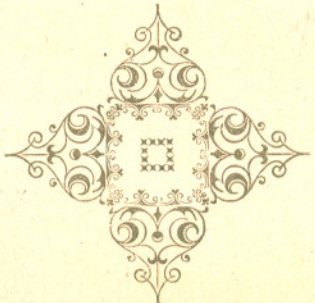


XIII-2-4-2 ~~17-3-10-20~~

fo  
489(2)



ESTUDIOS

SOBRE

EL MICROBIO VÍRGULA DEL CÓLERA

Y

LAS INOCULACIONES PROFILÁCTICAS

POR EL DOCTOR

D. Santiago Ramón y Cajal,

CATEDRÁTICO DE ANATOMÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE VALENCIA.

MEMORIA

presentada á la Excm. Diputación de Zaragoza,  
que comisionó al autor para estudiar la epidemia colérica y dictaminar acerca  
del valor de la profilaxis Ferrán.

Se halla ilustrada con ocho láminas.

ZARAGOZA  
TIPOGRAFÍA DEL HOSPICIO PROVINCIAL  
1885

Fo. 489(2)

ESTUDIOS

SOBRE

EL MICROBIO VÍRGULA DEL CÓLERA

Y

LAS INOCULACIONES PROFILÁCTICAS

POR EL DOCTOR

D. Santiago Ramón y Cajal,

CATEDRÁTICO DE ANATOMÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE VALENCIA.

MEMORIA

presentada á la Excm. Diputación de Zaragoza,  
que comisionó al autor para estudiar la epidemia colérica y dictaminar acerca  
del valor de la profilaxis Ferrán.

BIBLIOTECA UCM



5301486526

ZARAGOZA

TIPOGRAFÍA DEL HOSPICIO PROVINCIAL

1885

## ACTA

de la sesión celebrada el 21 de Julio por la Excelentísima Comisión provincial de Zaragoza:

*En el libro de actas de la Comisión provincial, y en la sesión celebrada en 21 de Julio último, aparece, entre otros, el acuerdo que copiado á la letra es como sigue:*

«Primero. Pasar á D. Santiago Ramón un oficio de aplauso por la notable conferencia que ante la misma dió en la mañana del domingo 19 de Julio acreditando con su vasta erudición que no en vano goza de la fama de eminente micrógrafo.

«Segundo. Publicar por cuenta de la Diputación la Memoria que el mismo ha de presentar en su día sobre estudios micrógrafos del microbio del cólera.»

EL VICEPRESIDENTE,

FAUSTINO SANCHO Y GIL.

x-53-122715-3

HABIENDO tenido la honra de ser comisionado, en unión de mi ilustrado compañero el Sr. Lite, para que diésemos dictamen acerca de la enfermedad á la sazón reinante en Valencia (15 de Junio del 85) y del valor científico de las inoculaciones Ferrán, hice la formal promesa de estudiar á fondo la cuestión á nuestro examen sometida, y publicar en una Memoria el resultado de mis observaciones y trabajos experimentales.

El diagnóstico de la enfermedad epidémica que azotaba la comarca valenciana fué fácil y llano negocio. Tratábase, según nuestro humilde juicio, del cólera morbo asiático, y así tuvimos el honor de exponerlo en tiempo oportuno á la Comisión provincial de Zaragoza. Fundábamos este por entonces atrevido dictamen (no había sido declarado oficialmente el cólera) en observaciones clínicas y trabajos micrográficos practicados, ora en enfermos de Valencia, ora en atacados de las poblaciones circundantes.

Y entendemos que no cabía en este punto la menor vacilación. El origen de la epidemia que arrancaba del foco, oficialmente declarado colérico, que se desenvolvió en Beniopa el invierno pasado; las

invasiones que durante el resto de la misma estación y de la primavera ocurrieron en la huerta de Gandía y pueblos limítrofes; su importación á Játiva, después; su trasmisión posterior en Mayo y Junio á todos los pueblos de la ribera del Júcar; su aparición ulterior en Valencia y propagación á las provincias de Castellón y Murcia; los síntomas que los más de los enfermos revelaban: diarrea blanca semejante al agua de arroz, vómitos de materias claras, calambres, ansiedad epigástrica, afonía, anuria, algidez, cianosis de la cara, hundimiento de los ojos, etc., etc.; y, por último, el carácter contagioso de la dolencia, que se cebaba preferentemente en los individuos de una misma familia y en los que con ésta habían mantenido relaciones, todos estos datos deponían con tanta fuerza en pró de nuestro diagnóstico que, ni por un momento, abrigamos la menor incertidumbre.

Bien pronto (Julio del 85) había de extenderse la epidemia por las más de las provincias españolas: Murcia, Alicante, Madrid, Teruel, Zaragoza, Huesca, Tarragona, Soria, Navarra, etc., etc., fueron diezmadas por el azote.

Con la extensión de la epidemia nuestro campo de experiencias se ensanchó considerablemente, y así pudimos estudiar y comprobar á orillas del Ebro y del Gállego los mismos hechos que habíamos observado en las del Turia, y echamos de ver que el bacilo vírgula recogido en Valencia ofrecía las mismas propiedades morfológicas y patogénicas que el adquirido en Zaragoza; prueba palmaria de su

identidad y de su constante existencia en el cuerpo de los coléricos.

Si fácil fué hacer el diagnóstico de la enfermedad reinante, no lo fué tanto cumplir con el otro extremo que abrazaba el deseo de la Excma. Diputación aragonesa, á saber: emitir dictamen respecto al valor profiláctico de la vacuna Ferrán.

Los líquidos de inoculación utilizados por el médico tortosino son cultivos en caldo del bacilo vírgula hallado por Koch en las deyecciones coléricas. Por lo tanto, el empleo de aquel micrófito como vacuna supone el hecho de que el expresado parásito es la causa del cólera morbo, opinión no por todos aceptada y por histólogos y microbiólogos distinguidos duramente combatida.

