A/F 15 4

Estudio

Bacteriológico del Cólera

por el

Dr. D. Eduardo Pérez Cano

ex-interno por oposición de la Facultad de Medicina en Cádiz y Médico por oposición del Hospital Provincial de Almería

y Del Cuerpo de Médicos Titulares y

Condecorado con la cruz blanca y del Mérito Militar de 1.ª clase, etc., etc. y

Almería

Tip. de J. Martínez. Teatro

1911.

DEDICATORIA

Dedico este modesto trabajo al Excelentísimo Ayuntamiento, que con gran celo ha puesto á la porfección sus Servicios Sanitarios, colocando estos entre los primeros de la Nación, para salva-guardia de la salud pública en nuestra Ciudad y noble estímulo de su Cuerpo Médico-Municipal.

El Autor.

INTRODUCCION

El peligro de una invasión Colérica en Almería, ha sido tenido durante toda la Estación veraniega pasada, por nuestras relaciones comerciales con los puertos infectados y muy principalmente con Nápoles, en donde la epidemia hacía grandes estragos y se sostenía con una gran persistencia.

Esta amenaza, que tenía á la población en estado de ansiedad, fué la preocupación de las autoridades políticas y sanitarias, y con gran celo hubieron de ocuparse de llevar á la práctica las medidas preventivas necesarias contra la posible invasión de la epidemia, realizándose principalmente en las acertadas disposiciones de la Dirección de Sanidad de este puerto, que con una gran pericia ha sabido librar á esta perla del Mediterráneo, de la repulsiva visita del cólera, armonizando los intereses comerciales, con las imperantes demandas de la opinión pública.

Medidas sabias, han sido puestas también en práctica en el orden de la Higiene y Sanidad Municipal, hasta el punto de la constitución de las Juntas de Sanidad de los Distritos, formadas por los tenientes alcaldes, concejales, y alcaldes de Barrio, accesorados por facultativos, los que ponían en acción cuantas medidas sanitarias se aconsejaban, y fiscalizaban con gran celo las prácticas de la higiene en sus respectivas demarcaciones.

Se han construido dos extensos é higiénicos pabellones

de aislamiento en las afueras de la Ciudad, para albergar á los coléricos en caso de invasión; se han vigilado extremadamente la conducción de aguas á la Ciudad, y se han hecho investigaciones analíticas de ellas, en comprobación de la calidad infectante que pudieran tener.

Con gran celo se ha llevado á cabo una minuciosa fiscalización bromatológica vigilando cuidadosamente los mercados y puestos de venta pública, garantizando de este modo la profilaxis alimenticia que tanta importancia tiene en la prevención contra el cólera.

Nuestra gran instalación del Parque Municipal de desinfección se ha surtido de todo el material preciso para su cometido, instituyendo las Brigadas Sanitarias, perfectamente equipadas, é instruidas convenientemente en las prácticas de estos servicios.

Para la instrucción del vecindario en materia de prevención anticolérica, se han repartido profusamente cartillas sanitarias con las máximas y preceptos más importantes que habian de ponerse en práctica, y se ha hecho publicar en la prensa diaria, vulgarizaciones sobre diferentes puntos de la enfermedad colérica para estudio y conocimiento del público.

Las visitas domiciliarias de vigilancia sanitaria, en los obreros ocupados en la carga y descarga de buques, los preceptos de desinfección y fiscalización en nuestra vía ferrea, la inmediata declaración de enfermedades infecciosas y otra porción de prácticas sanitarias que se hace prólijo enumerar, han sido nuestro campo de acción para librarnos de tan temible huesped.

Todas estas prácticas, merecen la mas plausible aprobación por parte de todos, y muy especialmente por la clase médica, que por su destino, es el centinela que velando por la salud del vecindario, dá la voz de alerta, para estimular á la realización de sus consejos, que en esta ocasión se han cumplido fielmente por todas las clases sociales.

Yo, el último de los de esta clase, el que menos experiencia tiene de estas prácticas, no puedo menos de reconocer la gran labor de las autoridades todas, que con decisión y constancia han insistido en su campaña sanitaria, y es de esperar que esta gran labor, coronada con el éxito, sea en

todo tiempo la salva-guardia de nuestra salud pública.

Pero en medio de esta excelente organización sanitaria, es falta muy saliente, la necesaria instalación para investigaciones Bacteriológicas, de los casos que por sus antecedentes puedan infundir vehementes sospechas de cólera, es esta una cuestión que en verdad se ha prescindido por completo de ella y que en la actualidad reviste una gran importancia, puesto que podemos decir es el punto de partida de nuestras acciones posteriores según los resultados obtenidos en estas investigaciones.

Estimulado por esta necesidad sentida, hube de ir en busca de alguien que me facilitase medios para poder allegar á esta organización, algo de lo que según mi pobre entender, estaba completamente falto.

Al efecto he encontrado lo que me proponía en el Laboratorio Municipal de Madrid, que gracias á la amabilidad y amor á la ciencia del eminente Bacteriólogo Dr. Durán, me ha proporcionado toda la labor educativa en estas cuestiones, facilitándome un estudio práctico de diagnóstico Bacteriológico de cólera, que con una gran paciencia ha ido instruyéndome, y que yo á medida de mis cortas aptitudes he tratado de recoger.

Y á los efectos de ser útil á esta organización sanitaria, es por lo que he dedicado este trabajo á dar una ligera idea de los procedimientos que he seguido en estas investigaciones, por si fueran de utilidad y de conveniencia para la práctica de los servicios.

Cultivos del vibrión colérico.

Los cultivos del vibrión colérico los he llevado á cabo de diferentes modos, según los progresos de mi instrucción, comenzando por los métodos de siempre, de las semillas coléricas previamente conocidas, y acabando por la investigación de la calidad de los gérmenes en deyecciones incognitas, convenientemente preparadas, verificando el aislamiento y siembra de los gérmenes sospechosos.

