

COPROLOGIA BACTERIOLOGICA

A CL A R A C I O N

Cuando, en Noviembre de 1926, publiqué en la "Revista del Centro Estudiantes de F. y Bioquímica" mi *Marcha sistemática*, lo hice respetando en todos los detalles, la redacción y contenido del trabajo que, con el mismo título, presentara a la Cuarta Conferencia de Higiene y Microbiología (B. Aires, Julio de 1926).

En este trabajo, que ahora publico, no he hecho más que ampliar aquél, que en su parte fundamental no ha variado. Los caracteres diferenciales indicados, y la marcha general del análisis, son las mismas. Sólo he agregado algunas notas y añadido, al conjunto de especies microbianas morfológicamente idénticas (y a las que estaba circunscripto mi trabajo anterior) otros microorganismos que pueden encontrarse en el curso de un coprocultivo.

En esta forma, la *Marcha sistemática* ya no es solamente aplicable al aislamiento de los bacilos de la serie tífica y disentérica, sino que indica la marcha a seguir en un análisis bacteriológico *completo* (cualitativo y en cierto modo cuantitativo) de las materias fecales — exclusión hecha, por supuesto, de ciertos microorganismos muy patógenos que, por la técnica de investigación, especial a cada uno de ellos, no pueden entrar, hoy por hoy, en el cuadro general.

Por otra parte, es corriente que, a estos agentes, se los investigue solo a pedido especial y, generalmente, a uno solo a la vez. Citamos también, con respecto a ellos, los métodos más apropiados para su investigación.

El lector notará que no citamos la composición de los medios

de cultivo, ni ciertos detalles de técnica bacteriológica, ni hacemos el estudio general de las bacterias intestinales; detalles cuya importancia todos conocen y que consideramos indispensables para finalizar con éxito la investigación.

Todos esos puntos están tratados, con verdadera amplitud, en los numerosos manuales de Microbiología. En éste, nos hemos limitado a la identificación de las bacterias, proponiendo, según los casos, los medios más seguros y más rápidos para conseguirlo. Y si bien es cierto nos referiremos al coprocultivo en especial, sus indicaciones pueden aplicarse al estudio bacteriológico de cualquier material, y hasta de una especie microbiana aislada.

Huelga decir que esperamos haber facilitado — al ordenarlas — las investigaciones bacteriológicas aplicadas a la coprología, y que tanta importancia van tomando día a día.

I

CONSIDERACIONES GENERALES

En las heces normales se encuentran siempre, bacterias en gran cantidad. Cohendy asegura que un milígramo de materias fecales — en el hombre adulto — contiene, (por término medio) 143.870.000 bacterias, las que, cultivadas y aisladas, parecen pertenecer a 4.261.660 especies diferentes, de las cuales el 77 por 100 son anaerobias. Entre estas últimas, las más importantes son: las bacterias de la fermentación butírica (*chlostridium butyricum*); el bacilo *bifidus*; el bacilo de Welch o bacilo *perfringens*, uno de los huéspedes más constantes de la flora intestinal. Finalmente debemos citar también entre los anaerobios, a tres bacilos putrificantes: el bacilo *putrificus*, el bacilo *sporógenes* y el vibrión *septico*. El *chlostridium butyricum*, estudiado detalladamente por Nothnagel y Brieger, aparece como un bacilo ancho de extremos redondeados; o bien presenta una forma elíptica y hasta fusiforme. Su tamaño es variable. Tan pronto se muestran aislados, como reunidos en zoogreas. Es gram positivo. Parece que con el régimen alimenticio vegetal son más abundantes, en las heces, que con el régimen alimenticio animal.

--El bacilo *bifidus*, descubierto por Tissier, es un microbio muy polimorfo. En los frotos de heces, aparece como un bacilo bastante delgado, de unos 6 μ (término medio) de largo, terminado por dos extremos adelgazados. Generalmente, se hallan asociados en diplobacilos. En los excrementos diarreicos, encuéntranse formas más largas, irregulares y diplobacilos que aparecen como un filamento largo, bifureado en los extremos, y en donde ambos bacilos están unidos por una esfera; o bien ambos bacilos adoptan la forma de un ángulo agudo. No forma esporos, es inmóvil y gram - positivo.

—El bacilo *perfringens* es un bacilo recto, rara vez curvo, regularmente grueso, (de 0.8 a 1.2 μ) y de una longitud variable. Es inmóvil. Extremos cuadrados. Cultivado, se observan formas más largas que las encontradas al examen directo. Además, aquí pueden aparecer como estreptobacilos, o rodeados de una cápsula francamente visible, sobre todo, mediante el tratamiento previo por la tinta de fucsina, y después por el Ziehl caliente. Es gram-positivo.

—El bacilo *putrificus*, descubierto por Bienstock, es un bacilo rígido, de extremos redondeados, que mide 5 a 6 μ de largo por 0,9 μ de grueso, muy móvil y con flagelos vibrátiles. Es gram - positivo. Es en los cultivos, sobre todo en los jóvenes, en donde produce rápidamente esporas, situadas en un extremo, redondeadas o ligeramente ovaladas. Toma entonces el aspecto clásico de un pabillo de tambor.

—El bacilo *sporógenes*, aislado por Metchnikoff del contenido intestinal humano, y el *vibrión septico*, estudiado por primera vez por Pasteur, son morfológicamente tan parecidos, que no es posible distinguirlos en los frotos. Esta diferenciación, por otra parte, no es indispensable en coprología.

Se presentan como bacilos de 3 a 8 μ de largo, por 0.6 a 1 μ de grueso, aislados o reunidos en cadenas (estreptobacilos). Son rectos, de extremos redondeados; móviles (debe investigarse la movilidad en el centro de la preparación, y no en los bordes, pues el aire la impide). Son flagelados, producen esporas, a veces subterminales, a veces centrales (forma de *clostridium*).