Era preciso, por consecuencia, á fin de que nuestro juicio alcanzara algún valor científico, comenzar por indagar si en las deyecciones características de los atacados del cólera existe realmente el mencionado micrófito, acompañando única y exclusivamente á esta dolencia, y si aislado y conservado vivo por los cultivos es susceptible, por inoculaciones practicadas en los animales, de ocasionar siempre la afección colérica; para venir después á deducir, habida cuenta de las condiciones de vida del microbio, la posibilidad de su atenuación y de la producción de cóleras experimentales inofensivas, capaces de preservar al organismo de un ataque natural de cólera morbo; y aquilatar, por último, caso de ser posible la vacuna, hasta qué punto la descubierta por el Dr. Ferrán es racional y legítima, y

se basa en hechos clínicos y experimentales suficientes: estudios prolijos, difíciles, que exigen, á parte de no menguadas condiciones materiales, un dominio absoluto de los métodos de la moderna bacteriología, dominio que estaba bien lejos de poseer el que esto escribe, atraído por antiguas é imperativas aficiones al rico campo de la histología.

Comenzamos, pues, por practicarnos en el manejo y esterilización de los caldos, por adquirir el hábito de los cosecheros de microbios, por hacer pipetas, esterilizar matraces, construir estufas, preparar y teñir bacterias, por adquirir, en fin, esa educación técnica en todas las artes indispensable, cuanto más en el difícil arte del panspermícola.

El resultado de las modestas experiencias que durante cuatro meses de asiduo trabajo de laboratorio hemos practicado, con la exposición clara y resumida de los medios técnicos utilizados con tal objeto, formarán la materia del presente opúsculo.

En él hallarán los médicos prácticos, que por las apremiantes exigencias de su profesión no puedan hacer un estudio profundo de los gérmenes patógenos, igualmente que los aficionados que dan los primeros pasos por esta fecunda vía, reglas seguras y sencillas para diagnosticar el cólera por medio de la investigación del microbio, y todos los detalles operatorios principales de los métodos corrientes de la bacteriología. Daría por bien empleada mi tarea si alcanzase á generalizar un tanto estos conocimientos que, á no dudarlo, llevan el germen de una revolución grandiosa en medicina y de un

progreso notable en la higiene y en la terapéutica.

No debo concluir sin expresar aquí públicamente el más sincero agradecimiento á la Excm. Diputación de Zaragoza, que animada de un espíritu de progreso poco común, nõ tan sólo envió de las primeras sus representantes científicos al campo de la epidemia colérica, sino que premió con creces mi trabajo, con valer tan poco, y no escatimó medio material ninguno para que éste fuese lo más completo posible. No será, pues, culpa suya si, en el desempeño de mi cometido, he incurrido en errores y deficiencias; estos son naturales frutos de mi inexperiencia, y del escaso tiempo de que he dispuesto para investigaciones que reclaman largos meses de continua y empeñadísima labor, amén de inteligentes y asiduas colaboraciones.

# PRIMERA PARTE

---

## ESTUDIO ANATÓMICO Y FISIOLÓGICO

DEL BACILO VÍRGULA.

---

### CAPÍTULO PRIMERO.

INVESTIGACIÓN DEL BACILO EN LAS DEYECCIONES DE LOS ENFERMOS.

Sabido es que, desde los notabilísimos trabajos de Koch y los de sus principales discípulos, repútase un pequeño bacilo incurvado, el bacilo vírgula, como el agente específico del cólera. Supónese que este microfito habita naturalmente las aguas estancadas del delta del Ganges, desde las que pasa por medio de los alimentos y bebidas al intestino delgado del hombre, donde á beneficio de la alcalinidad del jugo intestinal halla un favorable terreno de cultivo. En prueba de esto afirmase que el bacilo vírgula no falta jamás en las deyecciones blancas características del cólera, mostrándose en estado de cultivo casi puro en el líquido intestinal de los individuos muertos de la variedad fulminante.

De ser cierta esta aserción, el hallazgo del bacilo vírgula en las cámaras sospechosas de un enfermo revestiría el valor de un signo patognomónico del cólera, pudiéndose excluir este diagnóstico en todos aquellos casos en que la exploración bien conducida de las heces diera resultados negativos.

Sobre este punto versaron nuestros primeros trabajos. Al emprenderlos, tratábamos no sólo de fijar el valor diagnóstico del bacilo vírgula, sino también obtener cultivos puros de este microfito, con ánimo de estudiar á fondo sus propiedades fisiológicas y patogénicas.

Las primeras deyecciones examinadas procedían de una enferma de la calle de Entenza (Valencia), muerta con todos los síntomas del cólera morbo.

Las deyecciones, recogidas en un tubo de ensayo cuidadosamente cerrado, eran de aspecto seroso, turbias, inodoras, de un color ligeramente rosáceo, por causa quizás de alguna hemorragia intestinal ligera, y tenían en suspensión unos copos blanquecinos y esponjosos.

Dejáronse reposar estas deyecciones en posición vertical por espacio de doce horas: al cabo de este tiempo el contenido del tubo dejaba distinguir dos zonas superpuestas: una inferior ocupada por los copos blanquecinos precipitados, y otra superior transparente y líquida. Esta última zona, aunque diáfana, presentaba cierta turbidez indecisa, que no desaparecía por el reposo, antes bien acrecía, sobre todo cerca de la superficie libre donde se mostraba una tenuísima película grisácea. Semejante turbidez, que recordaba la que es característica de los caldos en fermentación, nos hacía presumir ya la existencia de algún schizomiceto.

Tomóse entonces con la punta de una aguja de platino una partícula de la casi invisible cutícula flotante, y extendióse rápidamente sobre un porta-objetos; agitóse éste después para acelerar la desecación del preparado y, una vez seco, impregnóse con una gota de solución de violeta de dália en agua de anilina. Teñida la preparación (lo que se consigue en menos de un minuto), sumergióse bruscamente el porta-objetos en agua común, agitándole por algunos instantes á fin de arrastrar el exceso de materia tintórea. Volvióse á secar la preparación, también espontáneamente, y montóse en una solución de mastic y goma copal en la bencina.