De esta forma, primeramente conocía la manera de sembrarse y desarrollarse el vírgula en los cultivos, y cuando hube de darme cuenta de esta importante cuestión fundamental en la Bacteriología del cólera, pude pasar hacer siembras de productos que ignoraba si eran ó no coléricos, para aplicar á los cultivos desarrollados los antecedentes recogidos en el estudio de mis primeras siembras, á base de una certidumbre de ser coléricas.

Este estudio de siembras, ha sido hecho en diferentes medios de cultivo, que describiré seguidamente según el órden llevado y que en cada uno de ellos, pude comprobar debidamente el desarrollo del germen colérico.

Cultivos en agua de Peptona. Empezé por la siembra de las semillas coléricas en agua de peptona, preparada según la técnica siguiente.

En un balón colocado sobre un hornillo á fuego lento, se vierte un litro de aguadestilada y esterilizada, añadiendo seguidamente, 20 gramos de peptona chapoteaut y 5 gra-

mos de sal marina, agitando hasta su completa disolución.

Despues de la disolución perfecta, se añade 10 centígramos de ceniza de madera, y se tiene el balón en el hornillo hasta la ebullición; seguidamente se verifica la filtración en caliente al Chardin.

El líquido así obtenido es recogido en un balón y es de reacción alcalina, que puede neutralizarse añadiendo una solución de ácido tártrico, hasta la comprobación al tornasol.

El líquido obtenido se hace hervir durante 5 minutos, se vuelve á filtrar, y se recoge en un matraz repartidor, de donde se llenan los tubos con 10 cc. del medio llevándoles inmediatamente al autoclave á esterilización á 115 grados; Los tubos sacados del autoclave se capuchonan convenientemente y se guardan dispuestos para la siembra.

Esta se verifica, esterilizando primeramente á la llama del Bunsen la varilla de platino sembradora, é inmediatamente inclinando el tubo que contiene las semillas coléricas, se introduce la varilla de modo que no toque las paredes del tubo, y se recoge una pequeña porción de materia, capuchonando seguidamente el tubo de semillas.

Un tubo con agua de peptona es tenido con la misma mano que el de semillas, debidamente inclinado tambien, y retirado la guata capuchon con la mano que tiene la varilla, se introduce esta cargada de semilla colérica, sin que toque á las paredes del tubo, y hundiéndola en el líquido, hasta depositar en él la materia que porta.

Rápidamente se capuchona, se flamea el tubo por su boca al Bunsen, quemando la guata, que podrá apagarse por presión con la mano, y se esterilizará la varilla, llevándole al rojo en el mechero.

Verificada así la siembra, el tubo se coloca en una cestilla porta tubos y se lleva á la estufa á 37°.

A las 24 horas se saca el tubo y se observa, que el medio de cultivo, ha sufrido un enturbiamiento formándose en la superficie un velo delgadísimo, blanco que es en donde acuden los gérmenes coléricos, y de cuyo velo se toman para posteriores cultivos.

Dejando este cultivo, mas tiempo (36, 48 horas) se observa que invaden todo el medio unos precipitados floconosos, que se destacan claramente en el fondo de enturbia-

miento apreciado anteriormente, á las 24 horas de haber verificado la siembra, según hemos indicado.

Estos cultivos en agua de peptona han sido los originales para las siembras llevadas á cabo en los demas medios.

Cultivos en agar. La preparación de este medio de cultivo la efectué segun el procedimiento que describo á continuación.

Se pica en pequeños pedazos 250 gramos de carne de vaca, desprovista de tendones y aponeurosis, y se vierte sobre la cápsula que los contenga, 500 gramos de agua destilada fría, dejándoles 24 horas, para efectuar una maceración.

Despues se coloca la cápsula sobre un hornillo á fuego lento, y se agita todo con una espátula, hasta llegar á la ebullición, prolongando esta unos 10 minutos. Se hace pasar por un colador el producto de la ebullición exprimiendo el residuo, y el líquido obtenido se filtra caliente sobre papel humedecido para retener las grasas.

Al caldo así obtenido, recogido en una cápsula esmaltada, se le agrega 5 gramos de peptona chapoteaut, 0,50 gramos de sal marina, fosfato de sosa, 1 gramo; é inmediatamente se lleva á la ebullición, agitando para asegurar la disolución.

El líquido que obtuve era fuertemente ácido, y fué ligeramente alcalinizado, por la adición de pequeñas cantidades de solución normal de sosa, hasta la comprobación al tornasol; esta reacción es muy importante pues el germen colérico se desarrolla en medios alcalinizados.

El caldo alcalinizado fué colocado en un matraz, y transportado al autoclave á 115 grados, en donde estuvo diez minutos para ser esterilizado. Seguidamente de sacarle del autoclave se filtró al Chardin sobre papel humedecido, obteniendo un líquido limpido y perfectamente esterilizado, que se guardó en su balón correspondiente.

Una vez obtenido este caldo esterilizado, procedí á macerár en 500 gramos de agua fría, 10 gramos de agar (alga del Oceano índico), hasta que este estaba reblandecido (una hora proximamente), recogiéndole despues, y exprimiéndole perfectamente con un lienzo límpio.

Al caldo precisamente obtenido añadí los 10 gramos de agar ya reblandecidos, y fué llevada la mezcla en cacerola

esmaltada á 100 grados, durante 30 minutos, removiendo constantemente, la disolución, y una vez quitada del fuego y enfriada á 55 grados se le adicionan unas gotas de legía normal de sosa hasta completa alcalinización.

Al producto obtenido, se le agrega una clara de huevo diluída y batida en 100 gramos de agua esterilizada, y se hace mezclarle perfectamente á todo.

La mezcla se lleva al autoclave á 120 grados durante una hora. La albumina se coagula y forma un magma que entrapa á las impurezas. Sacado el producto del autoclave se filtra en caliente sobre papel mojado, y el medio filtrado se recoge en un frasco repartidor perfectamente esterilizado, de donde se llenan los tubos de cultivo en cantidades de 10 cc.