Las especies aerobias de las heces normales — en el adulto — varían según los individuos. La más abundante — y siempre presente — es el colibacilo. Siguen, el bacilo lactis aerógenes, enterococo, estreptococos, proteus, subtilis, sarcinas, etc., etc.

En el niño, la flora fecal ha sido bien estudiada por Tissier. En los lactados al pecho, el bacilo bifidus (véase más arriba) domina. A su lado, se encuentran el colibacilo, enterococo, etc. En los criados con biberón, el aspecto es diferente: a estas tres especies, se suman estafilococos, estreptococos, sarcinas, etc.

En los recién nacidos, el intestino es, al parecer, absolutamente estéril. Por lo menos, tal demuestran las interesantísimas experiencias de Schottelius, consideradas como clásicas. En el momento mismo de salir del huevo, Schottelius tomó unos pollitos y los colocó en una jaula esterilizada y construida de manera que no pudiera penetrar en ella, ningún germen. Esos pollitos fueron alimentados durante 30 días, con sustancias esterilizadas, y mediante repetidos análisis bacteriológicos de los excrementos, pudo comprobar la absoluta esterilidad del intestino de sus pollitos. (1)

(1) En realidad, el objeto de aquellos experimentos fué demostrar la utilidad de los gérmenes intestinales en la asimilación y crecimiento normal del organismo animal.

Sin embargo, Escherich, Tavel y Eguet encontraron enterococos en el intestino de recién nacidos. Pero creemos que aquellos casos no autorizan a generalizar el hecho, ya que las condiciones de formación del huevo de las aves y del feto, son casi idénticas.

Viene a confirmar esta opinión, el hecho de que las materias fecales de los lactantes, contienen bilis aún después de muchos meses del nacimiento. Sabido es que esta sustancia considerada como anormal en las heces de adultos y niños no lactantes, es reducida por los microbios intestinales, al estado de Urobilina, cuya presencia se considera normal.

II

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO GENERAL DE LAS HECEs FECALES

Marcha sistemática del Autor

Los bacilos de la serie tífica y disintérica — los más patógenos, sin discusión, de entre todos los que trataremos en este capítulo — y el colibacilo, poseen caracteres morfológicos comunes (forma y dimensiones aproximadamente iguales), diferenciándose unos pocos de entre todos ellos, por no tener cilias. En efecto, el bacilo de Eberth, los paratíficos A y B, el bacilo de Gartner, el coli y el “fécalis alcalígenos”, poseen cilias, careciendo de ellas los bacilos disintéricos. Por otra parte, todos los ciliados no poseen movimientos vivos; en cambio, los no ciliados, están dotados de ciertos movimientos, aunque de naturaleza diferente. A esto agregaremos que todos los bacilos de esta serie, son gram - negativos.

En cuanto a los caracteres culturales son tan numerosos como comunes a casi todos, por lo que podemos afirmar que las causas de error son muy numerosas.

Sólo las reacciones biológicas frente a los sueros aglutinantes específicos y la inoculación experimental, podían dar, hasta ahora, resultados realmente satisfactorios. Pero estos medios de diag-

nósticos no están, desgraciadamente, al alcance de todos, pues ni en los grandes hospitales se dispone, muchas veces, de todos los sueros aglutinantes.

En cuanto al diagnóstico por la acción patógena experimental, requiere mucho tiempo, y en la mayoría de los casos, el diagnóstico es requerido con premura.

Es para estos casos, que propongo la *Marcha sistemática* que, dentro de la rapidez relativa de esta clase de investigaciones, dá los resultados que se pueden exigir del laboratorio.

* * *

Se procura emulsionar un grumo, — mucoso, purulento o sanguinolento — en una pequeña cantidad de solución fisiológica esterilizada. A falta de grumos sospechosos, se separará una pequeñísima cantidad de materias fecales, y emulsionará en la misma forma. En condiciones de absoluta asepsia, se siembra la emulsión, sucesivamente, en tres cajas de Petri con medio de Endo, valiéndose de una varilla de vidrio acodada en ángulo recto, esterilizada. Se lleva a la estufa, a 37°, teniendo cuidado de colocar la cubierta para abajo.

Pueden examinarse las cápsulas después de transcurridas 12 horas. Entonces se verán tres grupos de colonias, claramente definidas:

Grupo α : *colonias incoloras, de 1 a 3 milímetros de diámetro, a veces parecidas a hojas de vid, o a gotas de rocío, de borde neto:*

Bacilo de Eberth, bacilos paratíficos A y B, bacilos disentéricos de Shiga, Flexner y Hiss, bacilos de Castellani, Morgan, Gartner, Aertrick, Proteus, Piciánico, fécalis alcalígenos, mucosus capsulatus.

Grupo β : *colonias rojas, mucosas:*

Colibacilo, neumobacilo de Friedlander, bacilo mucosus capsulatus, estafilococo, estreptococo, enterococo.

Grupo γ : *colonias incoloras, secas o rugosas, voluminosas, de doble contorno:*

Bacilo subtilis, bacilo megatherium, bacilo mesentericus.

En caso de duda, o de resultados negativos — frente a la especie cuya existencia se sospecha — se espera que transcurran 24 o 36 horas, y se examina de nuevo; o bien se ensaya el medio de enriquecimiento de Kuhn: se deslien cuidadosamente las heces en solución fisiológica, se filtra por algodón, y a 5 c.c. del filtrado se añaden 0.02 grs. de *bolus alba* (bolo blanco) y se agita. Transcurridos algunos minutos, se decanta el líquido claro, se emulsiona el sedimento en unas gotas de suero fisiológico y se siembra como ya se ha dicho, en medio de Endo.

GRUPO *a*

Pasadas 24 a 36 horas, a contar desde la siembra, se eligen entre las más aisladas y típicas, 10 o 15 colonias de este grupo, y se pasan a otros tantos tubos conteniendo agar glucosado al rojo neutro. La siembra debe hacerse, de preferencia, licuando el medio, esperar a que baje a los 40°, sembrar en el seno del líquido, agitar y dejar solidificar en posición vertical.

