro constante, no sólo para las personas que los rodean, sino para sí propios. Por razón del proceso crónico latente, puede presentarse en ellos, por autoinfección, la enfermedad aguda manifiesta. Si la idea de que el portador de bacilos es en realidad un enfermo crónico se vulgarizase, desaparecerían desde luego muchas dificultades que hoy se oponen a la vigilancia sanitaria de estas personas. Así como en los eliminadores permanentes se presentan agravaciones temporales del proceso crónico, puede suceder inversamente que, por algún tiempo, cesen de eliminar gérmenes, lo cual indica una curación incompleta ; de esto se deduce la importante conclusión práctica de que la sospecha fundamentada de eliminación permanente no desaparece por razón de un examen bacteriológico aislado con resultado negativo, pues hay casos de eliminadores de bacilos de la fiebre tifoidea, por ejemplo, en los que, después de cuarenta análisis negativos hechos durante un año con intervalos regulares, investigaciones más precisas dieron resultados positivos. En estos casos hay que proseguir investigando todo el tiempo que sea posible. Algunas veces se puede facilitar el diagnóstico con una provocación adecuada, por medio de purgantes ligeros en los portadores de bacilos tíficos y mediante inyecciones uretrales en los casos de gonorreas crónicas, con lo cual se excita nuevamente la eliminación de gérmenes suspendida. Además de los casos en que la eliminación de gérmenes es el resultado de un proceso patológico, hay también casos de existencia latente de gérmenes patógenos en el organismo, sin que exista proceso morboso que pueda comprobarse clínica o anatómicamente. Este caso se presenta cuando los microparásitos correspondientes llegan a las superficies interiores o exteriores del organismo y son eliminados como cuerpos extraños, sin que haya tenido lugar proceso alguno entre ellos y los tejidos vivos. Tales personas, en las que la eliminación dura naturalmente muy poco tiempo, se denominan portadores intermediarios, y su existencia está comprobada de manera indudable respecto de los vibriones del cólera.

Una vez sentado que ni la aparente incongruencia entre los conceptos clínico y etiológico de la enfermedad, ni la existencia de infecciones latentes, pueden inducirnos a error respecto de la significación fundamental de la especificidad del germen patógeno, debemos pro-

ponernos la cuestión de fijar las condiciones que ha de satisfacer un microorganismo, para poder afirmar que es el germen de una enfermedad infecciosa determinada. La primera condición desde luego evidente es que el presunto germen ha de aparecer en todos los casos de la enfermedad que origine; esto se ha comprobado de hecho para todas las enfermedades infecciosas, en epidemias muy distintas, en cualquier estación del año y en cualquier punto de la tierra. Pueden surgir dificultades en este punto, porque el germen no pueda comprobarse sino en determinados momentos (en la fiebre recurrente, lo es tan sólo durante los accesos), o porque en los órganos enfermos perezca con rapidez (el bacilo de la peste, en los ganglios supurados). La presencia constante de un microparásito en una enfermedad infecciosa determinada no demuestra por sí sola que se trate del germen de la infección, porque, epifitos muy extendidos, los estreptococos de la mucosa de la faringe, por ejemplo, en casos de infecciones específicas (viruela, escarlatina, sarampión) producen infecciones mixtas y secundarias y pueden encontrarse hasta en la sangre y en los órganos interiores. La existencia de serorreacciones específicas tan decisivas en otros, no prueban en estos casos la significación causal de estos gérmenes, porque estas serorreacciones entre el microorganismo y la sangre del enfermo se producen también respecto de otros microbios secundarios (*V.* el capítulo especial TIFUS EXANTEMÁTICO). Lo importante, respecto de la significación causal de un presunto germen, es su asiento característico en el organismo y su localización típica con relación a las lesiones patognomónicas de los tejidos, por ejemplo, los bacilos de la tuberculosis en el interior del tubérculo, los vibriones del cólera y los amibas de la disentería en la mucosa intestinal; pero también en este caso ha de tenerse en cuenta la posibilidad de que una infección secundaria no específica presente una localización determinada; por ejemplo, en la enfermedad del sueño se encontraron cocos en las membranas del cerebro. Tendremos la prueba definitiva siempre que, por experimentación o por inoculación involuntaria (infección de laboratorio), sea posible producir en el hombre el cuadro típico de la enfermedad con gérmenes de cultivo puro. La inoculación a los animales dará la misma seguridad cuando el cuadro morboso producido esté fundamentalmente de acuerdo con el mismo cuadro en el hombre, especialmente por lo que respecta a las alteraciones características de los tejidos; pero cuando el animal enferme únicamente con síntomas de malestar general nada demuestra respecto de la significación causal del germen en el hombre, porque tales efectos patógenos pueden ser producidos por propiedades tóxicas comunes a muchas bacterias. Para fijar con absoluta certeza la significación causal de un microparásito será preciso satisfacer las siguientes comprobaciones: primera, el microbio correspondiente no debe encontrarse en otras enfermedades ni en individuos sanos, a excepción de los casos de infección latente ya citados; segunda, el cuadro clínico de la enfermedad debe producirse experimentalmente con cultivos puros del germen,