Una vez llenos estos se llevan al autoclave á 115 grados durante 20 minutos y sacados todavía calientes, se disponen sobre un plano inclinado; dejándoles 24 horas, al cabo de las cuales el medio se ha solidificado en superficie oblicua, estando dispuestos para efectuar las siembras.

Estas las verifiqué, cogiendo del cultivo en agua de peptona con la varilia de platino, una porción del velo superficial de aquel medio, y pasando la varilla así cargada varias veces por la superficie inclinada del agar.

Después de quemar la varilla al Bunsen y capuchonar los tubos, fueron trasportados á la estufa á 37°

A las 24 horas los gérmenes coléricos se habían desa rrollado, presentando la superficie del agar, un color grisano blancuzco, estriado; las colonias irregularmente esparcidas eran manifestadas por puntitos blancos que se destacaban en el fondo grisáceo del cultivo, su centro era granuloso y rodeado de una zona marginal lisa. Este fué el aspecto del cultivo en agar de los gérmenes coléricos.

Cultivos en gelatina. En la preparación de este medio he usado la técnica siguiente:

Al caldo preparado por maceración y cocción de 250 gramos de carne en 500 gramos de agua destilada, se le agrega después de filtrado, Peptona chapoteaut 5 gramos sal marina 0,50 gramos, fosfato de sosa 1 gramo, gelatina extrafina 40 gramos.

Se calienta todo á fuego lento en una cacerola esmalta-

da, agitando continuamente para impedir que la gelatina valla al fondo, una vez que está completamente disuelta, se hace hervir la disolución durante 2 á 3 minutos.

Seguidamente se procede á la alcalinización del medio obtenido, por adición de unas gotas de solución normal de legía de sosa, hasta comprobación al tornasol.

Para esterilizar el medio, se lleva al autoclave á 115 grados durante cinco minutos, precipitándose por este procedimiento los fosfatos térreos. Inmediatamente de sacarle del autoclave, se vierte el líquido en un filtro Chardin mojado, dispuesto sobre un embudo de filtración en caliente, para que la gelatina no forme masas.

El líquido filtrado se va recogiendo en un matraz repartidor, de donde se lleva á los tubos, con 10 c c. cada uno, llevándose después al autoclave á 110 grados durante 20 miminutos; se sacan del autoclave se capuchonan y se dejan enfriar, solidificándose la gelatina, constituyendo el medio apropiado para las siembras.

Estas las he verificado, recogiendo de los cultivos en agua de peptona, por la varilla punzante de platino esterilizada, materia del velo superficial, é inmediatamente colocando el tubo de gelatina boca á bajo, pinché la gelatina de su superficie al fondo; esterilización de la varilla al Bunsen, y transporté del tubo así sembrado á la estufa á 20 grados.

A las 24 horas aparecieron las colonias del germen colérico á lo largo de la picadura, produciéndose una cúpula en la superficie del medio en la cual es retenída una burbúja de aire; después comienza la licuación de la gelatina, comenzando por la superficie invadiendo todo el tubo poco á poco; al tercer día, la licuación fué completa, cesando los caracteres del cultivo.

Vertiendo gelatina en placas de Petri, sembrándoles y llevándoles á 20 grados, á las 24 horas apreció el desarrollo de colonias, manifestadas por pequeños puntitos blancuzcos, de centro granuloso, rodeados de un anillo brillante. La licuación fué apreciada al dia siguiente, comenzando por este anillo brillante, y por la parte central de la placa, apareciendo la colonia destacada de la cual se derivan pequeños grupos de vibriones; al tercer día la placa estaba

totalmente disuelta y habían desaparecido los caracteres del cultivo.

Estos cultivos en agua de peptona, agar y gelatina, fueron mis primeros pasos en el conocimiento de la siembras y desarrollo del germen colérico, pasando después al estudio de investigación del vibrión en deyecciones sospechosas convenientemente preparadas.

Para esto, utilizé unas heces, de las que se hicieron varias partes, mezclando algunas con el agua de peptona sembrada, y otras sin esta preparación; así disponía de deyecciones coléricas (infectadas por el cultivo en agua de peptona) y deyecciones que no lo eran. Se trata de diferenciar las unas de las otras señalando cuales eran las coléricas.

A estos fines, he seguido el método de siembras utilizado recientemente en Italia durante la epidemia para conseguir el aislamiento del vibrión colérico, de la flora intestinal, en las deyecciones específicas ó sospechosas.

Este método es el de Dieudonné, cuya técnica de preparación es como sigue.

Se vierte en una cápsula esterilizada 30 gramos de sangre recogida asepticamente y perfectamente deslibrinada, (la utilizada por mi, fué de carnero), añadiendole seguidamente 30 gramos de una redución de hidrato sódico en agua destilada al 1 por 100, se mezcla perfectamente estas substancias y se le añade 45 gramos de agar, preparado según he dejado indicado anteriormente.

Obtenida perfectamente la mezcla, se vierte esta, en cajas de Petri, esterilizadas y se llevan al autoclave á 115 grados de 5 á 10 minutos, sacandole despues, envolviendoles en papeles filtros esterilizados y dejándoles enfriar y solidificar.

Asi preparadas las cajas de Petri, están aptas para verificar el cultivo de las semillas sospechosas, las que en este medio se comportan de diferente manera según tengan ó nó caracter específico colérico, pues en este medio de cultivo se desarrollan con preferencia los vibriones coléricos con exclusión de los demas gérmenes intestinales, y podremos observar en las colonias desarrolladas, la existencia del vírgula.

Para efectuar la investigación de las heces según este procedimiento practiqué las siguientes manipulaciones.

Dispuse varios tubos con agua de peptona, y sembré en cada uno, un grumo de deyección, de las muestras preparadas según he dejado indicado, valiéndome para estas siembras de la varilla de platino convenientemente esterilizada, antes y después de cada siembra. (Procedimiento de Dunham. Toch)

A las 24 horas de tener estas siembras en la estufa á 37° los cultivos en agua de peptona exhibían un velo superficial que patentizaba el desarrollo de los gérmenes intestinales, contenidos en las muestras de deyecciones sometidas á investigación. ¿Cuales eran las coléricas?