Después de un tiempo prudencial se incubación (12 a 24 horas), se observa:

Primer subgrupo

El medio no ha sufrido, aparentemente, ninguna modificación; o bien presenta solo una pequeña decoloración del rojo neutro; o bien solo una leve fluorescencia.

Una porción de cultivo de estos tubos, es pasada, de uno en uno, a otros tantos tubos de nutrosa manitada al tornasol (Barsiekow manitado), tubos en los que se ha colocado, invertido, un tubito de hemólisis lleno del mismo medio. Se lleva a la estufa. Al cabo de 10 horas:

A. — *El medio ha enrojecido y coagulado, (coágulo rojo, líquido sobrenadante incoloro) sin formación de gases:*

Bacilo de EBERTH.

B. — *No se ha producido coagulación, pero el líquido ha virado al rojo, sin formación de gases:* se trata de los bacilos disintéricos de Flexner y o de Hiss. Para aislarlos o identificarlos, se los siembra, uno a uno, en Barsiekow maltosado, se lleva

a la estufa (37°) y se espera:

El medio de cultivo se enrojece:

Bacilo de FLEXNER.

El medio permanece azul:

Bacilo de HISS.

C. — *No se ha producido coagulación, ni tampoco virado al rojo; ni hay producción de gases.* Los tubos permanecen azules, o han virado insensiblemente, casi nada, al rosa. Pasamos el material de estos tubos, a otros tantos conteniendo suero de leche tornasolado.

Al cabo de 24 horas de incubación, el medio puede presentar tres aspectos.

1°.) *Rojo (pero a las 48 a 62 horas presenta un tinte amatista):*

Bacilo de SHIGA.

2°.) *Lila o Rosa; pero después de las 48 o más horas vuelve a ser azul:*

Bacilo MUCOSUS CAPSULATUS.

3°.) *Azul intenso.* Se pasa el material microbiano a leche tornasolada.

El medio no coagula:

Bacilo FECALIS ALCALIGENES.

El medio coagula (tinte azul intenso y redisolución lenta del coágulo):

Bacilo PIOCIANICO.

Segundo subgrupo

En estos tubos (seguimos con las colonias del grupo *a* que fueron sembradas en tubos de agar glucosado al rojo neutro) el medio ha sufrido una dislocación (ruptura) debida a la producción de gases, y también decoloración y fluorescencia.

En este caso, haremos el pase a otros tantos tubos conteniendo agar al acetato de plomo.

Se lleva a la estufa:

El medio no ha ennegrecido:

Bacilo PARATIFICO A.

El medio ennegrece; sembramos en leche tornasolada. Después de 12 a 24 horas:

El medio apare azul intenso; se ha producido la coagulación y después la redisolución del coágulo:

Bacilo PROTEUS.

El medio vira al rosa y después vuelve al azul (camaleonado).

Pasamos el material microbiano del o de los tubos, a otros conteniendo agar tornasolado inclinado, con sacarosa.

Aparecen colonias rojas (fermentación de la sacarosa):

Bacilo de CASTELLANI.

Las colonias son azules. Las pasaremos entonces al agar tornasolado inclinado, con manita.

Aparecen colonias azules:

Bacilo de MORGAN.

Aparecen colonias rojas:

Bacilo PARATIFICO B.

Bacilo de GARTNER.

Bacilo de AERTRICK.

GRUPO β

De estas colonias (rojas en el medio de Endo) elegiremos, como en el caso anterior, un número variable (5 a 10) y las pasaremos a tubos conteniendo agar al acetato de plomo. Al cabo de 12 horas:

El medio ennegrece francamente:

COLIBACILO.

El medio ennegrece, pero débil y tardíamente (24 a 48 horas):

ESTAFILOCOCO.

El medio no ennegrece; se siembran las bacterias en leche tornasolada. Se lleva a la estufa:

Aparece un coágulo rojo:

NEUMOBACILO DE FRIEDLANDER.

El medio no coagula, pero toma un color rosa:

Bacilo MUCOSUS CAPSULATUS.

El medio coagula tardíamente (3 a 5 días); el coágulo es duro, retraído lateralmente y empulgado:

ESTREPTOCOCCO.

El medio toma un color rojo o lila; a las 36 o 48 horas coagula; pero, más que ésto, se produce una simple sedimentación; por agitación, el líquido vuelve a ser homogéneo:

ENTEROCOCCO.

GRUPO γ

Constituido por los bacilos *subtilis*, *mesentéricus* y *megaterium*, no ofrece interés su separación.

Pero en caso de ser necesario, el aspecto microscópico, flagelos, etc., son suficientes para identificar la especie.

* * *

Entre las medidas de precaución que conviene tomar, al efectuar el pase de las colonias incoloras (grupo α) del medio de Endo, aconsejamos:

- a) Al mismo tiempo que se siembran en agar rojo neutro, volver a sembrar nuevamente en el mismo medio de Endo; o, por lo menos, marcar las colonias originarias y examinarlas al cabo de 2 o 3 días. Esta medida queda explicada por el hecho de que algunas razas de *colibacilos* no enrojecen el medio de Endo en el primer cultivo, haciéndolo fuertemente en el segundo.

Así mismo, el bacilo *mucosus capsulatus* fermenta muy tardíamente la lactosa del mismo medio, razón por la cual aparece este microorganismo en dos lugares diferentes de la marcha.

Con las medidas propuestas, quedan salvados esos obstáculos, y descartado todo error.

- b) Otra medida, útil hasta cierto punto, pero no tan indispensable si se trabaja con toda pulcritud, es hacer, al mismo tiempo que el pase de las colonias a que acabamos de referirnos, una nueva siembra en tubos de agar simple, utilizando el material

que queda adherido al hilo de platino. En este caso, habrá que marcar con un mismo signo a los tubos sembrados con material procedente de la misma colonia.

En esta forma se tiene, en cualquier momento, la especie microbiana aislada, libre de toda contaminación accidental, que con motivo de las siembras sucesivas, es fácil se produzca.

