

Investigación de los microorganismos en particular.—BACILO DE LA TUBERCULOSIS.—Entre los microbios que se buscan más frecuentemente en los esputos, es preciso citar el bacilo de la tuberculosis. Debove fué el primero en Francia que demostró la importancia clínica de esta averiguación.

Se utilizan varios métodos de coloración. Nos limitaremos á indicar aquí la técnica habitualmente seguida, la que da resultados muy satisfactorios:

- 1.º Escoger en el esputo la parte espesa y purulenta, colocarla, secarla y fijarla;
- 2.º Depositar las laminillas así preparadas, con la cara preparada hacia abajo, en un vidrio de reloj, semilleno de rojo de Ziehl¹;
- 3.º Colocar sobre una platina caliente el vidrio de reloj que contiene las laminillas; calentar suavemente hasta la emisión de vapores y durante cuatro ó cinco minutos;
- 4.º Lavar las laminillas con mucha agua;
- 5.º Pasarlas de una en una, durante uno ó dos segundos por una dilución de ácido nítrico al quinto; puede terminarse la coloración por el alcohol absoluto;
- 6.º Nuevo lavado con agua.

A partir de entonces puede montarse y examinarse la preparación; pero vale más obtener una doble coloración de la manera siguiente:

- 7.º Sumergir las laminillas, durante algunos minutos, en una solución de azul de metileno;
- 8.º Lavar con agua. Montar y examinar.

Los bacilos tuberculosos aparecerán teñidos de rojo sobre un fondo azul. Son unos bacilos muy delgados ($0\ \mu$, 3, por término medio), de longitud muy desigual (de 2 á 6 y 8 μ), rectos ó encorvados, unas veces teñidos uniformemente y otras presentando pequeñas zonas claras que les dan un aspecto granuloso.

Hay algunos esputos tan ricos en bacilos (tuberculosis en el período de reblandecimiento y en el período de las cavernas), que éstos se perciben inmediatamente agrupados aquí y allá en pequeños grupos ó diseminados por toda la preparación. El diagnóstico es entonces muy fácil. Pero no siempre ocurre esto. Los bacilos pueden ser muy poco numerosos (tuberculosis al principio, tisis fibrosa, tuberculosis laringea) y pasar

¹ También pueden derramarse sobre la laminilla, que se sostiene por medio de una pinza de Cornet, algunas gotas del rojo de Ziehl y calentar por encima de la llama de un mechero de Bunsen; de vez en cuando se añadirán una ó dos gotas de la substancia colorante, sin que llegue á derramarse. Evítese la ebullición.

totalmente desapercibidos al practicar un examen superficial ó demasiado rápido. No debe afirmarse nunca la ausencia del bacilo de Koch antes de hacer varias preparaciones y de haberlas examinado minuciosamente. La existencia de bacilos de Koch en los esputos es una prueba absoluta de tuberculosis; se comprende, pues, todo el valor del examen bacteriológico para el diagnóstico de esta enfermedad. Algunos autores han podido llegar á encontrar el agente patógeno en individuos que presentaban por

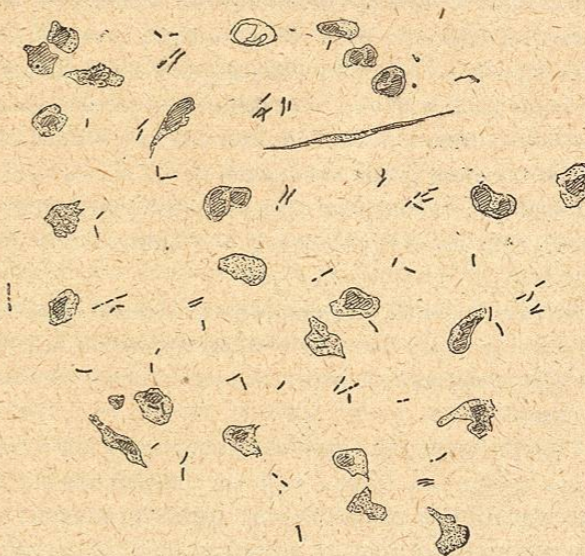


Fig. 121.—Bacilo tuberculoso en los esputos

primera vez hemoptisis y en los cuales no existía ningún signo físico de lesiones pulmonares, ni ningún trastorno de la salud general.