Para esto, seguidamente llevé á cabo las siembras de cada uno de estos cultivos, en las cajas de Petri preparadas de antemano con el medio de Dieudonné numerando cada caja igualmente que el tubo correspondiente de donde procedía la semilla.

Después de verificar todas las siembras en las cajas de Petri, fueron llevadas éstas á la estufa á 37° donde permanecieron 24 horas, pasadas las cuales, pude comprobar el resultado de la operación.

Al efecto solo existía desarrollo de colonias en una de las cajas de Petri sembradas, correspondiente á un determinado tubo de agua de peptona, sembrado con un grumo de una de las muestras de deyección.

Estas colonias eran de vibrión colérico, comprobado por los diferentes medios que expondremos en los capítulos siguientes, á virtud del caracter electivo del medio por estos gérmenes, todo lo cual hacia señalar á la deyección de donde procedian como de caracter colérico.

De este modo pues, pude investigar el caracter colérico de una muestra de deyección entre varias que no lo eran.

Preparaciones microscópicas

El estudio de la morfología del vibrión colérico, se lleva á cabo por medio de las preparaciones microscópicas, las cuales he practicado por 2 procedimientos principales, el uno por la tinción del gérmen, el otro por observación directa del gérmen en gota suspendida.

El primero me sirvió para conocer y acostumbrarme á distinguir la forma vibriónica, mas intensamente exhibida en las preparaciones coloreadas, y el segundo para distinguir los vibriones sin coloración, afin de prepararme para la observación microscópica de la aglutinación en el suero diagnóstico, que expondré en el artículo siguiente.

Expondré á continuación cada uno de estos procedimientos detallando los métodos que he seguido, con las manipulaciones ejecutadas en cada uno de ellos.

Método á la fuchina de Ziehl. Primeramente empezé por la preparación del reactivo colorante, para lo cual hice las siguientes manipulaciones.

Trituré en un morterito de cristal 1 gramo de fuchina, á la que añadí 10 centímetros cúbicos de alcohol absoluto, mezclándoles perfectamente; seguidamente incorporé 5 gramos de ácido fénico y después por pequeñas porciones y agitando, agua destilada hasta 60 gramos, vertiendo todo el contenido del morterito en un frasco cuenta gotas, volviendo á llenar aquel con 40 gramos de agua verifiqué un enjuage que añadí al frasco.

Una vez tenido el reactivo colorante, procedí hacer la preparación según la práctica que á continuación expongo.

Dispuesto un porta, limpio por alcohol absoluto, procedí á verter en él unas gotas de agua destilada autoclavada, por medio de una pipeta esterilizada; inmediatamente cogí un tubo cultivo de agar, anteriormente descritos é inclinandole, cogí de la superficie con la varilla de platino esterilizada, una pequeña porción de semilla, que llevé á la gota de agua del porta, extendiéndole y diluyendo el producto del cultivo.

Fué llevado el porta asi preparado á la estufa á 37° para desecar la preparación, y una vez conseguído, fué fijada al Bunsen, procediendo inmediatamente á la coloración.

Para esto monté la preparación en una pinza de Cornét, y vertí sobre aquella unas gotas de la solución colorante previamente preparada, tenida 1 minuto en contacto, procedí á lavar la preparación con agua destilada, obrando esta sobre el porta por deslizamiento.

Una vez terminado el lavado, trasladé el porta á la estufa á 37 grados para su desecación, la que una vez ya producida, dejo en condiciones á la preparación para llevarle á la platina del microscópio y efectuar la observación morfológica de los vibriones.

Esta la efectué por la combinación óptica, del objetivo de inmersión homogenea 1|12 de Zeiss y el ocular número 3, y una vez iluminada y enfocada la preparación, aprecié la existencia en el campo del microscópio de unos bastoncitos incurvados de diferentes maneras vistos por los movimientos de la platina, que presentaba diferentes campos de observación.

Un cierto número de vibriones se presentaban rectilineos otros siguiendo diferentes graduaciones de curvadura, y otros en fin afectaban la forma típica de la coma ortográfica que caracteriza al gérmen colérico.

Interpretando estas observaciones microscópicas, parece deducirse que en los cultivos de donde procedian estas preparaciones había diferentes formas de vibriones, y que por tanto los gérmenes coléricos observados afectaban diferentes formas.

Pero esta diferente morfología se explica sencillamente

por efecto en la vision, de la manera como se disponen los gérmenes en la preparación, y así observamos que los gérmenes que aparecen rectilineos, y por tanto fuera del concepto morfológico de vibriones, es porque su plano de curvatura es perpendicular á la superficie de la lámina y el ojo nuestro no percibe nada más que la proyeccion sobre el plano de aquella y la curvadura desaparece.

Esto mismo nos podrá explicar las diferentes maneras de aparecer los vibriones respecto á sus grados de curvadura, y hacernos desechar la idea de que en la preparación se encuentren diferentes formas de vibriones, procedente del cultivo utilizado para efectuar la preparación.

Para guardar estas preparaciones, y observarlas posteriormente, procedí al montage de ellas según la práctica siguiente.

Vertí unas gotas de xidol sobre la lámina, haciendoles deslizar, hasta desaparecer el aceite de cedro colocado, para efectuar la observación por inmersión; seguidamente dejé secarse la preparación y una vez así, vertí sobre el centro de la preparación una gota de Bálsamo del Canadá, colocando sobre ella una laminilla cubre, limpia, y trasladé la preparación á la estufa para secar y pegar el cubre, lo que una vez conseguido limpié perfectamente la lámina con el alcohol absoluto y etiqueté la preparación para guardarla.