Por otra parte, esta muestra es de más vitalidad, por haberse desarrollado en un medio exento de antisépticos; servirá, en todos los casos, para confirmar los resultados obtenidos en la marcha general del análisis.

La cantidad de tubos de agar rojo neutro, — o lo que es lo mismo — el número de colonias originarias que han de ser sembradas, es convencional.

Depende de la naturaleza del análisis, del material y su origen. Pueden reducirse a un tubo, como también aumentarse a voluntad. En este último caso, podría determinarse, con cierta aproximación, la especie dominante.

Los tubos de Barsiekow manitado, a los que hemos dotado de un tubo de hemólisis invertido, con el objeto de que acuse el desprendimiento de gases (gases que retendría el tubito, a manera de campana) tienen una importancia capital; pues muchas especies microbianas, algunas no identificadas todavía, demostrarán su naturaleza, agena a la de los microorganismos estudiados, en estos tubos.

Demás está decir que todos los resultados deben ser confirmados por un examen microscópico, coloreando con gram-fucsina.

—Si interesara solamente comprobar la presencia o ausencia de los bacilos disentéricos, prescindiendo en absoluto de caracterizar los otros elementos de la serie, bastará con sembrar el material en medio de Endo, a objeto de proceder a un aislamiento. Las colonias incoloras se pasarán directamente al Barsiekow manitado. En estas condiciones, el Eberth y los paratíficos, en caso de existir, coagularán el medio. Los bacilos disentéricos de Flexner y de Hiss, harán virar el medio al rojo, sin gases. El Shiga, mucosus, fecalis y piociánico, lo mantendrán azul (sin gases).

De manera que, con solo dos siembras, llegamos casi a resolver el problema. Pues sería raro que en una misma materia fecal, coexistieran el Flexner y el Hiss, o estos dos con el Shiga.

Lo más probable será que estén presentes el Flexner o el Hiss (tubos rojos, sin coágulo) en cuyo caso, el o los tubos azules indicarán, muy probablemente, la presencia del "fecalis". O bien todos los tubos sin coágulo permanecen azules, y entonces se hace indispensable continuar la marcha.

--La determinación aislada del enterococo, puede simplificarse, siguiendo la técnica aconsejada por Thiercelin. Consiste en diluir en el caldo contenido en un tubo, una pequeñísima cantidad de materia fecal; filtrar luego por papel doble (filtro y embudo esterilizados) y recibir el filtrado en un tubito también esterilizado. Se siembra este líquido en varios tubos de agar inclinado. Previa incubación, aparecen colonias, la mayoría de las cuales pertenecen al enterococo. La filtración ha separado la mayor parte de los gérmenes.

Esta técnica es susceptible de una modificación importante: reemplazar los tubos de agar simple por placas de medio de Endo, en donde el enterococo se desarrolla perfectamente; no así muchas de las innumerables bacterias intestinales, que, como es lógico, pasarán en mayor o menor cantidad por el filtro.

—El bacilo piocianico puede confirmarse, si se desea, sembrándolo en el medio de prueba (agar peptonado glicerinado) de Gessard.

—Cuando interesa solamente la determinación del *bacilo de Eberth*, debe procurarse su separación por un medio basado en la movilidad del bacilo. Al efecto, podría emplearse el método de Cambier, que usa tubos doblados en forma de U, llenos de arena muy fina, y como medio de cultivo, caldo al rojo neutro. Sembrando una pequeña porción (algunas gotas) de la emulsión sospechosa, en una de las ramas, se podrán recoger, 18 horas después, los bacilos típicos, mezclados solamente con el coli, en la otra rama.

Carbonell ha modificado este método, reemplazando el tubo en U por un tubo de ensayo, de gran diámetro, dentro del cual va otro tubo de menor calibre, abierto en las dos extremidades, habiéndose estirado y curvado a la inferior; dentro de este pequeño tubo, se coloca arena fina. La diferencia de este método con el anterior, consiste en que Cambier emplea un solo medio de cultivo (caldo al rojo neutro) mientras que Carbonell propone bilis para el tubo interior, y caldo para el exterior.

Como método de fácil aplicación al coprocultivo, la modificación de Carbonell es ventajosa. La técnica a emplear es la siguiente: emulsionar la porción sospechosa de heces, en una pequeña cantidad de bilis esterilizada. Teniendo los tubos preparados y esterilizados al calor seco, se vierte, mediante un embudo esterilizado, caldo con 1° de glucosa y algunas gotas de rojo neutro, en el tubo exterior; se espera a que el caldo suba lentamente a través de la arena. Cuando toda la arena se ha humedecido, se vierte sobre ella (es decir, en el tubo interior) la bilis con el material a investigar. Se lleva a la estufa. Al cabo de 18 horas, se toman una gota o dos del caldo, que debe haberse enturbiado, y se siembran en una placa de media de Endo, siguiendo desde este punto, con la *Marcha sistemática*. Bastando con reseminar una o dos de las colonias obtenidas, en lugar de 10 o 15, como se indica en el Análisis General.

III

DETERMINACIONES ESPECIALES

La investigación del *bacilo de Yersin* es generalmente practicada en la sangre, jugo ganglionar y esputos. La investigación en las heces, a menudo abandonada, es muy importante; pues las materias fecales constituyen un medio principalísimo de propagación de la peste bubónica.

Por otra parte, es conocido el hecho de que las pulgas infectadas no inoculan el virus con su rostro en el momento de la picadura, sino por las deyecciones que depositan al lado de la misma.

Debe sembrarse primeramente en placas de agar simple o agar glicerinado, manteniendo los cultivos solo a 20° C. A las 24 o 48 horas se producen colonias translúcidas, y después opacas en el centro, con bordes transparentes, festoneados e irisados.