pero no con los de otras especies. En esta cuestión es particularmente demostrativo el ejemplo de la peste de los cerdos, de la cual se consideró en un tiempo como germen el «bacillus suipestifer» perteneciente al extenso grupo de los paratíficos, hasta que más tarde se comprobó que el verdadero germen es un virus filtrable (UHLENHUTH), siendo el bacilo citado un huésped común del intestino del cerdo, que sólo produce infecciones secundarias. De todo lo anterior se deduce que la demostración indudable de la significación causal de un microparásito no es tan sencilla como parece en la mayor parte de los casos; generalmente la demostración no se basa en una sola característica, sino en el conjunto de caracteres morfológicos y biológicos, y especialmente en la experimentación en animales y en las reacciones de inmunidad.

Todo esto por lo que respecta a la especificidad y características de un germen. Para que éste pueda ejercer su acción patógena son necesarias una serie de condiciones indispensables al desarrollo de la nfección; de tal modo, que si falta un solo eslabón de esta cadena, la infección no se verifica. En este principio se funda la lucha racional contra las enfermedades infecciosas, que se esforzará por interrumpir la serie de concausas en los puntos más a nuestro alcance. Para la aparición de una enfermedad infecciosa son indispensables siempre las condiciones siguientes:

1. Ha de existir un foco infeccioso, en el que se verifique el desarrollo y proliferación de los gérmenes patógenos y desde el cual puedan ser llevados a otros organismos. En otros tiempos, cuando las condiciones biológicas de los microparásitos no eran bastante conocidas, se consideraba el medio ambiente inanimado como la fuente principal del contagio; pero los resultados de las investigaciones del siglo pasado han hecho variar tal modo de pensar, y hoy se considera que el origen del contagio es el hombre enfermo o el animal afecto de enfermedades transmisibles al hombre. Respecto de los parásitos en el mundo exterior inanimado, véase el capítulo VII.

El hombre enfermo o manteniendo una infección latente se convierte en foco de contagio por sus secreciones y excreciones; cuanto más abundante sea la eliminación de virus y cuanto más fácilmente se establezca el contacto entre las secreciones y excreciones conteniendo materia contagiosa y los individuos vulnerables a la misma, tanto mayor será la contagiosidad de la epidemia. En esto se funda el distinto papel desempeñado por los casos latentes (portadores de gérmenes) en la extensión del contagio. Los más peligrosos son los eliminadores permanentes, precisamente por la gran masa de productos virulentos que eliminan; así ocurre que los casos latentes representan focos de infección muy importantes en la epidemiología de la fiebre tifoidea; en el cólera, en cambio, su importancia es mucho menor, porque no se conocen los eliminadores permanentes del cólera, y en los portadores del bacilo, la eliminación dura poco tiempo. En ciertas ocasiones la materia contagiosa no llega a salir fuera del organismo enfermo; estos casos de infección cerrada (peste bubónica sin complicaciones, tuberculosis