Método de Nicolle y Morax: Para efectuar este método de coloración comenzé por preparar el reactivo llamado tinta de fuchina, para esto disolvi en 10 cc. de agua destilada 2,50 gramos de tanino y les vertí en una cápsula, seguidamente hice una solución de sulfato ferroso en 10 gramos de agua hasta saturación y la mezclé con el contenido de la cápsula, y despues añadí á esta mezcla 10 cc. de una solución alcohólica saturada de fuchina en frasco cuenta gotas.

La preparación por este método de coloración, la efectué según la técnica siguiente.

Inclinado un tubo de cultivo en agar, tomé con la varilla de platino esterilizada una pequeña porción de siembra é inmediatamente fué diluida en el agua destilada contenida en una capsulita esterilizada, hasta obtener una emulsión absolutamente homogenea y poco enturbiada.

Con una pipeta esterilizada, deposité una gota de esta

emulsión, sobre un porta perfectamente limpio con alcohol, absoluto, una vez depositada la gota incliné el porta en todas direcciones para extender convenientemente el líquido aspirando con la pipeta el exceso que pudiera haber después de estar perfectamente extendido.

Seguidamente fué colocada la preparación debajo de un cristalizador, para buscar la desecación, la que una vez obtenida, procedí á las prácticas de tinción del modo siguiente.

Fué colocado el porta sobre una platina caliente, y vertí sobre esta unas gotas de la tinta de fuchina previamente preparada, y espero hasta la producción de vapores, una vez estos presentados cojo la preparación con una pinza de Cornet y lavo con agua destilada, suavemente, para no arrastrar la capa de microbios.

Vuelvo á colocar la preparación sobre la platina calien te y adiciono nuevamente la tinta de fuchina dejándole hasta producción de vapores, repitiendo igual técnica que digo en el párrafo anterior, y asi hasta 3 veces, después de las cuales, se seca perfectamente la cara inferior del porta y la parte que corresponde á la pinza de Cornet.

Realizado esto, y colocada nuevamente la preparación sobre la platina caliente se le adicionaron unas gotas de la Fuchina de Ziehl anteriormente descrita calentando dos veces hasta la aparición de vapores.

Después bañé con agua destilada guardando las precauciones anteriormente expresadas, y dejada secar la preparación, fué llevada á la platina del microscópio para efectuar la observación.

Esta la llevé á cabo con la combinación óptica 1|12, inmersión homogénea Zeiss y el ocular compensador número 12, apreciando el aspecto morfológico que á continuación desbribo.

Se presentaron los vibriones teñídos en rojo con su forma mas ó menos curvada, y exhibiendo algunos en su parte terminal como una prolongación coloreada en rosa pálido, mas fina que el resto del cuerpo del microbio y que en algunas, esta prolongación era sinuosa en forma de látigo, estas prolongaciones microbianas muy dificil de llegar á ver, son las pestañas del vibrión colérico.

En otras preparaciones procedentes de otros cultivos

de distinta semilla á la observada en las preparaciones anteriores, pude observar con mas facilidad, la existencia de las pestañas, á consecuencia que los gérmenes coléricos aparecían mas redondos, y podía diferenciarse mas exactamente el cuerpo microbiano de su pestaña terminal, lo que le daba un aspecto de morcillón colgado de un hilo.

Esta morfología microbiana del vírgula en estas preparaciones se diferenciaba muy mucho de la que había observado en las preparaciones anteriores; lo que me indujo á pensar en la diferente morfología del vibrión según la procedencia de las dos clases de semillas que tenía para estudio.

Observación directa del gérmen: El procedimiento que he seguido para observar directamente el gérmen sin previa coloración, ha tenido por objeto el acostumbrarme á verle tal como se presenta en los cultivos, afin de poder apreciar su aglutinación microscópica por el método de suero-diagnóstico que expondré mas adelante.

Para esta observación confeccioné la preparación siguiendo el método que á continuación describo, de gota suspendida.

De un cultivo de agua de peptona, previamente agitado, y debidamente inclinado, tomé con una pipeta esterilizada una pequeña cantidad del medio, flameando seguidamente el tubo y guata capuchón al Bunsen.

Sobre un porta perfectamente limpio, vertí en su parte central unas cuantas gotas del contenido de la pipeta, teniendo cuidado de que no se derramen del porta; después con un cubre-objetos limpio, le dejé caer suavemente sobre las gotas vertidas en el porta, de manera que aquél quedase como fiotando en el líquido á observar.

Coloqué el microscópio en posición vertical y quité el condensador Abbe é iluminé con espejo cóncavo, llevando la preparación á la platina, dispuesta para la observación.

Esta la hice con objetivo en seco, percibiendo en la gota pendiente de la preparación la existencia de unos trozos incurvados transparentes, que nadaban en el contenido del porta, y que representaban los vibriones coléricos, desarrollados en el agua de peptona, utilizada para la preparación.

Después de realizada la observación, la preparación fué echada en agua hirviendo para destruir los gérmenes y evitar todo peligro de contagio.

Suero diagnóstico.

Este procedimiento de identificación del gérmen colérico fundado en sus propiedades Biológicas, puede decírse que es la parte mas importante del estudio Bacteriológico del cólera, pues es el que nos pueda llevar por camino mas seguro á la confirmación de los casos sospechosos.

Para su realización, he seguido diferentes procedimientos, todos los cuales requieren previamente la obtención de sueros anticoléricos, por inmunización de animales, la cual he llevado á cabo según las prácticas que seguidamente expongo.

Ante todo empezé por la preparación de las vacunas que me habian de servir para producir la inmunización de los conejos, que sangrados convenientemente, diesen el suero anticolérico, para la práctica del suero diagnóstico.

A este fin, utilizé un cultivo en agar, al cual añadí con las precauciones convenientes, 10 cc. de agua esterilizada efectuando una agitación del tubo para la perfecta disolución de los gérmenes, que había desarrollados en el medio.

Una vez conseguido esto, vertí en otro tubo esterilizado, la solución acuosa de gérmenes coléricos obtenida, llevándole inmediatamente á una cápsula con agua, colocada sobre un hornillo, y sumerjiendo en esta agua el tubo al baño maría, dejándole un rato en ebullición.