De todos modos, al principio de la enfermedad, el bacilo falta en la mayoría de los casos, lo que se explica admitiendo con B. Fränkel que la eliminación de los bacilos por los esputos no es posible sino cuando existe una lesión tuberculosa ulcerada de las vías respiratorias. Por esta misma razón no se hallan bacilos sino raramente en la expectoración de la tuberculosis miliar aguda. Grancher ha demostrado, por otra parte, que el bacilo falta algunas veces cuando ya existen signos clínicos suficientes para hacer el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

Hechas estas observaciones, conviene hacer constar, además, que en un grandísimo número de casos de tuberculosis pulmonar ó laringea en un período precoz, á pesar de la existencia de ciertos signos clínicos, el diagnóstico queda dudoso. El examen de los productos de la expectora-

ción se impone entonces, ya que sólo él puede hacer cesar toda duda. En las tuberculosis pulmonares más avanzadas (2.º y 3.º períodos), la investigación del bacilo de Koch en los esputos es sobre todo útil y aun necesaria para distinguir la tuberculosis del catarro bronquial, de las dilataciones bronquiales, de la sífilis pulmonar, de las esclerosis del pulmón, etc.

Algunos autores han querido sacar de la misma abundancia del bacilo en los esputos y de las variaciones de forma y de aspecto que puede presentar, un elemento para el pronóstico; pero todavía no hay nada positivo respecto de esto. Sin embargo, una disminución constante y progresiva de los bacilos puede interpretarse en muchos casos como un fenómeno favorable; entonces coincide con una mejoría igualmente progresiva del estado general y una atenuación de los signos físicos.

Para apreciar de una manera precisa la disminución de los bacilos, es preciso hacer y repetir varias veces y con algunos días de intervalo su recuento.

La primera condición de un buen cálculo consiste en el reparto uniforme de los bacilos. Para obtenerlo, es preciso agitar mucho el esputo en una solución concentrada de bórax y luego dejarla reposar durante veinticuatro horas.

Se debe añadir, pues, en vista del recuento, á un volumen dado de esputos, dos volúmenes de una solución concentrada de bórax; agitar y reposar; luego, por medio de una pipeta graduada, se colocan 10 milímetros cúbicos de la dilución sobre una laminilla (cubre-objetos). Se tiñe por el método ordinario y luego se saca un término medio de los bacilos contenidos en el campo del microscopio, examinando la preparación en diversos puntos. Es evidentemente necesario emplear siempre el mismo aumento y las mismas laminillas para los cálculos comparativos.

El examen atento de las preparaciones, pero sobre todo el recuento de los bacilos, demuestran una gran variabilidad en el número de éstos; diferencias notabilísimas se observan á veces de un día al otro; sucede á veces que pueden faltar los bacilos ó cuando menos ser muy raros durante varios días, para volver á ser luego bastante abundantes.

La disminución de los bacilos no puede, pues, apreciarse sino después de una serie de recuentos. En cuanto á su desaparición total, no debe afirmarse sino después de averiguaciones repetidas ó también después de la inoculación de esputos. En las tuberculosis en vías de curación ó también virtualmente curadas, la expectoración contiene á menudo y durante algún tiempo algunos bacilos.

En el examen del esputo tuberculoso, debe fijarse la atención en las otras diversas especies microbianas que se pueden hallar en la preparación. Estas son á veces extraordinariamente numerosas, cuando se trata, por ejemplo, de esputos procedentes de cavernas pulmonares.

Al lado de saprofitos diversos, se hallan el estafilococo, el estreptococo, el pneumococo, el pneumobacilo, el tetrágeno, etc. Es difícil decir si su presencia constituye ó no un elemento de pronóstico peligroso y si estos microorganismos no intervienen por otra parte en el proceso de destrucción. Koch atribuía una tal acción al micrococo tetrágeno. De todos modos, el hecho de que los estreptococos, los estafilococos, los pneumococos, los colibacilos, etc., que se hallan en los esputos de los tuberculosos, estén frecuentemente dotados de una virulencia bastante grande, nos obliga á tener en cuenta estas infecciones secundarias de las lesiones pulmonares tuberculosas. Por su acción sobre los tejidos próximos, por sus propiedades piógenas y por las toxinas que fabrican, estos microorganismos son evidentemente susceptibles de ejercer una acción local y general de las más desfavorables. Finalmente, pueden pasar á la sangre y crear verdaderas septicemias.