incipiente) no son directamente contagiosos. En otros casos, en los que el virus circula únicamente con la sangre sin pasar a las secreciones naturales del organismo, el contagio ordinariamente sólo puede ocurrir por mediación de insectos (paludismo, tifus exantemático, etc.) Cuando se elimina al exterior el germen patógeno, puede suceder, unas veces, que salga con los productos de la enfermedad (focos de pus abiertos, descamación en los exantemas agudos), y otras que se elimine con las secreciones y excreciones naturales. La secreción de la conjuntiva puede contener el germen del tracoma y los de otras inflamaciones infecciosas de los ojos ; en las secreciones de la nariz y de la faringe se encuentran los gérmenes de la difteria, de la meningitis, de la gripe, del coriza, y especialmente los gérmenes de los exantemas agudos al comienzo de la enfermedad. En las excreciones intestinales se hallan los gérmenes del cólera, de la fiebre tifoidea, de la disentería y de otras enfermedades infecciosas del aparato intestinal ; por la orina se eliminan con frecuencia verdaderas masas de bacilos de la fiebre tifoidea ; en la orina se encuentran también otros gérmenes infecciosos (bacilos de la tuberculosis) cuando las vías urinarias están afectas ; en cambio, el riñón sano es un filtro impermeable a las bacterias. Ordinariamente, por las secreciones genitales se verifica el contagio de la sífilis, la gonorrea y el chancro blando. De menor importancia y menos frecuentes que las infecciones extrauterinas, pero digna de mención, es la transmisión de infecciones por herencia, que en el hombre rara vez se verifica por las células germinales (infección germinativa), siendo más frecuente el contagio por vía placentaria.

2. La segunda condición para que se realice el contagio es la existencia de una vía de infección, por la cual, desde el punto en que se desarrollaron los gérmenes patógenos, lleguen al nuevo organismo receptivo. El transporte de los gérmenes puede ser directo de hombre a hombre, o de animal a hombre si se trata de enfermedades animales transmisibles a éste, o indirecto, a través del mundo exterior inanimado o por un ser vivo intermediario. El contacto directo desempeña un papel tanto más importante cuanto más rigurosa sea la adaptación del germen correspondiente a la existencia parasitaria ; para aquellas enfermedades, cuyos gérmenes sólo se desarrollan en el interior del organismo y que mueren rápidamente al ser eliminados (gripe, sífilis), el contacto inmediato representa casi la única posibilidad de contagio. Con gérmenes de mayor resistencia, el contacto indirecto tiene mayor importancia y el contagio se verifica por objetos usados por el enfermo (prendas de vestir, vajilla, objetos de uso personal, vivienda, etc.) o por diversos medios del mundo exterior en los cuales se sostienen vivos los gérmenes durante algún tiempo (*V.* acerca de este punto el capítulo VII).

En el contagio indirecto por seres vivos pueden servir de intermediarios el hombre o los animales ; los hombres pueden serlo en forma puramente mecánica, por ejemplo, transmitiendo por el contacto de la mano los gérmenes recogidos del enfermo o por mantener ellos mismos la infección en estado latente. Los animales pueden propagar las infecciones , por estar ellos mismos enfermos, o como portadores intermediarios (las moscas en el cólera, fiebre tifoidea, disentería, inflamaciones contagiosas de los ojos), y por último, como huéspedes intermediarios reproduciendo en su organismo los gérmenes y repartiéndolos después. En este caso el germen puede ser eliminado en la misma forma en que penetró (bacilo de la peste en la pulga), y puede ocurrir también que el microparásito alcance su pleno desarrollo en el huésped intermediario, como sucede con las infecciones protozoarias causadas por mosquitos y ácaros.

3. La tercera condición precisa para el contagio es que el germen encuentre una puerta adecuada para su penetración en el organismo receptivo. Prescindiendo del caso en que el germen, por una herida o mediante la picadura de un insecto, llegue directamente a la sangre o al sistema linfático, todas las mucosas y la piel pueden servir de puerta de entrada en circunstancias favorables. Con respecto a la entrada hay que tener en cuenta, en primer término, la manera de ser transportado el germen ; en circunstancias normales, los gérmenes mezclados a las substancias alimenticias, por ejemplo, entrarán casi siempre por el aparato digestivo ; las gotitas infecciosas expulsadas al toser, penetrarán por el aparato respiratorio, y así sucesivamente ; de esto depende el que, con frecuencia, el mismo órgano representa al mismo tiempo la vía principal de eliminación y la puerta de entrada más importante (pulmones en la tuberculosis, faringe en la difteria) ; pero no siempre esto es cierto : baste recordar el contagio de la conjuntiva por secreciones genitales blenorrágicas, bien sea por contacto directo o por el agua al lavarse. Para que la infección llegue a consumarse o quede en suspenso, una vez el germen en la puerta de entrada, aun hay que considerar, por un lado, las defensas naturales o, contrariamente, las lesiones locales de la región correspondiente del organismo, y, por otro, la acomodación específica del germen a determinados tejidos. Las defensas locales son de naturaleza muy diversa ; en parte se trata de protección puramente mecánica; así, la epidermis, córnea y cubierta de grasa, es difícil de humedecer, y de ello depende el que, no estando herida, la mayor parte de los gérmenes no pueden atravesarla. De manera similar, la capa de moco que cubre el interior del aparato digestivo y el movimiento vibratorio del epitelio de las vías respiratorias sirven para rechazar los gérmenes que han llegado a penetrar. En otros casos, la defensa se verifica por influencias químicas o biológicas, como en la reacción ácida del jugo gástrico normal (especialmente contra el vibrión del cólera) y la flora bacteriana de la vagina, mediante la cual queda protegido este órgano contra las infecciones.