Examinadas las preparaciones de esta suerte ejecutadas bajo un buen objetivo de inmersión, pudieron descubrirse multitud de bacilos resaltantes por su color violeta oscuro sobre el fondo incoloro del cristal y bien separados entre sí. (*Fig. 1.<sup>a</sup>*)

Su forma era en todos análoga: rectos, pero con una ligera incurvación por un lado, corvadura variable entre un semicírculo y menos del arco de un cuadrante. Aunque esta forma arqueada ó de comilla dominaba realmente en el campo de la preparación, existían otras también: la rectilínea, la en *S*, la de gancho, las cadenas ó trenes de comas, y más rara vez el espirilo.

La rectilínea es simple apariencia debida á la posición de la bacteria sobre el cristal: es claro que si el vírgula yace acostado, bien por el lado de su convexidad, bien por su concavidad, será imposible percibir la figura arqueada, en tanto que la flexión será muy perceptible si, como en general ocurre, el bacilo descansa de perfil.

La forma en *S* representa en realidad un vírgula doble en vías de partición ó de desarrollo espirilario.

Los puntos teñidos redondos ó levemente alargados, parecen ser vírgulas de punta ó quizás también comas enanos en vías de evolución.

Muy rara vez se descubren espirilos en las deyecciones: cuando los hay se presentan bajo la forma de espirales cortas, de tres ó cuatro vueltas, cada una de las que representa un verdadero coma.

Existen espirilos en que no es posible observar los puntos de unión de los vírgulas, es decir, que no presentan señal alguna de segmentación. Pero no es raro ver algunos en donde los extremos de cada bacilo se marcan por trazos incoloros. Estos son las cadenas de vírgulas frecuentísimas en los cultivos en gelatina y representantes de la transición evolutiva del espirilo al vírgula.

El espesor de los bacilos es de media milésima y su longitud de menos de tres: su diámetro es sensiblemente igual en toda su longitud; pocas veces aparece más grueso en los cabos que en el medio. Sus extremidades son redondeadas, como la punta de un agitador de cristal, y bajo grandes ampliaciones ( $\frac{1}{18}$  Zeiss con Oc. 4) descúbrese en ellas finísimas pestañas, semejantes á la

cola de un zoospermo, destinadas indudablemente á servir de remos al microbio en sus rápidos movimientos de traslación.

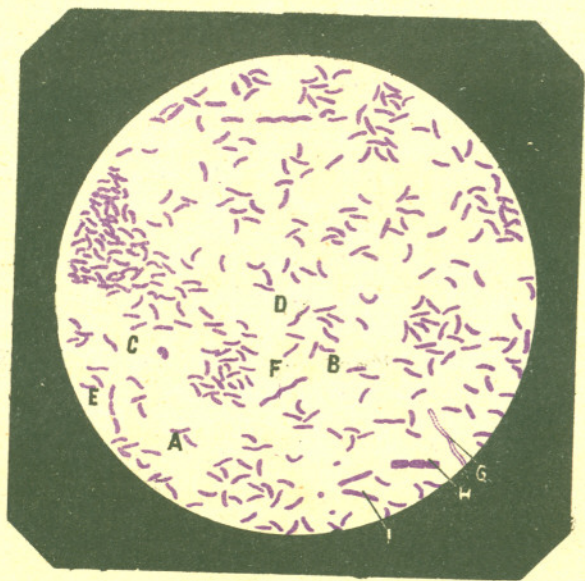


Figura 1.ª Bacilos, vírgulas procedentes de las deyecciones de un colérico.—Preparación teñida por el violeta de dalia y conservada en el barniz damar á la bencina.—A, vírgulas característicos; B, bacilos aparentemente rectos por razón de su posición; C, bacilos arrugados; D, doble coma ó bacilo en S. E.; cadenas de vírgulas; F, espirilo corto; G, espirilos pálidos normales en las deyecciones; I, bacilo alargado; H, rosario de bacterias gruesas.—Aumento: 1.100 diámetros.

Aunque lo más común es que los vírgulas estén dispersos y aislados en el porta-objetos, muéstranse á veces acumulados en masas irregulares, que la coloración convierte en espesas manchas violáceas granugientas. Son estas manchas pedazos del micoderma que los bacilos constituyen en la superficie de las deyecciones, y forman en la preparación islotes de varia extensión.

Por último, descubriáanse también en el preparado algunos, aunque pocos, bacilos rectos, de varía longitud, unos espirilos muy pálidos y de anchas vueltas, idénticos, al parecer, á los que habitan en la boca, rosarios de gruesos y cortísimos bacilos, y ciertos cocos y bacterias que normalmente viven en las heces. Estas formas son muy abundantes en las deyecciones que han

sido abandonadas al aire por uno ó dos días, y han sufrido un comienzo de descomposición.

Tal fué el procedimiento seguido en este nuestro primer examen y tales los resultados obtenidos.

Además de este proceder, que ulteriores experiencias nos han demostrado ser el más útil de todos, hemos aplicado también otros métodos más expeditos y sencillos.

Uno de ellos es el examen de una gota de las deyecciones en la cámara húmeda y caliente. Hé aquí cómo se procedió: sobre una cámara húmeda porta-objetos, se depuso una gota de deyecciones frescas, cubrióse con una laminilla, y se insinuó después el preparado en la cámara caliente de Ranvier á fin de obtener una temperatura de 37°.

Al examinar la preparación bajo un aumento de 800 diámetros y á la luz artificial, pudimos observar el bacilo vírgula vivo, con los mismos caracteres morfológicos que acusan las preparaciones secas y teñidas, sólo que nos parecieron algo mayores, y menos acentuada la corvadura.

Llaman la atención sobre todo en estas preparaciones los movimientos espontáneos de los bacilos, movimiento por cuya virtud se trasladan de un punto á otro del campo del microscopio, y se desfocan continuamente, pasando de un plano á otro del líquido. La posición vertical que algunos toman les da la apariencia de puntos oscuros ó brillantes, que pudieran confundirse en un ligero examen con cocos ó bacterias.