Con esto conseguí la destrucción de los gérmenes coléricos contenidos en la solución acuosa del tubo, confeccio-

nando de esta manera una solución de gérmenes muertos, en la cual existian las endo-toxinas de estas, que me habian de servir para las vacunas, afin de producir la inmunidad de los inoculados.

Con esta solución tipo, procedí á la vacunación de los conejos inyectándoles convenientemente y dosificando gradualmente las cantidades de vacunas utilizadas.

A este efecto, empezé por tomar en una jeringa esterilizada provista de aguja de platino iridiado, un centímetro cúbico de la vacuna preparada anteriormente, y asi dispuesta efectué la primera inoculación intraperitoneal en el conejo según la práctica siguiente.

Colocado el animal en un aparato de contención, empezé por lavar el abdomen con agua caliente y jabon efectuando seguidamente una loción con alcohol después con una tijera esterilizada practiqué un pequeño ojal en la piel del vientre, y una vez hecho esto, introduje la aguja de platino hasta pinchar el peritoneo, verificando á continuación la inyección de la dosis de vacuna ya preparada.

A los 6 dias, practiqué otra nueva inoculación en los mismos conejos ya inyectados con la dosis anterior, realizandola por el mismo procedimiento, y utilizando para la inyección 2 centímetros cúbicos de la vacuna preparada anteriormente según dejo dicho.

Transcurrido igual periodo de tiempo los conejos fueron inyectados con 4 centímetros cúbicos y asi lo fueron en veces sucesivas de 6, 8 y 10 centímetros cúbicos, es decir hasta inocular una vacuna constituida por un cultivo entero de gérmenes en agar.

Con este procedimiento de inoculaciones sucesivas y graduales de vacuna anticolérica, llegué á inmunizar los conejos que resistieron esta práctica y digo esto, porque hubo algunos que sucumbieron antes de llegar á terminarla, la que una vez conseguida pude proporcionarme suero anticolérico, para la práctica del suero diagnóstico.

Para la obtención de este suero seguí el procedimiento siguiente: Puesto el animal en un aparato de contención, y fijando con la mano izquierda su torax, busqué el punto del latido cardiaco, y con la mano derecha undí una aguja de platino hasta pinchar el corazón, verificando con la je-

ringa una succión de la aguja extrayendo sangre, no sin grandes dificultades y después de varios intentos de punción.

Una vez recogido unos 10 c c de sangre, fuercn vertidas en un tubo, aguardando la formación del coagulo, del cual fué separado el suero y recogido con una pipeta esterilizada se llevó á otro tubo.

Este le llevé al centrifugador para obtener un suero límpido. y una vez centrífugado fué recogido con una pipeta, para separarle de los glóbulos rojos que estaban en el fondo, y la vertí en otro tubo esterilizado, de donde podría tomarle para la práctica del suero diagnóstico.

Para realizar este empezé haciendo diluciones del suero en agua fiscológica, vertiendo en un tubo una gota del suero en 50 gotas de agua, constituyendo una solución al 1 por 50; despues una gota de suero en 100 de agua haciendo una solución al 1 por 100 y así sucesivamente diluyendo una gota de suero en 500, 1,000 y 2,000 de agua, para soluciones al 1 por 500, por 1 000 y 2 000, sirviendo esto para el estudio posterior, del poder aglutinante del suero según su título de dilución.

Cuanto mayor sea esta, verificando aglutinación de los gérmenes, mas caracter especifico tiene el suero utilizado y por consiguiente mas puede servirnos para llevar á cabo el suero diagnóstico.

Este lo he llevado á cabo siguiendo dos métodos principales, aplicados á la investigación del gérmen en los cultivos, el método macroscópico y microscópico.

Suero diagnóstico macroscópico. Una vez obtenido y preparado el suero anticolérico, se recoge con una pipeta esterilizada, una pequeña porción de las diluciones anteriormente expresadas, y se vierten unas gotas en el centro de un porta perfectamente limpio al alcohol.

Seguidamente tomamos con la varilla de platino esterilizada, una pequeña porción del cultivo, cuyos gérmenes pretendamos identificar, y diluimos esta semilla en el contenido del porta, procurando hacer una mezcla homogenea, restregando la varilla varias veces por el porta.

Dejada la emulsión así obtenida, un rato en reposo observamos el fenómeno de aglutinación, manifestada por la

existencia de unos grumos perfectamente perceptibles, haciendose más con los movimientos del porta, apreciando así como resbalaban estos grumos por la superficie de la lámina.

La aglutinación se va haciendo cada vez mas manifiesta á medida que transcurre tiempo de efectuada la emulsión de los gérmenes, con la dilución del suero anticolérico.

Esta produjo la aglutinación en titulaciones, que anteriormente hemos dicho, produciendo el fenómeno al máximun de dilución obtenida, (1 por 2 000) con el suero de los conejos que llegaron á la inmunización por el máximun de dosis de vacuna inoculada (10 c c.)

Este mismo fenómeno de aglutinación macroscópica, intentado hacer por emulsión de gérmenes coléricos en simple agua fisiológica, sin suero anticolérico, dió un resultado negativo, la que nos sirvió para diferenciar el fenómeno y comprobar la especialidad del gérmen.

Suero Diagnóstico Microscópico. Este método de identificación del gérmen, es uno de los fenómenos más curiosos que he podido observar, pues la aglutinación es perfectamente seguida en la platina del miscroscópio.

Para ello utilizé un cultivo en agua de peptona de los gérmenes sospechosos, y vertí una gota de la dilución del suero anticolérico, agité el tubo para mezclar bíen la mezcla y la llevé á la estufa, por 10 minutos.

Pasados estos, hice una preparación en gota pendiente, de esta mezcla contenida en el tubo, y según ya he descrito anteriormente, trasladando seguidamente la lámina á la platina del microscópio, convenientemente dispuesto.