En frente a las defensas locales están los distintos factores que disminuyen la resistencia en las puertas de entrada ; un lugar de mínima resistencia puede existir naturalmente, como sucede con las lagunas del epitelio en las amígdalas, detención de secreción en el apéndice y lentitud de la corriente linfática en los bronquios de los vértices pulmonares en los casos de estrechamiento de la parte superior del tó-

rax y consiguiente, sucesiva predisposición a la tuberculosis. La mínima resistencia local puede ser motivada por influencias nocivas exteriores; a este orden pertenecen las alteraciones gastrointestinales, que al producir lesiones en el epitelio del intestino delgado facilitan el contagio del cólera; la permanencia en atmósferas cargadas de polvo, que favorece el desarrollo de la tuberculosis pulmonar, y otras que pudiéramos citar. Por último, hay que tener en cuenta también la acomodación específica de los gérmenes respecto de cada puerta de entrada, por ejemplo, del bacilo del cólera respecto del epitelio del intestino delgado; del gonococo con relación al epitelio cilíndrico del cuello del útero y de la uretra, mientras que el recio epitelio plano de la vagina no es atacado por este último germen. En otros casos, no es el tejido lo que facilita la infección, sino las circunstancias que rodean la puerta de entrada, por ejemplo, la exclusión del aire en ciertas heridas que predispone a infecciones causadas por anaerobios. Muchos gérmenes patógenos son aptos para penetrar por diversas puertas, y, según la que sea, varía el cuadro de la enfermedad que producen, como hemos dicho ya varias veces (peste bubónica y peste pulmonar, alteraciones ganglionares escrofulosas y tuberculosis pulmonar). En estos casos, la puerta de entrada se establece, no sólo en virtud de la vía exterior de infección, sino también según la cantidad y virulencia del germen. Así, la infección tuberculosa de los pulmones, por ejemplo, puede ser causada por muy reducido número de bacilos, y para la infección del intestino, en cambio, se requieren dosis millones de veces más grandes (Flugge); por otra parte, la aparición de la peste pulmonar supone una virulencia del germen altamente superior a la que tiene la peste bubónica, en cuya razón podría fundarse la frecuencia tan diversa de ambos tipos de infección en las diferentes epidemias de peste. La entrada de los gérmenes se verifica mediante el arrastre pasivo de los mismos por la corriente sanguínea o linfática, o por penetración activa de los microparásitos dotados de movimiento propio; así penetran las amibas de la disentería y la triquina a través de la mucosa del intestino, las larvas del anquilostoma (Looss) y los espiroquetos a través de la piel sin herida alguna. — De la acomodación específica de cada germen explicada anteriormente, depende que el proceso patógeno causado por el microbio quede circunscrito en la puerta de entrada, ataque sus inmediaciones más o menos próximas, o llegue a extenderse por todo el cuerpo, como asimismo las vías que para ello elija (sangre, linfa, vías nerviosas). Añadamos aquí, finalmente, que en muchas infecciones generales (peste) es característica la falta de enfermedad local en la puerta de entrada.