Es de notar, que no todos los vírgulas que en el campo se descubren gozan de espontánea movilidad; los procedentes de la parte líquida de las deyecciones, situada por debajo del micoderma, muestran vivacidad notable, en tanto que los vírgulas del mismo micoderma, como si una sustancia gelatinosa los prendiera, ó hubieran sufrido por el contacto del aire un principio de desecación, permanecen absolutamente inmóviles.

En una preparación hecha de esta suerte, pudimos observar durante dos ó tres días los movimientos de los comas, y asistimos al espectáculo de la excisión de algunos bastoncitos en S, y disociación de cadenas. Mas no pudimos en todo este tiempo sorprender la formación de espirilos, ni menos advertir la presencia de formas nuevas con tendencia á la producción de esporos.

Otro de los procederres utilizados para evidenciar la presencia

de los vírgulas en las deyecciones consistió en el empleo de la fuchina, violeta de metilo, violado de anilina, etc., disueltos simplemente en agua común.

El *modus operandi* se reduce á agregar al borde de una preparación fresca, con vírgulas vivos, una gota de cualquiera de las soluciones precedentes. El líquido, penetrando por capilaridad entre las dos láminas, invade el campo de la preparación, tiñendo instantáneamente con gran intensidad todos los micrófitos que encierran las deyecciones sin que cesen por ello sus movimientos espontáneos.

Con este proceder se descubre mejor la forma arqueada de los comas y se comprueba que el parásito en cuestión es un bacilo homogéneo, terso de superficie y algo mayor que el observado en las preparaciones desecadas.

En todas las preparaciones descritas, las materias examinadas se tomaron de la capa superior de las heces, la cual es más rica que ninguna en coma-bacilos. Como el Dr. Ferrán ha hecho notar por primera vez, si en lugar de practicar inmediatamente el examen de las heces, se las conserva á temperatura conveniente por algunas horas, el bacilo vírgula que es aerobio prolifera abundantemente en la superficie en contacto del oxígeno del aire, en tanto que arrastra una vida lánguida y miserable en las capas profundas, donde no puede soportar la concurrencia vital de otras especies anaerobias que encuentran allí su mejor campo de cultura. Hé aquí porqué nosotros tomamos siempre la semilla del coma de la superficie del líquido ó de las capas inmediatas. En las capas profundas la hemos obtenido también, igualmente que en los grumos mucosos y epiteliales en suspensión, pero siempre menos abundantemente.

Como se ve por lo expuesto, nuestras primeras tentativas fueron coronadas del mejor éxito, y los resultados obtenidos confirmaron plenamente el descubrimiento de Koch. Mas sospechando que quizás se tratase en estos ensayos afortunados de un simple hecho de coexistencia frecuente, mas no general, nos propusimos multiplicar todo lo posible nuestras indagaciones, haciéndolas recaer en cámaras coléricas de distintos enfermos y de diversas localidades. A este fin fueron exploradas más de treinta deyecciones de varias procedencias, unas de enfermos de Valencia, otras de Alcira y Alghemesí, otras de coléricos de Zaragoza, y en to-

das partes, con una constancia admirable, acertamos á comprobar la existencia del coma-bacilo de Koch, revelándonosnos siempre con iguales propiedades en los cultivos y en las experiencias de inoculación.

Sin embargo, en varias deyecciones indudablemente coléricas no nos fué posible tropezar con el vírgula. Pero aun en estos casos los resultados estuvieron en armonía con los anunciados por el bacteriólogo alemán.

El primer caso en que no nos fué dado hallar los vírgulas, al menos en la cantidad y condiciones necesarias para impresionar la vista y hacerse sensibles por los cultivos, fué en unas deyecciones procedentes del Hospital de coléricos de Valencia. Tratabase de unas cámaras blancas, características, recogidas de dos enfermos atacados de cólera confirmado. El aspecto macroscópico no dejaba lugar á duda alguna: apariencia de agua de arroz, grumos blancos acumulados en el fondo, semitransparencia de la parte líquida. Pero cuando fueron examinadas al microscopio no revelaron sino una cantidad notable de bacterias (quizá el *bacterium termo*) y muchos bacilos y diplococos. El cultivo en las placas de la gelatina fué completamente infructuoso. Más tarde averigüé que aquellas deyecciones tenían dos días de fecha, y colegí que estaban en descomposición, cosa por otra parte fácil de sospechar por el olor á putrefacción que desprendían. Sabido es que cuando un caldo que contiene vírgulas, entra en descomposición, numerosas bacterias invaden el terreno, y el coma, que ve mermadas las sustancias nutritivas de que se alimenta, muere y se destruye, probablemente á causa de un envenenamiento por las ptomainas de la putrefacción.

En tres ocasiones más no fueron hallados tampoco al microscopio, pero fueron denunciados por los cultivos: procedían estas deyecciones de enfermos con señales de reacción. Y por último, en un caso de San Juan y en dos de Zaragoza, unas deyecciones ligeramente teñidas por la bilis tomadas de coléricos con síntomas incipientes, no dieron, ni por los cultivos, ni por la exploración micrográfica directa, el menor vestigio de vírgulas.

Resulta, pues, de mis experiencias que el bacilo vírgula de Koch acompaña ordinariamente á las deyecciones blancas de los coléricos; pero que falta con frecuencia en las cámaras del periodo de reacción, en las heces características expuestas algunos días

al aire, y en las primeras deyecciones todavía biliosas de la diarrea premonitoria.

A guisa de contraprueba, hemos buscado el vírgula en las cámaras de enfermos afectados de diarrea crónica, de enteritis catarrales, disenterías, etc., y jamás nos ha sido dado obtener una forma bacilaria que se comportara en los cultivos del mismo modo que el parásito descubierto por Koch. Brilló igualmente por su ausencia en un caso confirmado de *cólera nostras*, en donde no me fué posible encontrar tampoco el pretendido bacilo específico de esta dolencia, descrito por Finckler y Prior.