Entonces observé como los gérmenes, que ví en gota pendiente en el estudio de las preparaciones microscópicas entonces aislados, dispersados por el campo óptico, me aparecian ahora apiñados, formando conglomerados en varios focos, este era un espectáculo, que patentizaba la forma del fenómeno de aglutinación de los gérmenes de Koch en presencia del suero anticolérico y en verdad puedo decir que es un curiosísimo fenómeno, por el cual y gracias á él podemos llegar á identificar el vibrión.

Estos fenómenos de suero aglutinación los he aplicado á los diferentes medios de cultivo que he dejado expues-

tos, y son principalmente aplicables á los medios especiales de desarrollo del gérmen, como el método de Dieudonné ya descrito, del cual se comprueba la calidad del vibrión, por el suero diagnóstico llevado á cabo con la emulsión de las colonias desarrolladas, en la dilución de suero anticolérico apreciando los fenómenos de aglutinación.

Para mayor identificación del gérmen, he verificado después de obtenido el fenómeno de aglutinación macroscópica, una desecación del contenido de la lámina, haciendo una preparación microscópica por el método de Zielh, comprobando en ella la morfología típica del vibrión.

Fundado en las mismas condiciones Biológicas del gérmen (suero-aglutinación) he llevado á cabo también un procedimiento de identificación, que es de una gran importancia en el suero-diagnóstico.

Este procedimiento es el llamado prueba de Pfeifer, la cual es de un gran valor para un diagnóstico precoz de cólera, y que realizada convenientemente nos puede dar mucha luz para este objeto, de la confirmación de un caso sospechoso.

La he llevado á cabo ejecutando las siguientes manipulaciones.

En un conejo inmunizado por las prácticas anteriores, colocado en un aparato de contención, he verificado, según la técnica descrita, una inyección intraperitoneal, de un cultivo de gérmenes en agua de peptona: á los pocos momentos, he hecho una punción en el peritoneo, con succión del líquido peritoneal, por una pipeta, el cual lo he vertido sobre un porta, extendiéndole nuevamente por inclinación; seguidamente he observado la formación de grumos, que denunciaban la aglutinación de los gérmenes que había inyectado, en el peritoneo, producida por las condiciones de inmunidad del líquido peritoneal.

No solamente he obtenido este suero diagnóstico, por este procedimiento, sinó que me ha dado también resultados positivos, según la práctica siguiente.

En un conejo sin inmunizar, he verificado por punción intranperitoneal, la inoculación de un cultivo de gérmenes en agua de peptona, é inmediatamente é inyectado por la misma vía, suero anticolérico.

A los pocos momentos, he verificado una punción intraperitoneal con una pipeta, esterilizada, obteniendo por succión una pequeña cantidad de exudado peritoneal.

He vertido unas gotas sobre un porta, y he comprobado la reacción de aglutinación, de los gérmenes inoculados, por el suero anticolérico inyectado, haciéndose evidente la formación macroscópica de grumos.

Después he llevado á cabo la confección de praparaciones microscópicas, de los dos portas obtenidos en el suero-diagnóstico por estos dos procedimientos, coloreando por el método de Zielh y comprobando en la platina del microscópio, la morfología de los vibriones, que aseguran aún mas su calidad especifica.

Con todas estas prácticas de aglutinación de gérmenes, por los anticuerpos desarrollados en los organismos inmunizados, se puede llegar por buen camino á la comprobación de las condiciones específicas del gérmen colérico, haciendo seguidamente preparaciones microscópicas de la suero-aglutinación, para la apreciación morfológica de los gérmenes aglutinados.

Reacción del indol-nitrosa.

Para la identificación del gérmen colérico, he seguido además de los procedimientos de suero diagnóstico indicados, el llamado "Reacción indol-nitrosa" fundados en sus propiedades Bioquímicas.

Al efecto he preparado primeramente, la fórmula de; peptona 10 gramos, sal marina 5 gramos, nitrato de potasa un gramo, agua destilada 1.000 gramos, alcalinizando esta solución por legia de sosa, llevandole al autoclave á 115 grados para esterilización, repartiendole después en los tubos á sembrar.

En unos de estos he practicado la siembra de las semillas coléricas conservandole en la estufa á 37.° durante *24* horas, pasadas estas, he comprobado el velo superficial del medio, demostrativo del desarrollo del gérmen.

Entonces he vertido en el cultivo 2 centímetros cúbicos de ácido sulfurico puro, y he agitado el contenido del tubo, produciéndose seguidamente una coloración rosada, que á medida que dejé reposar la solución, fué haciendose mas intensa.

Esta curiosa reacción, está fundada, en que al vertér un ácido mineral exentos de productos nitrosos en los cultivos, se forma la coloración roja, porque el vibrión reduce los nitratos formando nitrito y producción del indol, constituyendo la llamada reacción del cólera-roth ó indol-nitrosa.

Con este método de investigación del gérmen colérico, he completado todos los que he seguido en el estudio Bacteriológico del cólera y todos ellos los he aplicado á los

cultivos varios que he obtenido del vibrión, ya indirectamente de las mismas heces sospechosas, preparados como he dicho anteriormente, y he podido comprobar como en todos los medios en donde se encontraba el vírgula de Koch se han producido todas las reacciones de identificación, demostrando así sus cualidades específicas.

Ultimamente he llevado á cabo la investigación del gérmen colérico en las aguas: siguiendo para ello las prácticas de cultivo é identificación del vírgula que ya he mencionado anteriormente: el método que he seguido ha sido el llamado de Metuikoff para el cual procedí en la forma siguiente.

En varios matraces vertí en cada uno de ellos la solución: Agua 50 centímetros cúbicos, Peptona chapoteau 2 gramos, sal marina 2 gramos, gelatina 5 gramos: alcalinizando convenientemente con legía de sosa.

Después introduje en el autoclave los matraces con la solución referida, esterilizándoles á 115 grados durante 10 minutos.

Agregué al contenido de cada matraz, 150 centímetros cúbicos de agua sospechosa, y les llevé seguidamente á la estufa á 37°.