La tuberculosis se asocia alguna vez á otras enfermedades microbianas ó parasitarias del pulmón (gripe, sífilis y actinomicosis pulmonares, aspergilosis). En estas afecciones, la investigación del bacilo de Koch no deberá, pues, descuidarse.

Inoculaciones. — Hay un procedimiento todavía más seguro que el examen microscópico para descubrir la presencia del bacilo tuberculoso en los esputos, y es la inoculación al conejillo de Indias. Una partícula del esputo desleída en agua esterilizada ó en caldo se inyecta, ya debajo de la piel, ya preferentemente en el peritoneo del animal que previamente habremos pesado. El esputo debe hallarse libre de la saliva por una serie de lavados, si no el animal puede sucumbir rápidamente por una infección aguda en el caso de inoculación intraperitoneal. Si la inoculación ha sido subcutánea, se ve desarrollarse á menudo, en el punto en que ha sido practicada, un absceso que se abre al exterior y al cual sigue una ulceración sin tendencia á cicatrizar, un verdadero chancre tuberculoso. Al cabo de unas tres semanas, se comprueba la existencia de ganglios voluminosos en las ingles. El animal ha enflaquecido, y si se le sacrifica en este instante, se observa que en el peritoneo, en el hígado, ó en el bazo, que ordinariamente es voluminoso, etc., hay producciones tuberculosas abundantes, que contienen el microbio patógeno en gran cantidad.

La inoculación al conejillo de Indias deberá practicarse, pues, cuan-

do falten los bacilos en las preparaciones, antes de afirmar que no se trata de la tuberculosis.

BACILO DE LA GRIPPE. — La investigación del bacilo de Pfeiffer es sencilla: después de lavar uno de los esputos en una serie de cristalizadores medio llenos de agua esterilizada, según el método de Kitasato, se coge una partícula del producto expectorado y se coloca, seca y fija sobre una laminilla; luego se tiñe por la solución de Ziehl diluida en agua destilada (dilución al 1/20°; baño de ocho á diez minutos). El bacilo de Pfeiffer se tiñe mal por los demás colores de anilina; el método de Gram no le impresiona.

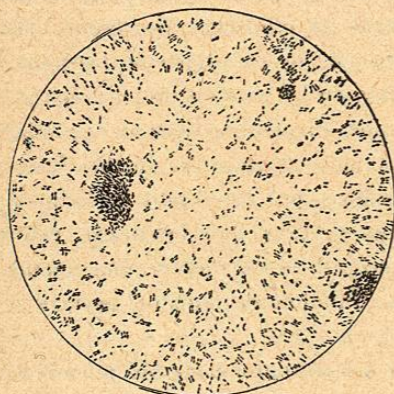


Fig. 122. — Bacilo de la gripe

(dilución al 1/20°; baño de ocho á diez minutos). El bacilo de Pfeiffer se tiñe mal por los demás colores de anilina; el método de Gram no le impresiona.

Es preciso emplear un aumento bastante considerable, dadas las dimensiones pequeñas de este microorganismo. Se distinguen entonces unos bacilos pequeños, muy cortos, verdaderos coco-bacilos, frecuentemente reunidos por parejas, en grupos ó aislados, entre los elementos anatómicos. Algunos son intracelulares (fig. 122).

Los otros microorganismos son poco abundantes, á lo menos en un período precoz de la enfermedad; más tarde se producen infecciones secundarias y pueden reconocerse los agentes en los esputos.

La pneumonía lobular y las broncopneumonías con pneumococos ó con estreptococos son complicaciones frecuentes de la gripe. Finalmente, la gripe es capaz de dar un latigazo á una tuberculosis hasta aquel instante latente, y puede verse en estos casos aparecer el bacilo de Koch en la expectoración.