Las colonias sospechosas deben pasarse a tubos de caldo cubierto con una capa de aceite esterilizado. Se produce el característico cultivo en estalactitas, que penden de la superficie inferior

del aceite. Se hace entonces, con este material, una investigación microscópica; y si se comprueba el aspecto en navecilla, inmovilidad, agrupación en cadenas, etc., debe terminarse la identificación con la prueba de la aglutinación, usando suero antipestoso; o bien inocular en el peritoneo del cobayo, el que muere a las 24 o 48 horas.

Bacilo de Koch. Se ha encontrado, en las heces, al bacilo de Koch, en casos de tuberculosis cerrada o de granulía. No procedían, pues, en esos casos, de esputos ingeridos.

La principal precaución que hay que tomar, es prohibir al enfermo tomar leche o manteca durante los dos o tres días que antecedan al examen. Se elimina, así, una causa de error, muy importante.

El bacilo de Koch puede investigarse directamente en un grumo mucoso, o, si lo hay, en un grumo mucopurulento, tiñendo con fucsina de Ziehl, decolorando por el ácido nítrico, y luego por el alcohol sin emplear la coloración de fondo, pues los numerosísimos gérmenes de las heces, que se colorearían todos de azul, dificultan la búsqueda del bacilo de Koch.

En caso negativo, debe procederse a la homogeneización de las heces; sirven, para este objeto, los numerosos métodos propuestos. Citaremos el de Soparkar, por ser uno de los mejores.

Consiste en tratar las materias fecales, si son fluidas, viscosas, por tres a cuatro volúmenes de una solución de soda al 4%, esterilizada y preparada con agua destilada. Si son sólidas, puede emplearse mayor cantidad. Se mezcla por agitación y se lleva a la estufa a 37° durante 30'. Se agita y se deja otros 30' a 37°.

Pasado ese tiempo, se centrifuga durante 15'; sepárese el líquido que sobrenada y añádase al sedimento, de consistencia glerosa, 4 a 5 gotas de HCl al 4%. Debe comprobarse con el tornasol que la reacción es ácida.

Este sedimento puede observarse directamente, o inocularlo al cobayo, o hasta sembrarlo en medio de Petroff.

Bacilo vírgula. Por lo general, no se puede afirmar la presencia del germen específico del cólera, por simple examen microscópico. Las deposiciones a causa de la falta de pigmentos biliares, son blanquecinas, como papilla de harina, o cocimiento de arroz.

Tienen en suspensión copos transparentes, parecidos a arroz hinchado (granos riciformes) y carecen de olor fecal.

Para la siembra, conviene seguir la técnica de Metchnikoff:

“Se siembra en varios tubos de gelo-pepto-sal (fórmula Metchnikoff) cantidades variables de heces (desde unas gotas de emulsión hasta 5 c.c.). Se incuba a 37°. Al cabo de 4 a 5 horas, se producirá un enturbiamiento en los tubos y a las 7 horas, un velo en la superficie. Examinada al microscopio una porción de este velo, deben encontrarse los vibriones, impurificados por otros microbios”.

Se pasa una porción de este velo a un nuevo tubo de pepto-gelo-sal. Se obtiene así un cultivo casi puro, el que se pasa a placas de agar de Dieudonné, a objeto de proceder al aislamiento y obtenerlo completamente puro.

El medio de Dieudonné, por su gran alcalinidad, impide el desarrollo de la inmensa mayoría de las bacterias intestinales, o lo retarda considerablemente. Sólo el bacilo piocianico y ciertos cocos producen colonias, pero muy diferente de las del cólera.

Cuando las heces son muy ricas en vibriones, pueden suprimirse las siembras en peptona y proceder al aislamiento en el medio de Dieudonné.

La identificación final del vírgula colérico, debe hacerse mediante la prueba de Pfeiffer (inyección del vibrión en el peritoneo de un conejo, inmunizado, comprobándose después de 30' la aglutinación, inmovilización y destrucción de los vibriones retirados con una pipeta).

O bien por la prueba de Bordet, muy parecida y mucho más sencilla.

Se disuelve una pequeña cantidad del cultivo en agar (de 18 a 20 horas) en un poco de caldo esterilizado. Examínese la suspensión en el microscopio, a objeto de comprobar que no tiene grumos.

Añádase, enseguida, suero preventivo en la proporción de 1×10 a 1×20 . La aglutinación, seguida de transformación granulosa, tiene lugar al cabo de algunos minutos, y alcanza su máximo al cabo de dos horas, siempre que se haya conservado la preparación en la estufa a 37°.

En el caso de no producirse la aglutinación y destrucción

granulosa, habrá que concluir en que los vibriones encontrados no corresponden al vibrión de Koch, agente del cólera.

Gonococo de Neisser. En la blenorragia del recto, las heces contienen siempre gran cantidad de pus. Es ahí donde se debe investigar por el método clásico: gram - fucsina, a objeto de diferenciarlo de los numerosos diplococos gram - positivos. También puede hacerse una siembra de este pus, en agar - ascitis, o suero coagulado.

Espiroqueta pálida. En la sífilis del recto, las heces contienen sangre y moco, y en esas partes debe investigarse el espiroqueta, sea por ultra - microscopia, o por coloración según el método de Hollande o de Fontana Tribondeau.

IV

Hemos pasado revista a las especies permanentemente patógenas y a las que, ordinariamente saprofitas, son patógenas para los animales de laboratorio, y aún para el hombre, en determinadas circunstancias.

Citaremos ahora algunos caracteres de unas cuantas especies, incompletamente estudiadas hasta ahora y que constituyen un grupo enorme entre las bacterias intestinales: las saprofitas. Se desarrollan cómodamente en placas de gelatina, a la temperatura ambiente. En cambio, el grupo constituido por las patógenas, no se desarrollan o lo hacen mal (no producen colonias con caracteres diferenciales netos) teniendo todas su temperatura óptima, alrededor de los 37°. Temperatura que, por otra parte, no resiste la gelatina sin fundirse. Por creerlo de utilidad, insertamos a continuación un cuadro, bastante completo, de la mayoría de esas especies (las conocidas), huéspedes habituales del intestino y de los medios exteriores (tierra, agua, aire, vegetales).