En los matraces que contenían el agua de antemano preparada con el producto de disolución de gérmenes de Koch observé á las 24 horas, la existencia de un velo en la superficie del líquido del matraz.

De este velo superficial sembré varios tubos en agar, y después del desarrollo de las colonias fueron sometidas á la práctica de preparaciones microscópicas, y suero diagnóstico, por los procedimientos que he dejado dichos, pudiendo comprobar la existencia del vírgula colérico en las aguas señaladas.

Con esta investigación del vibrión en las aguas, terminé el estudio Bacteriológico del cólera, y en todas las prácticas que he llevado á cabo, he podido comprobar su eficacia en los resultados, pues con un poco de constancia y con el gran material que he utilizado, he realizado una experimentación, que si yo no he adquirido, ha sido por mis condiciones personales de aptitud.

Consideraciones sobre el Estudio Bacteriológico del Cólera

Después de realizados estos estudios de Bacteriología práctica del cólera, me parece como natural deducción hacer algunas ligeras consideraciones sobre el papel que puedan desempeñar en su inmediata aplicación.

He dejado indicado la marcha seguida, en todas las prácticas de investigación del gérmen colérico, y vemos que todas ellas son de una gran utilidad para los fines del diagnóstico de la infección del Ganges, pero cabe preguntar. ¿Es de un valor decisivo en materia de diagnóstico colérico las prácticas seguidas? Es decir. ¿Puede considerarse que estos procedimientos responden á la urgente necesidad de la declaración de un caso de cólera? Esto es lo que me propongo tratar aquí ligeramente.

La ciencia aconseja que enfrente de un caso sospechoso clínicamente de cólera, se sometan las deyecciones del enfermo á un exámen bacteriológico, y parece decir con esto que este es el modo de resolver rapidamente si el caso de que se trata es ó nó colérico.

A poco que nos fijemos veremos que la identificación del vibrión, se lleva á cabo por varios procedimientos y que unos son complementarios de los otros; asi no podremos asegurar la existencia de un caso de cólera por una preparación microscópica en que comprobemos una morfo-

logía vibriónica, procedimiento el más rápido de investigación.

Tendremos que unir á este las prácticas de suero-diagnóstico, las inoculaciones, las reacciones, Bioquímicas y todos los procedimientos que hemos llevado á cabo en la identificación del gérmen, de lo contrario tomaríamos por colérico, á un simple vibrión intestinal, ó aceptariamos como inofensivo á un vírgula colérico, disimulado ó inapreciado en su acpecto morfológico ordinario.

La práctica del suero-diagnóstico exige el cultivo de los productos sospechosos, el desarrollo de las colonias y ultimamente el aislamiento de los gérmenes contenidos en ella, todo lo cual es forzosamente necesario para poder realizar el estudio Bacteriológico del gérmen y comprobar su especificidad.

Todo esto requiere tiempo y quizás en este transcurrido la clínica nos pueda hablar más rápidamente, y cuando el laboratorio dé su dictamen estar ya resuelta la cuestión con la evolución de la enfermedad sospechosa.

Por tanto parece deducirse que el estudio Bacteriológico del cólera es más bien un estudio experimental que de aplicación á la práctica de la declaración de un caso sospechoso y que por tanto, la idea de que mandando productos patológicos de enfermos, nos dirán rápidamente si es ó nó cólera para tomar nuestras medidas, es total y completamente un sueño.

Hemos de analizar esto, y colocar las cosas en su verdadero lugar, yo creo que es exagerado el creer que una simple preparación microscópica puede desvanecernos la duda del principio de una epidemia colérica, yo creo también exagerado el decir que el estudio Bacteriológico del cólera solo puede tener carácter experimental y nó de aplicación á la práctica de un diagnóstico rápido de cólera.

Creo que reuniendo todo el material de observación podremos sacar convenientes consecuencias encaminadas hacer un diagnóstico rápido de cólera, sacando el mejor partido y á este fin creo útil el procedimiento siguiente:

Conocer los enfermos rodeándose de antecedentes, circunstancias que concurran, y aspecto clínico, proceder á la siembra de las heces en agua de peptona, ya dispuesta y

preparada, como también asi suero anticolérico de poder aglutinante conocido y verificar la reacción de suero-diagnóstico, que puede hacerse á las 10 horas de estar en la estufa el cultivo.

Si esta se verifica con diluciones diferentes de suero á alta titulación y si comprobamos la morfología del gérmen, y comprobamos la reacción neutral-roth y la prueba de Pfeifer, todo lo cual podemos hacer seguidamente por disponer ya de cultivo, habremos diagnosticado el cólera con todos los datos recogidos en el tiempo señalado.

Si este estudio Bacteriológico, parece que no resuelve tan rápidamente como nos haría falta en un estado de ansiedad, la cuestión del diagnóstico precoz, en cambio resuelve, la investigación etiológica de la epidemia, y sobre todo la declaración de sanidad de los puntos infectados, cuando hayan desaparecido por completo los gérmenes de los vehiculos y de los medios que puedan haber mantenido la epidemia.

Es necesario percatarse que la declaración de un caso de cólera es de suma trascendencia, y que por tanto hemos de rodearnos de todas las prácticas de diagnóstico que tengamos á mano para resolver cuanto antes la cuestión, y esto por muy pronto que se quiera hacer con identificación de gérmen, exige por lo menos 10 horas, durante las cuales se desarrolla en los cultivos si es que existe en las semillas.

Con un poco de frialdad y aplomo en el proceder, podremos llegarseguramente á la finalidad, de la identificación del gérmen de Koch en los productos sospechosos, con la rapidez posible y la premura que las circunstancias exijan.

Conclusiones.

De todo lo anteriormente expuesto podemos deducir las siguientes conclusiones, para la identificación del gérmen colérico.

1.º Aspecto de los cultivos.
2.º Preparaciones Microscópicas.
3.º Reacción de suero-diagnóstico.
4.º Reacción de indol-nitrosa.
5.º Fenómeno de Pfeifer.
6.º Inoculación y comprobación experimental, de la clínica del cólera.