Si se quiere conservar el bacilo de la gripe, es preciso colocar una partícula del esputo, previamente bien lavada, en gelosa sanguinolenta, es decir, que en su superficie se han dejado caer algunas gotas de sangre de pichón ó de conejo recogidas asépticamente (Pfeiffer). En efecto, la hemoglobina es indispensable para el cultivo del bacilo. Se colocarán los tubos de cultivo en la estufa á 37°. Al cabo de treinta y seis horas, se perciben en la superficie de la gelosa unas colonias muy pequeñas y transparentes, que se han comparado á pequeñísimas gotitas de rocío y es preciso examinarlas con una lente de aumento. En efecto, son más pequeñas y más refringentes que las colonias de pneumococos. Las

inoculaciones á los animales de laboratorio no pueden proporcionar ningún dato útil desde el punto de vista del diagnóstico.

PNEUMOCOCO. — El pneumococo de Talamón-Fränkel se tiñe fácilmente por las soluciones hidroalcohólicas ordinarias. Pero es preferible buscarlo en los esputos por el método de Gram, que lo diferencia de los otros microbios que no se tiñen como él por este procedimiento. En la expectoración de los pneumónicos, los pneumococos se hallan en gran cantidad y con todos sus caracteres.

Son unos cocos prolongados que tienen la forma de un grano de trigo,

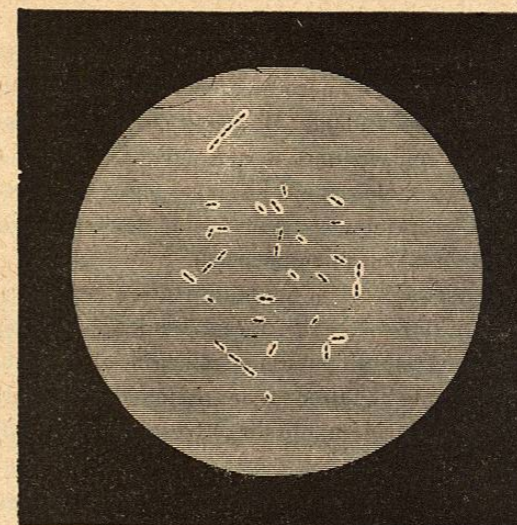


Fig. 123.—Pneumococo de Talamón-Fraenkel

de una llama de bujía ó de un hierro de lanza, ordinariamente reunidos por parejas (diplococo lanceolado), pero que pueden formar cadenillas de un número par de cocos; estas cadenillas son generalmente rígidas ó francamente acodadas y no son flexuosas como las del estreptococo. También pueden hallarse granos ó cocos aislados (fig. 123).

El pneumococo está rodeado de una cápsula que parece incolora y refringente. De todos modos es posible teñirla, siguiendo, por ejemplo, la técnica indicada por Nicolle:

Teñir con el violeta de genciana fenicado durante cuatro ó seis segundos, y luego pasar rápidamente la laminilla por la mezcla siguiente:

Alcohol.	2 partes
Acetona.	1 parte

La cápsula queda entonces teñida cuando, después de haber colorado por la solución hidroalcohólica de violeta, se sumerge rápidamente la laminilla en agua acidulada por el ácido acético (una ó dos gotas por cada vidrio de reloj lleno de agua).

Es preciso hacer constar que muy frecuentemente se halla el pneumococo en la saliva en estado normal. Netter lo ha hallado cuatro veces en cinco experimentos en la saliva de individuos que tuvieron ya una pulmonía y una vez en cinco en la saliva de sujetos que no tuvieron nunca dicha afección. Según Bezançon y Griffon, el pneumococo existe también en la cavidad bucal de todos los individuos, niños, adultos y viejos. Pasteur lo descubrió en 1881 en la saliva.

Esta presencia constante del pneumococo en la boca explica que se le halle en el curso de un gran número de afecciones broncopulmonares con el carácter de infección secundaria. De todos modos, en la pulmonía y en las broncopneumonías con pneumococos, la misma abundancia del microorganismo en la expectoración acusa su papel patógeno. Se le halla también fácilmente y en gran número en el líquido de ciertas vómicis pleurales (pleuresías purulentas con pneumococos).

La inoculación del ratón es el procedimiento más sencillo para aislar el pneumococo y para darse cuenta de su virulencia. Se tendrá cuidado de lavar previamente el esputo pneumónico según el método de Kitasato. Se inocular ordinariamente al ratón en la región dorsal, cerca de la base de la cola. Se inyectarán solamente dos ó tres gotas de la disolución del esputo.