4. La última condición para que aparezca la infección es la receptividad del individuo atacado. Así como hemos visto que hay distintos grados de acomodación de los microorganismos a la existencia parasitaria y, consiguientemente, de desarrollo de su capacidad patógena, de la misma manera existe una escala gradual en la receptividad de las especies e individuos con relación a un mismo germen. En el próximo capítulo estudiaremos las causas biológicas que determinan la receptividad, así como la inmunidad congénita o adquirida respecto de los gérmenes patógenos; en este lugar indicaremos solamente las diferencias cuantitativas en la receptividad del hombre, según los individuos, la edad, el sexo, la raza y las circunstancias sociales, de lugar y de tiempo. La predisposición individual puede variar mucho de unas personas a otras respecto de ciertas infecciones (cólera, fiebre tifoidea, meningitis), mientras que, respecto de otras enfermedades contagiosas como sarampión, viruela y tifus exantemático, es casi general y uniformemente repartida. Las diferencias de receptividad dependen, en parte, de la mayor o menor perfección de las defensas en la puerta de entrada y, en parte también, de fenómenos biológicos en el interior del organismo. Estos fenómenos pueden tener un sentido completamente específico y dirigirse únicamente contra un germen determinado, a consecuencia, quizá, de la inmunidad adquirida por haber pasado anteriormente la enfermedad con carácter muy leve o latente; puede también tratarse de una resistencia general del organismo más o menos completa, para la cual serán circunstancias desfavorables el hambre, el cansancio, la diabetes, etc., y favorables el buen estado de nutrición, de salud, etcétera. A las circunstancias desfavorables debe atribuirse la causa de que las epidemias originen mayores estragos en las clases más pobres de la población y sean más violentas en tiempo de guerra. También la distinta predisposición según la edad, se funda, en gran parte, en las mismas circunstancias fisiológicas; a ella se suman, indudablemente, causas especiales, como la mayor permeabilidad del epitelio intestinal en la primera infancia, que determina una mayor receptividad respecto de las enfermedades del aparato digestivo, y otras que aumentan el peligro de algunas infecciones en organismos agotados, como sucede con la tuberculosis y el tifus exantemático por la menor resistencia de los tejidos. El hecho real de que los adultos gocen de una inmunidad relativa frente a una serie de infecciones que son enfermedades típicas de la infancia (exantemas agudos, parótidas, tos ferina), se explica desde luego por la inmunidad adquirida por haber sufrido la enfermedad en la niñez; donde falta esta inmunización, por ejemplo, en archipiélagos alejados del trato con los demás hombres y que por estas circunstancias viven decenios enteros sin sarampión, si esta epidemia se presenta, por haber sido importada, aparecen los casos en los adultos, que son entonces vulnerables, de igual manera que los niños en el resto del globo. Acerca de este hecho de la inmunización de poblaciones completas se fundan algunas experiencias sobre inmunidad de razas. Sabido es que en las comarcas tropicales palúdicas, los emigrados europeos presentan una receptividad muy acentuada para el paludismo, en tanto que los indígenas adultos no se contagian al parecer; esto consiste en que la enfermedad se ofrece allí entre las típicas de la infancia y, por consiguiente, ya la han sufrido siendo jóvenes, con lo cual quedan inmunes (R. Koch). Circunstancias semejantes explican la experiencia repetida durante la gran guerra, de que los habitantes de países en los que reina

como endémico el tifus exantemático (Rusia y Oriente) eran respetados por la epidemia, o al menos enfermaban de menor gravedad que los alemanes, en quienes faltaba el efecto protector de la inmunización. No ha sido explicado todavía el hecho sorprendente de que el sexo femenino, en los primeros años de su vida, tenga menos resistencia que el masculino contra la tos ferina (M. Neisser). En la predisposición geográfica para ciertas enfermedades infecciosas no se trata muchas veces de diferencias de vulnerabilidad, sino más bien de que las diversas condiciones necesarias para la infección han sido repartidas en grados muy diferentes, o faltan por completo a consecuencia de las diversas circunstancias de clima y localidad ; así, por ejemplo, la falta de la especie de mosquitos que sirven de huésped intermedio específico al paludismo o a la fiebre amarilla, determina la ausencia de estas enfermedades en la comarca correspondiente. Pero existen también diferencias en la receptividad individual por razón de la localidad, como se comprueba directamente por inoculaciones diversas en ratones, en los que la receptividad o la resistencia a la inoculación características en un lugar determinado, varían completamente al cabo de algún tiempo de permanencia de los animales en otro punto, quizá a consecuencia de la distinta alimentación y de la consiguiente variación de la flora microbiana intestinal. Lo mismo pudiéramos decir de las diferencias de receptividad con relación al tiempo; en este concepto, el distinto desarrollo de las condiciones de infección exteriores, es el que desempeña el principal papel ; el contagio de enfermedades intestinales cuyo germen es transportado por las moscas, es más frecuente naturalmente en verano, mientras que, en los meses fríos, la vida en común más íntima aumenta las ocasiones del contagio directo. Por otra parte, la vulnerabilidad del organismo aumenta indudablemente en ciertas épocas, por ejemplo, en verano respecto de las enfermedades intestinales infecciosas por infracciones dietéticas, y en invierno, respecto de las afecciones del aparato respiratorio a consecuencia de resfriados. En muchos casos, lo que llamamos predisposición local o de tiempo depende sólo indirectamente de las diferencias de lugar y tiempo, y más que de éstas resulta consecuencia, en primer término, de los distintos hábitos derivados de aquellas circunstancias en las condiciones de la vida social. La diferente manera de vivir y la limpieza, así como el trato social y la profesión, producen también diferencias en la frecuencia del contagio, como se demuestra, principalmente, por las enfermedades infecciosas de la edad escolar y las de determinadas profesiones y oficios.