Se clasifican, de acuerdo a los caracteres que presentan por siembra en placas de gelatina, en cuatro grupos:

1°) Especies no cromógenas, que no liquidan la gelatina en

10 a 15 días, a la temperatura ambiente.

- 2°) Especies no cromógenas, que liquidan la gelatina.
- 3°) Especies cromógenas, que no liquidan la gelatina.
- 4°) Especies cromógenas, que liquidan la gelatina.

Se consideran como no cromógenos, los microbios que dan colonias blancas o incoloras.

Las especies que liquidan la gelatina después de los 15 días, son consideradas como no liquidantes.

Para estas siembras, se impone la siguiente técnica:

Una pequeñísima porción de materias fecales, adherida al asa (o ansa) de platino, se diluye en 10 c.c. de agua esterilizada.

Se funde, al baño maría, el contenido de 5 o más tubos de gelatina, se espera a que baje la temperatura y se siembra en uno de ellos, una gota de la emulsión recién hecha.

Se agita bien, haciendo girar el tubo entre las palmas de las manos, cuidando de que el contenido no toque el tapón de algodón. De este tubo se retira, con el hilo de platino, otra porción, y se siembra en un segundo tubo de gelatina, etc. Luego se vierten todos los tubos en placas de Petri esterilizadas, y se dejan a la temperatura ambiente.

Para el estudio de los anaerobios, conviene el tubo de Vignal.

El aspecto que se describe en los cuadros siguientes, corresponde a las colonias superficiales, en su máximo desarrollo.

Abreviaturas:

- G + : gram positivo.
- G — : „ negativo.
- m : móvil.
- i : inmóvil.
- mm : milímetros.
- l. m. r. : liquidación muy rápida (1° o 2° día).
- l. r. : liq. rápida (4° a 5° día).
- l. l. : „ lenta (11° al 12° día).
- l. t. : „ tardía (después de 21 días).

CUADRO I

ESPECIES NO CROMOGENAS, QUE NO LIQUIDAN LA GELATINA

NOMBRE	ASPECTO DE LAS COLONIAS EN PLACAS DE GELATINA	OBSERVACIONES
B. acidi lactici.	Centro blanco. Contorno azulado.	Parecido al C. lactis aerógenes.
B. aquátilis sulcatus	Montaña de hielo.	m. cultivo amarillo en patatas.
B. figurans.	Centro blanco. Filamentos formando figuras irregulares.	Poco m. Sobre gelosa en estria, cultivo en pluma de ave.
B. dendriticus.	Blanco, con ramificaciones laterales en dendritas.	Velo espeso en caldo
B. bullescens	Blanco, un poco moreno.	i. Gas abundante por picadura en gelatina.
B. devorans.	Bola blanca en el fondo de una cúpula.	m. G —. En picadura, forma un canal hueco sin liq.
Coccus aquátilis.	Blanco porcelana.	i. G +
C. candicans	Blanco lechoso.	i.
C. candicus	Blanco de nieve.	i.
C. concentricus.	Blanco azulado.	i. Bordes frecuen. dentados.
C. plumosus.	Blanco. Prolongaciones laterales.	Bordes frec. levantados.
C. Ureae.	Blanco de bujía.	
C. viticulosus.	Blanco, ancho, irradiaciones hacia la parte profunda.	En picadura, fieltro de filamentos alrededor del trazo.
Protens Zopfi.	Blanco coposo - filamentos.	m. G +. en picadura, cultivo arborescente.
Protens Zenkeri	Idem.	m. G +. olor de caldo podrido.
Sarcina alba.	Blanco. Pequeñas colonias.	Líquida hacia 15° día.
Spirillum concentricum.	Disco blanco, 5 mm. círculos concéntricos.	m. Ciliado. 2 a 4 espiras.
Sp. undula.	Colonias pequeñas, transparentes, un poco amarillentas.	2 a 5 espiras. Movil y ciliado.

CUADRO II

ESPECIES NO CROMOGENAS, QUE LIQUIDAN LA GELATINA

B. megaterium	Colonias pequeñas, redondas, blanco-grisáceas, después irreg. franjeadas.	Bacilos muy gruesos. poco m. G +. Esporulados. l. r. cúpula.
B. mesentéricus vulgatus.	A 2º día, colonia grande. Centro gris o amarillento, contorno claro. Prolongaciones radiales, con aspecto de erizo.	m. G +. Sobre patata, membrana grisácea, con festones salientes (asp. de intestino),

NOMBRE	ASPECTO DE LAS COLONIAS EN PLACAS DE GELATINA	OBSERVACIONES
B. mesentéricus ruber, fuscus, niger.	Como el b. mesent. vulgatus.	Idem; sobre patata, membrana roja, morena o negra, resp.
B. subtilis	Blanca o amarilla; redondeadas, luego con filamentos radiales permanentes.	Bac. largo, 4 a 5 μ . m. cadenetas. G +. l. r. en cúpula.
B. punctatus . . .	Al 3er día, liq. en forma de copa. Líquido azulado con puntos blancos.	m. G —. l. m. r. cultivo moreno sobre patata.
B. vermicularis.	Blanco grisáceo, borde ondulado, centro arrugado.	Bacilo en cadeneta.— esporos ovoides en patata.
Bac. termo	Al 3er día centro amarillento; alrededor líquido turbio; alrededor del líquido, borde claro sinuoso. 10 mm. A veces enverdece el medio. l. r.	Formas en bacilo, diplobacilo y estreptobacilo. Movil. Enturbia el caldo con ligero velo. Liquida el suero coagulado.
B. cloacae.	Colonias azuladas en la superficie, amarillas en profundidad.	m. G —. Sólo se diferencia del colibacilo por liquidar la gelatina.
B. mycoides y b. radicosus	Al 2º día, 5 a 10 mm. blanca, formada de filamentos entrelazados, espesos en la superf. delg. en la prof. Apariencia nebulosa, como micelio de moho.	m. G +. En estria sobre agar, cultivo en pluma de ave.
B. implexus	Puntos blancos. Al microscopio, aspecto de filam. entrelaz. l. r.	i. G +. Esporula.
B. nubilis	Manchas grisáceas poco visibles. Al microscopio igual que el anterior.	l. r. Poco m. Frecuentemente en cadenetas
B. radiatus aquatilis	Azulada. Al microscopio como el ant.	l. r. Poco movil.
B. gazo formans	Al 2º día, cúpula liquidada. Masa blanquecina. Burbujas de gas.	Bacilos delgados, móviles. En patata, membrana amarillomorena.
Cocus radiatus	Blanco. Reflejos verde-amarillento. Aspecto de estrella de mar. l. r.	Sobre patata, trazo moreno.
Sarcina cándida	Blanco. Des. amarillento.	l. r.
Urobacillus Freudenreichi	Blanco lechoso. Borde irregular. Líquido viscoso. Colonias pequeñas.	m. Bacilos y filamentos.
Urobacillus Schutzenb. I.	Blanco lechoso, redondo. l. r.	Cocobacilo móvil.
Urobacillus Schutzenb. II	Idem.	Bacilos filamentosos móviles.