Según la virulencia del pneumococo, el animal muere al cabo de veinticuatro ó cuarenta y ocho horas; al practicar la autopsia, hallamos sencillamente el bazo bastante voluminoso.

El examen de la pulpa de este órgano, de la sangre y de la pulpa del hígado, permite en la mayor parte de los casos hallar el agente patógeno con una cápsula muy clara. Una gota de sangre quitada asépticamente del corazón del animal servirá para hacer cultivos de pneumococos.

Así se obtendrán fácilmente cultivos puros en los diversos medios que se emplean.

El pneumococo no se cultiva á la temperatura ordinaria, es preciso colocar en la estufa á 37° los medios sembrados. Al cabo de veinticuatro horas el caldo se enturbia ligeramente y la gelosa presenta en su superficie unas colonias translúcidas muy pequeñas, que se han comparado á gotitas de rocío.

Pero muy rápidamente, en tres ó cuatro días, el pneumococo pierde

en estos medios su vegetabilidad y su virulencia. Si se le quiere conservar vivo y virulento, se está obligado á sembrarlo cada cuarenta y ocho horas en medios nuevos y á hacerlo pasar de vez en cuando por el ratón ó el conejo (el conejillo de Indias es muy poco sensible).

En los medios ordinarios, el pneumococo pierde su cápsula. Los medios de cultivo en los cuales germina se hacen ácidos. Mosny y Wurtz han descubierto la presencia del ácido fórmico en estos medios. A éste se debería la muerte rápida del microorganismo. Pero puede conservarse vivo durante varios meses en caldo adicionado de una pulgarada de carbonato de cal, que neutraliza el ácido á medida que se va produciendo.

El suero del conejo (Mosny) y la sangre desfibrinada¹ del mismo animal (Gilbert y Fournier) constituyen los mejores medios de cultivo. Bezançon y Griffon han indicado las condiciones de empleo del uno y del otro (suero, medio de diagnóstico; sangre desfibrinada, medio de conservación).

«La riqueza de desarrollo del pneumococo en el suero del conejo, dicen Bezançon y Griffon, y la limpieza que adquieren sus caracteres morfológicos (diplococo encapsulado), hacen de este medio un excelente reactivo diagnóstico.» Pero, según estos mismos autores han demostrado, debe emplearse sobre todo el *suero de conejo muy joven*; ellos han logrado descubrir así el pneumococo en exudados en que al principio parecía que no la tuvieran, y lo han hallado vivo en cultivos en que se consideraba como muerto; han obtenido también resultados positivos en aquellos casos en que la inoculación al ratón había fracasado. Si se cultivan simultáneamente otros gérmenes, el pneumococo adquiere un desarrollo considerable. Su cápsula es muy clara y no forma cadenas como en el caldo.

A falta de suero de conejo, se puede emplear el suero de perro, de pollo ó de conejillo de Indias, con tal que el animal sea joven.

¹ Para recoger el suero, se desnuda asépticamente la carótida del animal en una extensión de unos 2 centímetros, y se aísla este segmento entre una ligadura permanente de seda del lado de la cabeza, y otra ligadura temporal, fácil de quitar, del lado del corazón; á este nivel puede colocarse una pinza pequeña de ramas planas. Se incide entonces el segmento aislado tan cerca como sea posible de la ligadura superior y luego se introduce una cánula metálica suficientemente fina y con la extremidad cortada á bisel. Esta cánula se halla unida por un tubo de goma tan corto como sea posible á un tubo de vidrio que desemboca en un globo pequeño ó en un frasco de Erlenmeyer, atravesando el tapón de algodón de éstos. El aparato ha sido esterilizado previamente en el autoclave.

Una vez introducida la cánula metálica en el extremo central de la arteria, se la fija fuertemente á este nivel por medio de una ligadura y se quita la pinza ó la ligadura temporal. La sangre se derrama en el recipiente.

Si se quiere recoger el suero, se deja que se produzca la coagulación en un lugar fresco; al día siguiente se aspira el suero con un pequeño matraz-pipeta ó con una pipeta suficientemente voluminosa y se distribuye en tubos.

Si se quiere obtener sangre desfibrinada, se agita vivamente el pequeño matraz ó el frasco de Erlenmeyer, en el cual se habían introducido antes de la esterilización pequeños pedazos de vidrio.