Por el contrario, es facilísimo de hallar en las deyecciones precedentes de enfermos atacados del cólera fulminante. En un caso en que el enfermo murió á las cuatro horas de atacado, después de haber tenido una deyección serosa copiosísima, encontré el coma tan abundante que semejaba un cultivo puro. Sin embargo, no resultó el vírgula en estado de absoluta pureza, como lo acreditaron siembras en caldos y gelatinas practicadas con estas deyecciones.

Y, sea dicho de pasada, por puras que las deyecciones aparecen, nunca se obtienen cultivos puros de comas en caldo y gelatina por este proceder de siembra directa; al lado de estos bacilos se desarrollan siempre otras formas, que, aunque escasas al principio, concluyen por invadir el terreno y destruir el vírgula (1).

Cuando se siembran estas deyecciones en la gelatina en tubo, fórmase al principio el embudo característico, pero la fugacidad de la burbuja, la turbidez del líquido y la pronta liquidación de la gelatina, anuncian claramente la presencia de otras bacterias. Un cultivo en serie sobre tubos de gelatina, da por resultado la desaparición del vírgula antes de la cuarta generación. Más adelante insistiremos sobre estos hechos, y daremos las reglas necesarias para obtener los cultivos puros del vírgula. Baste por ahora esta nuestra afirmación de que jamás en las deyecciones habita una sola forma; cosa por otra parte muy fácil de comprender

(1) No sin extrañeza, hemos leído en la Memoria presentada por el ilustrado Dr. García Solá á la Diputación granadina, que había obtenido cultivos puros de las mismas deyecciones. Sin negar el hecho, sólo diremos que en nuestras manos y después de probar este proceder de siembra muchas veces, jamás hemos conseguido resultados satisfactorios.

desde que sabemos que el intestino es un terreno donde habitualmente viven numerosas especies de bacterias.

El método de preparación y montaje de los micrófitos de las cámaras coléricas tiene decisiva influencia en el éxito.

En general, todos los procederes que tienen como base el uso de varias sustancias colorantes muy diluidas, las cuales actúan sólo por impregnaciones prolongadas, son defectuosos. Estas maceraciones tan largas concluyen por desprender la capa de micrófitos que está tenuemente adherida al porta-objetos. Son también inútiles y engorrosas las materias decolorantes y fijadoras que ciertos bacteriólogos recomiendan, como el bicloruro de mercurio, el agua yodada, el ácido nítrico diluido, el clorhidrato de alcohol, etc.

El proceder que nosotros aplicamos es extremadamente rápido y sencillo. Descansa en el hecho de que, si se emplean sustancias colorantes muy concentradas y afines de los micrófitos, la tinción tiene lugar instantáneamente, y el agua común, que en otras ocasiones decoloraría demasiado, obra en estos casos descartando no más el exceso de materia tintórea, y reservando el color en el protoplasma de los micrófitos.

Aunque ya hemos descrito á grandes rasgos nuestro *modus operandi*, no será quizás inoportuno detallar aquí un tanto más el manual operatorio, reduciéndolo á un corto número de reglas. Así podrán los debutantes en estos estudios, entrar en posesión de un método sencillo y práctico para denunciar el vírgula en las deyecciones y preparar toda clase de microbios en suspensión en los líquidos.

1.º Recójense deyecciones coléricas frescas, con aspecto de agua de arroz, en un ancho tubo de ensayo, ó mejor en un pequeño y amplio matraz herméticamente cerrado con un tapón de *caoutchouc* ó con un copo de algodón esterilizado. Conviene, si se emplea un tubo de ensayo, dejarle reposar en posición oblicua á fin de que la capa de micoderma sea más extensa. Las deyecciones permanecerán en quietud durante doce horas bajo una temperatura de veinte grados ó más. En invierno será precisa una estufa ó incubadora; en el verano basta la temperatura ordinaria.

Teniendo cuidado de recoger las deyecciones muy frescas y de no remover el tubo continente, el micoderma de vírgulas se conservará en buen estado para extraer semilla durante ocho días.

2.º Tómese con una aguja una tenue partícula de la capa

micodérmica, igualmente que del líquido subyacente, y extiéndase rápidamente sobre el porta-objetos.

3.º Seca espontáneamente la preparación, trátase por una gota de un líquido resultante de la mezcla de estos otros dos:

*Solución 1.ª* Agua común, 30.—Aceite de anilina (á saturación).

*Solución 2.ª* Alcohol, 8.—Violeta de dalia (á saturación).

4.º Decolórese por agitación del porta-objetos en el agua pura: esta maniobra no debe prolongarse más de 4 á 6 segundos.

5.º Nueva desecación espontánea lograda colocando el cristal oblicuamente junto al muro con la preparación hácia abajo, para evitar que se ensucie el porta-objetos con el polvo.

6.º Montaje en el barniz siguiente:

Bencina anhidra.....	90
Mastic en lágrimas.....	25
Goma copal.....	25

Este barniz debe prepararse con anticipación, juntando las resinas pulverizadas á la bencina y agitando de tiempo en tiempo. A los pocos días habrá obtenido el barniz toda su transparencia; y se decantará en un frasco limpio y seco. Su consistencia debe ser siruposa.

Este barniz tiene la preciosa propiedad de respetar los colores de las anilinas usados para teñir los microbios; al contrario del bálsamo del Canadá tierno ó en solución clorofórmica que á la larga concluye por decolorar las preparaciones. Posee además la ventaja de secar con más facilidad que los anteriores, y ser muy cómoda su aplicación. Puede usarse también el bálsamo del Canadá seco (es decir, privado de su aceite esencial por el calor), pero su aplicación es más difícil y engorrosa. (1)

## CAPÍTULO II.

### RECONOCIMIENTO DEL BACILO VÍRGULA POR MEDIO DE LOS CULTIVOS.

Cuando un bacilo prepondera en un líquido patológico, el examen de su forma, dato principal que el microscopio nos suministra, puede bastarnos para fijar la especie bacteriológica; mas tal examen es poco ó nada demostrativo si el microbio se halla en minoría respecto de otras bacterias concurrentes en el mismo terreno; tal sucede con los vírgulas de las deyecciones del período de la reacción, y con estos mismos parásitos cuando pululan en

(1) Véase mi Manual de Histología y Técnica, pág. 121.

las aguas estancadas. La dificultad del diagnóstico morfológico nace en estos casos de que un micrófito cualquiera puede, por virtud de la desecación ó por azares operatorios, adquirir accidentalmente la forma y tamaño de la especie que inquirimos; así en las aguas y en las mismas deyecciones normales se encuentran accidentalmente formas en vírgula que podrían confundirse con el microbio colerígeno.