V. Inmunidad

1. Generalidades

Un organismo está inmune o es invulnerable contra una enfermedad infecciosa cuando, a pesar de la presencia de todas las condiciones exteriores precisas para que la infección se verifique, el germen penetrado en su interior no puede desarrollar su acción patógena. La inmunidad puede ser completa o incompleta, y constituir una propiedad de la especie o del individuo. La inmunidad puede ser también natural o adquirida. Debe evitarse la expresión de inmunidad congénita, porque tiene significación diferente según se trate de una cualidad natural de la especie o de una inmunidad transmitida de la madre al hijo (inmunidad heredada). La inmunidad natural es completamente distinta de la inmunidad adquirida ; las modificaciones que se producen en el organismo después de sufrir una enfermedad infecciosa, dejan al individuo inmune contra una nueva invasión del mismo germen ; pero esto no quiere decir en manera alguna que con ello se hayan adquirido las propiedades de un organismo naturalmente inmune. Ni siquiera entra en lo posible, porque la inmunidad, congénita o adquirida, no representa, según veremos, una cualidad biológica del individuo, sino que es resultado de causas de naturaleza muy diversa unas de otras. Tanto la inmunidad natural como la adquirida pueden dirigirse, no sólo contra agentes infecciosos vivos, sino también contra sus toxinas libres, y aun contra venenos de composición albuminoidea producidos por animales o plantas de orden más elevado.

Al preguntarnos por las causas de la inmunidad natural hay que tener presente que, en las relaciones entre microbios y organismos de orden más elevado, la receptividad de estos últimos no es la regla, sino más bien la excepción. Frente a unas docenas de gérmenes patógenos conocidos existen innumerables especies saprofíticas ; además, entre las especies patógenas, muy pocas lo son para clases enteras de animales (bacilo del carbunco) ; las hay que sólo son patógenas para algunas especies, y otras para una sola especie de animales. Así ocurre que hay enfermedades infecciosas del hombre intransmisibles a los animales (paludismo), y, por otra parte, el hombre es inmune a ciertas enfermedades de animales (peste del ganado vacuno). Ya en el capítulo anterior expusimos que la causa determinante del efecto patógeno de los gérmenes radica en que lleguen a reproducirse dentro del organismo invadido. Con esta cuestión se relaciona la del destino de los agentes morbosos cuando penetran en un organismo inmune. Se han hecho experiencias sobre esto, y siempre con el resultado de que en el breve plazo de unas horas habían perecido los microorganismos introducidos en cantidades considerables en el aparato circulatorio o en las cavidades orgánicas de un animal inmune ; los gérmenes son destruídos por los líquidos orgánicos (1), o aprisionados por los leucocitos y otras células, especialmente las del bazo y medula ósea, donde son víctimas de la actividad digestiva de las células. Por eso se ha llamado a éstas fa-

(1) También, fuera del organismo, tiene el suero de la sangre una acción mortal sobre las bacterias mezcladas con él, acción que ofrece diversos grados según las distintas especies, sin embargo de lo cual no existe un acuerdo riguroso entre el efecto bactericida *in vitro* y la inmunidad con relación a la misma especie ensayada en animales ; esto indica que las substancias en disolución (*alexina*, según Buchner) que toman parte en el efecto bactericida del suero sanguíneo no son los únicos factores que determinan la inmunidad natural.