CUADRO III

ESPECIES CROMOGENAS QUE NO LIQUIDAN LA GELATINA

NOMBRE	ASPECTO DE LAS COLONIAS EN PLACAS DE GELATINA	OBSERVACIONES
B. subflavus. . .	Amarillo pálido, borde dentellado	Un poco móvil. Cadenetas.
B. aureus	Amarillo de oro, de 1 a 4 mm.	Poco móvil. Aglutinado o en cadenetas.
B. aurantiacus .	Amarillo naranja.	Color naranja en patata.
B. fuseus	Moreno - amarillenta.	i.
B. brunneus. . .	Viscosas. Al principio blanquecina, después morena.	Frecuentemente esporulado.
B. stolonatus . .	Tinte variable, blanco o pardo. 1 mm. Muy saliente en la superficie.	m. Vuelve moreno al caldo.
B. latericus . . .	Rojo ladrillo. Puntiforme.	i.
B. Rubefaciens.	Rojo vinoso.	m.
B. rosacus metalloides.	Botones rojo carmín, 3 a 5 mm.	i. Reflej. metálicos sobre gelat. en estria.
B. fluorescens non liquefaciens.	Disco claro, superficie áspera, granulosa, borde sinuoso. Gelatina fluorescente.	i.
B. fluorescens pútridus.	Como la precedente. Olor fuerte de orinas.	m. G —.
B. erythrosporus	Blanca. Gelatina verdosa.	m. Esporos rojos.
B. berolinensis indicus.	Blanca. Al 4º día, azul índigo.	m. azul sobre gelosa.
B. sineyanus. . .	Colonias pequeñas, mucosas. La gelatina es azul gris.	Poco móvil. Zoogreas. Leche azul.
B. janthinus. . .	Centro azul o violáceo, a veces incoloro, saliente, 1 a 2 mm. l. t.	Poco m. Violeta sobre patata, agar y leche.
Micrococcus luteus.	Redonda, amarillo de azufre, de 2 a 4 mm.	Zooglas. Am. anaranjado, sobre agar.
M. aquatilis luteus.	Redonda, transparente, amarilla, de 2 mm.	Diploc. o estrep. G —. Cultivo espeso, am. sobre patata.
M. citreus	Color crema, 5 a 8 mm.	Diplococo.
M. flavus tardigradus.	Amarillo de cromo, 1 mm.	Cocos aislados o con glomerados.
M. aurantiacus .	Amar. de naranja.	Conglom. velo amarillo en caldo.
M. stellatus . . .	Moreno amarillento, 2 mm. Prolongaciones radiales en estrella de mar.	En picad. arborización alred. de la estria.
M. agilis	Rosa o roja, muy pequeña.	m. Dipl. o Tetr. G +.
M. roseus	Rosa, levantada, 1 a 3 mm.	Dipl. o Tet. Rosa en caldo.
M. cinnabareus .	Rojo ladrillo, después cinabrio, 1 mm.	—
M. vislaccus. . .	M. Violeta. Colonias salientes.	Frecuen, en cadenas.
Sarcina carnea.	Rosa.	—
Strept. cinereus	Colonias redondeadas, gris amarillentas, superficie plegada.	G +. Invisible sobre patata.

NOMBRES	ASPECTO DE LAS COLONIAS EN PLACAS DE GELATINA	OBSERVACIONES
Spirillum serpens.	Am. verdoso, o parduzca, redonda. Liq. t. blanca sobre patata.	M. 10 a 30 μ , 3 a 4 espiras. Am. sobre agar.
Spir. tenue . . .	Am. moreno. l. t.	M. 4 a 15 μ , 1 a 5 espiras, nada sobre patata.
Spir. undula . . Urosarcina Hansenii.	Véase cuadro I. Amarillento.	En caldo, depósito arenoso.

CUADRO IV

ESPECIES CROMOGENAS QUE LIQUIDAN LA GELATINA

B. ochraceus . . .	Pequeñas esferas, al principio am. pálidas, desp. am. ocre dorado.	l. r. poco m. G—. ocre sobre agar y patata.
B. arborescens . . .	Amarilla en el centro; unas veces redondeada, con anillos exteriores filamentosos; otras, como gavilla de trigo, con atadura en el centro.	i. G—. Amarillo parduzco sobre agar y patata.
B. plicatus	Blanco-amarill. Puntos salientes (mora).	i.
B. mesentéricus vulgatus etc. . .	Véase cuadro II.	
B. subtilis	Idem.	
B. cloacae	Idem.	
B. prodigiosus . . .	Al principio grisácea, desp. roja. Liq. m. r. y muy extendida.	Móvil en medios liq. G—. Bacilos o cocos, según los medios. Rojo sobre patata, a 20°.
B. rouge de Kiel	Roja, contorno sinuoso. l. r. 5° día.	B. largo, 3 a 5 μ , poco m. sobre patata, rojo violáceo a 30°, carmin a 25°.
B. fluorescens liquefaciens . . .	Blanca grisácea. Gelat. verde fluoresc. liq. m. r. y muy extendida.	m. G—. En caldo, enturbiam. con fluorescencia.
B. chlororaphis	Centro gris, filamentos radiados; cristales verdes en el líquido de liquefacción, 6° a 12° días.	m. En caldo, enturbiamiento, a menudo con cristales verdes.
B. polychrome . . .	Colonia verde, rodeada de una zona teñida en verde, o verde azulado, sin fluorescencia. A veces, granos azulados en la colonia.	Bac. polimorf. G—. Sobre la mayor parte de los medios, pig. variab.: verde, rojo, pardo, violeta.
B. ceruleus	Azul, o azul gris, 5 mm.	m.