Aparte de esto, la configuración arqueada no es privativa del microbio descubierto por Koch; existen bacilos normalmente encorvados pertenecientes á otras familias, por ejemplo: el de la saliva de Lewis, los del queso, los que pululan en las aguas estancadas, el pretendido parásito del *cólera nostras* de Finckler y Prior, y, en general, todos los *espirochetos* fragmentados.

Es preciso, pues, para evitar bochornosas equivocaciones, acudir á caracteres más fijos, á rasgos más específicos que los que nacen de la consideración anatómica de la forma: estos nuevos y más valiosos datos nos los suministra la evolución de los micrófitos y especialmente su comportamiento en los cultivos.

Cada especie de microbio ama un campo de cultivo y muere ó languidece en otros: unos colonizan rápida, y otros se instalan lenta y modestamente dentro de un mismo terreno: los hay que pululan y medran á bajas, casi glaciales, temperaturas, y existen especies de invernadero que sólo se desarrollan bajo un calor superior á 30º centígrados. Varía también la forma de las colonias en los terrenos sólidos de cultivo, según las distintas especies, así como la manera de comportarse el huésped con el material químico que le sirve de albergue y alimento: quienes derriten la materia semisólida del medio para digerirla después, quienes se limitan á explotarla sin destruirla. Este conjunto de caracteres es de la mayor importancia en la determinación específica de los micrófitos, y en él se basan de preferencia los bacteriólogos para deslindar las familias más afines.

### A—CULTIVO DEL BACILO VÍRGULA EN LAS PLACAS DE GELATINA.—OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS.

Entre todos los recursos analíticos con que en estos últimos años se ha enriquecido la técnica bacteriológica, ninguno tan interesante y principal como el que tiene por fin la obtención

de cultivos puros de cualquiera de las formas vivas existentes en los líquidos patológicos. Esta purificación de una especie de parásitos es de todo punto precisa, tanto para el estudio del desarrollo ulterior de los mismos, como para la investigación, á favor de inoculaciones en los animales, de las virtudes patógenas que poseen.

Comó es sabido, el principio de la purificación de los cultivos consiste en la dilución de una partícula de sustancia sospechosa en abundante cantidad de líquido inerte, á fin de que cada gota de éste no contenga aproximadamente más que un solo microfito; por manera que si sembramos una de estas gotas portadoras de un solo germen en un terreno apropiado, es decir, virgen de toda vegetación, podremos esperar fundadamente la obtención de una cosecha pura, ó, en otros términos, un cultivo en que todas las formas existentes sean iguales como descendientes que son de una sola semilla.

El terreno donde la siembra se verifica puede ser líquido, y entonces se procede de suerte que llegue un solo germen al campo de cultura (método de Pasteur); pero puede ser así mismo de consistencia sólida ó semilíquida, en cuyo caso no importa que germinen muchas semillas sobre el terreno, pues cada una de ellas constituirá una colonia particular distinta de las otras, impidiendo la fijeza del soporte nutritivo la confusión y mezcla de las formas (método de Koch).

Este último método es el que exclusivamente hemos usado. Lleva al de Pasteur la ventaja, cuando se trata de formas capaces de vivir en las sustancias orgánicas semisólidas, de ser de más expedita aplicación y de proporcionar en la distinción de las especies mayor suma de caracteres, por ejemplo: la forma de la colonia, su estructura, el tiempo de su aparición, modificaciones químicas del medio, etc., etc.; rasgos que no puede darnos el cultivo en los terrenos líquidos.

Hé aquí de qué suerte hemos procedido en la aplicación del método de Koch:

Comenzamos por impregnar una aguja fina de platino recién llameada en la película micodérmica de unas deyecciones ricas en vírgulas, y diluimos rápidamente los gérmenes tomados en quinque centímetros cúbicos de agua esterilizada encerrada en tubo de ensayo. Momentos después, y previa agitación del líquido para diseminar los gérmenes por igual, tomamos con la misma aguja

caldeada otra pequeña parte de esta mezcla, sumergiéndola *incontinenti* en diez centímetros cúbicos de gelatina esteril, también conservada en otro tubo tapado con algodón (véase más adelante la preparación de la gelatina y su conservación en tubos), y vertemos después el licor gelatinoso, en cuyo seno están dispersos los gérmenes, sobre un cristal esterilizado puesto sobre hielo, á fin de que la coagulación de la gelatina tenga lugar inmediatamente. El espesor de la capa no pasa de dos á tres milímetros. Coagulada la gelatina, se guarda la placa, con la cara vuelta arriba, dentro de una cámara húmeda y bajo una temperatura que no baje de 18°, ni exceda de 25°. La gelatina puede también depositarse en un pequeño matraz de fondo plano y de ancha boca perfectamente esterilizado y tapado: operando así se simplifica la maniobra, pues no son necesarios ni el hielo para coagular la gelatina, ni el nivel para el cristal, ni la misma cámara húmeda, consiguiéndose además otra no despreciable ventaja, y es la de poder ser eliminados por completo los gérmenes del aire dentro del recipiente en que la gelatina se deja coagular. Para conseguir esto último, basta someter el matraz con la gelatina antes de la siembra á una temperatura de 100°, sostenida por algún tiempo.

Suponiendo que todas las operaciones precedentes se hayan conducido bien, á las 36 horas de reposo aparecerán á la simple vista las colonias del coma-bacilo, suficientemente aisladas y puras para obtener semilla. Pero sucede, á veces, que la placa se cubre prontamente de infinito número de colonias de especies diversas, fundiéndose el terreno y confluendo las excavaciones gelatinosas en largos canales sinuosos. Tan grave defecto imposibilita la obtención de semillas puras y nace, bien del exceso de gérmenes sembrados, bien de la insuficiente esterilización del agua y tubo donde las siembras tuvieron lugar y, algunas veces también, de la descomposición de la gelatina por defecto de antisepsia. El aire que rodea á la placa toma muy poca parte en estos graves trastornos, pues de ordinario los gérmenes atmosféricos depositados sobre ella son escasos, y casi todos carecen de la virtud de liquidar la gelatina, correspondiendo los más á los mohos vulgares, cuyo desenvolvimiento es lento y apenas daña á la integridad y desarrollo de las colonias del coma-bacilo. El defecto de esterilización del agua es una causa perturbadora mucho más temible; se anuncia por la aparición precoz de multitud de colonias de bacterias y cocos que liquidan la gelatina de una vasta extensión, agotando el terreno en menos de 36 horas. La falta de esterilización de la gelatina se da á conocer por la aparición, antes de las 24 horas (de 20° á 28°), de infinidad de burbujas y manchas que prestan al todo un aspecto sucio y granuloso, y, además, por un olor bastante pronunciado á putrefacción. En previsión de este fracaso, nosotros solamente utilizamos para la siembra en

placas aquellos tubos de gelatina que, tras 10 días de reposo, permanecen sin la menor alteración.

### Caracteres de las colonias del coma-bacilo.

**1.—Aparición** Comienzan á ser visibles al microscopio á las 20 horas de efectuada la siembra. Para observarlas, no es precisa preparación preliminar; basta colocar la placa en la platina del microscopio, y explorar la superficie de la gelatina con un aumento que no exceda de 100 diámetros.

El carácter aerobio del coma-bacilo explica bien el que solamente se formen las colonias en la superficie atmosférica del terreno de cultivo.

Hasta las 24 horas no son las colonias del coma perceptibles á la simple vista: entonces producen la impresión de pequeñísimas depresiones brillantes. Pero sólo á las 30 horas es cuando se advierten claramente: alcanzan á la sazón un milímetro de diámetro. (Fig. 2, A.)

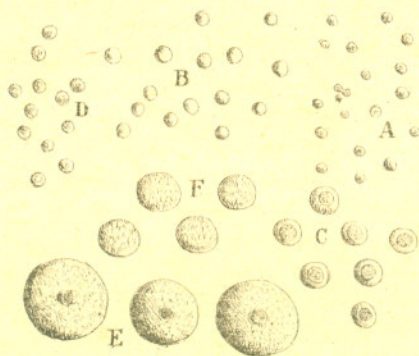


Figura 2.ª. Tamaño macroscópico comparado de diversas colonias de microfitos susceptibles de liquidar la gelatina, observado á las 36 horas de la siembra.—A, colonias del coma-bacilo; B, colonias de una bacteria de lento desarrollo que se parece al vírgula en la disposición de su burbuja; C, colonia de cocos; D, colonia de cocos que segregan un pigmento rosa y producen una burbuja muy aparente; E, bacteria que derrite rápidamente la gelatina; F, colonias de bacilos muy invasoras y transparentes.

El crecimiento de la colonia marcha con parsimonia relativa-

mente á la rapidez con que otros microbios evolucionan en el mismo medio; su diámetro escasamente llega á dos milímetros á las 36 horas y á cuatro á las 48. En este grado de evolución es cuando todos los caracteres macroscópicos se ostentan con claridad y resultan igualmente fáciles, tanto el reconocimiento de la colonia del coma, como la obtención de semillas para las siembras.

Esta lentitud en el desarrollo del vírgula es uno de los signos diagnósticos más importantes de su especie. En general, *toda colonia que sea visible con evidencia antes de las 24 horas no pertenece al coma-bacilo*. Casi todos los microfitos de las aguas, y deyecciones que comparten con el vírgula la virtud de liquidar la gelatina y constituir excavaciones en ella, se separan de él por la precocidad de su desarrollo, que es tal que, mucho antes que las colonias del coma se revelen, ya han invadido y esquilmo casi todo el terreno de cultivo. Por esta razón es preciso, cuando surge en la placa una de estas especies invasoras, aniquilarla con un líquido antiséptico ó arrancar la gelatina á su alrededor.

**2.—Forma de la colonia al microscopio.** Es preciso distinguir aquí: la colonia propiamente dicha, constituida de una tribu apretada de comas, y la zona de licuación producida en las inmediaciones. De ésta nos ocupamos más adelante.

Examinada *la colonia propiamente dicha* á débiles aumentos y en el momento en que se inicia (de las 20 á las 24 horas), revélase bajo la forma de mancha de color amarillo pajizo, muy refringente, ligeramente granulosa y limitada por un contorno redondeado, pero con irregularidades y festones que le dan una facies verdaderamente característica, tanto más cuanto que casi todas las colonias que presenta la gelatina son perfectamente redondeadas. A mayores aumentos (500 diámetros), nótase frecuentemente un aspecto irradiado en el centro, y una zona pálida y dentellada en la periferia. (Fig. 3.ª, A.)

No es posible distinguir en la colonia los vírgulas que la forman, ni aun por medio de los agentes tintóreos, al menos cuando el examen se efectúa sin previa disociación.

Para apreciar la composición de estas colonias incipientes y la ordenación de sus elementos, nosotros operamos de este modo: Comenzamos por arrastrar la gelatina por el agua caliente, con lo que las colonias íntegras se depositan sobre el porta-obje-

tos; practicamos después la disociación de aquéllas por medio de las agujas, y hacemos obrar sobre ellas, todavía húmedas, el violeta de dalia ácido ó el verde metileno (1). En estos preparados se advierte que todo el bloque formado por la colonia está compuesto de vírgulas apiñadísimas, y de una materia viscosa que los traba y asocia, menos apta que éstos para teñirse por el dalia. Se observa, además, que el aspecto estriado é irradiado de la colonia es debido á largas cadenetitas de vírgulas que, arrancando del centro, se terminan en los dentellones de la periferia. (*Figura 4.<sup>a</sup>, a.*)

El método corriente de teñir las preparaciones del coma-bacilo en otra ocasión expuesto, conviene igualmente para esta demostración; tiene sólo el defecto de teñir demasiado las colonias, borrando aquel aspecto estriado ya dicho: en cambio, revela clarísimamente la forma de los comas disociados y los que emergen de los bordes de las colonias.