NOMBRES	ASPECTO DE LAS COLONIAS EN PLACAS DE GELATINA	OBSERVACIONES
B. lividus . . .	Azul negro. Colonias en manchas de tinta.	m. azul negro en agar.
B. violaceus . .	Membrana espesa, al principio amarill. después violeta. l. r.	Violeta-negro sobre agar.
Cladotrix cromógenes	Puntos blanco-amarill. Aureola parda.	Olor fuerte. Sobre agar, estria blanca, aureola parda.
M. flavus liquefaciens	Amarilla. Aureola líquida, atravesada por tractus radiados (rueda de carro) 4 a 6 mm.	Diplococ. y conglomerados.
M. flavus desidens	Amarillo pardo, 5 a 10 mm. Reblandecimiento sin licuación.	Amarillo pardo sobre patata.
M. cremoides . .	Amarillentas con prolongaciones radiadas. Hay colonias profundas, am. o pardas.	Conglomerados. Amarillo sobre agar, crema en patata.
M. fitzeus . . .	Pardo o negra. l. r.	
M. rosaceus . .	Rosa.	
Sarcina flava . .	Amarillo. l. r.	
Sarcina aurántiaca	Amarillo-anaranjada.	

APENDICE

MICROBIOLOGÍA DEL DUODENO

Fuera de todo trastorno dispéptico, la flora permanente del duodeno es muy escasa, tanto en cantidad como en especies diferenciadas, al punto de no encontrarse ningún microorganismo, en algunos casos. La bilis juega, indudablemente, un cierto rol (aunque relativo, como veremos después) de esterilización duodenal.

Normalmente se encuentran, en el líquido duodenal retirado mediante la sonda de Einhorn y de acuerdo a sus instrucciones, el bacilo coli, ciertas variedades de estreptococos, diversos cocos gram-positivos, etc.

Libert encontró, también fuera de todo trastorno patológico, aún del más ligero, voluminosas levaduras ovóideas, y que cree poder clasificar entre las *torulas*. Su presencia aquí, como en la boca, estómago y materias fecales, es considerada banal.

La flora anaerobia ha sido muy poco estudiada. El mismo Libert no ha encontrado, en sus ensayos, ninguna especie estrictamente anaerobia, en líquidos procedentes de personas sanas.

En estado patológico, existe completo acuerdo en que el número de gérmenes aumenta considerablemente. Aaron estima que se puede, considerando el número de colonias que se obtienen por cultivo, apreciar la existencia de un trastorno digestivo.

Indudablemente, la técnica para la extracción del líquido debe ser perfecta; pues sino se encontrarán, no solo los microbios parásitos del estómago (en donde la flora es abundante y variada) sino también los de la boca y los dientes.

El estreptococo ha sido señalado con mucha frecuencia, encontrándose a veces en tal abundancia, que constituye un verdadero cultivo (angiocolitis, duodenitis supurativas, enteritis de los lactantes, etc.). También se han encontrado enterococos de Thiercelin.

Se han encontrado, asimismo, formas filamentosas, a veces en gran abundancia, y hasta ahora de naturaleza desconocida.

Del líquido duodenal también se han aislado el bacilo de Eberth y los paratíficos, con la particularidad que su investigación, aquí, es de una técnica simple, no encontrándose presentes los numerosísimos gérmenes asociados que luego aparecen en las materias fecales.

No podemos pasar sin citar el hecho de que numerosos investigadores encontraron bacilos de Eberth en el contenido duodenal de individuos con hemocultivo y R. de Widal negativas; otros los encontraron en personas con coprocultivo negativo.

También ha sido encontrado por numerosos bacteriólogos, el bacilo de Koch en la primera parte del intestino delgado. Y teniendo presente que parece comprobado que el bacilo de Koch se vierte en el intestino por la bilis (Calmette), al igual que el bacilo de Eberth, podrá comprenderse la grande y real importancia que tiene su investigación en el contenido intestinal.

El espiroqueta de la sífilis ha sido buscado por Libert, quien

no encontró más que espirilos, algunos identificables con los que se encuentran en la boca, otros más sospechosos. Pero nunca pudo conferir la infección a conejos, por inoculación en la córnea.

Se han señalado, asimismo, voluminosos diplococos gram - positivos, tetradas o sarcinas, el bacilo subtilis, el b. mesentérico, el b. enterítides de Gartner, y algunos otros.

Con respecto a los anerobios del líquido duodenal de personas enfermas del aparato digestivo, se han encontrado, en ciertos casos, en número extraordinario. Entre ellos, el *perfringens* y el *fallax*.

En cuanto a los parásitos animales, ha llegado a determinarse la presencia, en el líquido duodenal, de amibas (amibas hematófagas, móviles) y sus quistes; y, sobre todo, la *Giardia intestinalis*. Damade, examinando el líquido duodenal, encontró numerosas *Giardias*, examen que, practicado en las materias fecales, resultó negativo, o solo demostró la presencia de quistes, según los casos.

DR. SIMÓN LIBEDINSKY

Jefe del Laboratorio del Hospital Iturraspe.
(San Francisco)

AÑO

CTUBRE 1927





Cuadro de los Decanos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, desde su fundación hasta la época actual.