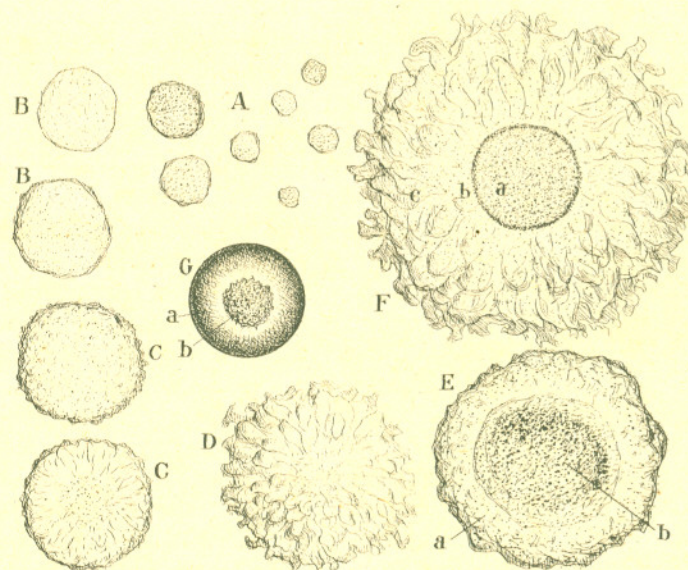
Todo cuanto acabamos de exponer refiérese á las colonias más jóvenes. Las que son examinadas más tardíamente, á las 36 horas por ejemplo, revelan nuevos aspectos. Además de alcanzar mayor extensión y opacidad, dejan ver dos capas ó zonas claramente limitadas: una periférica más transparente y pálida, de aspecto granuloso, terminada por fuera á favor de dentellones irregulares á modo de vegetaciones, y menos colorable por los agentes tintóreos (dalia, fuchina, verde metileno, etc.); y otra central amarilla y oscura, de apariencia finamente granulosa, fuertemente colorable por el violeta de dalia, etc., y correctamente limitada hácia fuera por una franja ó línea granulosa brillante que la separa de la zona periférica. (*Fig. 3.<sup>a</sup>, F.*)

Algunas veces, la línea de la separación indicada no se muestra, y las dos zonas se confunden y continúan por suaves transiciones. También suele variar el aspecto del núcleo central: en vez de ser uniformemente áspero, puede mostrar en su interior un núcleo más claro, como desgarrado, disposición que se advierte especialmente al afocar el plano más inferior de la colonia.

Todavía se ven, aunque menos frecuentemente, otras formas:

(1) Estas sustancias se disuelven en agua mezclada solamente con algunas gotas de ácido acético. La elección no es tan viva por los vírgulas, como la que poseen las soluciones en agua de anilina, pero dejan ver, en cambio, mejor la estructura de las colonias.

existen colonias indudablemente de vírgulas, que ostentan una superficie excesivamente desigual, de aspecto muriforme, ó mejor como una cabeza cubierta de mechones aislados y divergentes. Estas prolongaciones adquieren gran desarrollo en el contorno, tomando aspectos sumamente extraños. No es raro que tales proyecciones lleguen á formar verdaderos lóbulos, y aun que se disponga con cierta ordenación concéntrica que hace recordar, aunque lejanamente, los pétalos de una flor. (*Fig. 3.<sup>a</sup>, D.*)



*Figura 3.<sup>a</sup>* Colonias del coma-bacilo, examinadas á 35 diámetros.—A, colonias vistas á las 20 horas después de la siembra; B, colonias á las 24 horas; C, colonias á las 28 horas; D, colonia á las 32 horas, en la cual se descubre un aspecto irradiado, así como un comienzo de diferenciación en estratos; E, colonia vista á las 40 horas, y en la cual, a, representa la zona superficial, y b, la central más opaca y amarilla; F, colonia á las 48 horas, en la cual, a, indica el nódulo central amarillo, b, la cubierta de éste, y c, la zona pálida periférica y como desgarrada y formada por bucles; G, colonia vista con solo 10 diámetros de ampliación á las 48 horas de la siembra, y en la cual se descubre en b, la colonia propiamente dicha, y en a, la zona transparente de liquidación de la gelatina. Esta zona no ha sido representada en las demás figuras á causa de su gran extensión.

La zona central, ordinariamente más oscura y amarilla, pue-

de revelarse bajo un color más claro y brillante que la periférica, no siendo raro el que presente huecos á manera de vacuolas.

Por último, entre las dos zonas concéntricas descritas ocurre, á veces que se forma una nueva capa menos pálida y más amarilla que la periférica, especie de transición entre ambas; y aun puede acontecer que falte por completo toda diferenciación, y no exista más que una masa homogénea irregular que sucesiva y gradualmente se oscurece y amarillea de la periferia al centro.

En resumen, á las 20 horas no existe diferenciación de estratos; la colonia es una masa amarillenta granulosa de contorno irregular; después de las 24 á las 48 horas, la zona periférica aparece y con ella la complicación estructural indicada. Esta zona es la que en adelante crecerá casi exclusivamente, adquiriendo á los cuatro días un diámetro dos ó tres veces mayor que el nódulo central, al parecer estacionario. Ahora bien, esta disposición estratificada es característica del vírgula, por lo cual el examen de las colonias será de mucho más provecho á las 36 horas de la siembra que antes, cuando todavía no han surgido señales de diferenciación. Porque, en realidad, el solo hecho del contorno irregular de la colonia observado en época en que no ha comenzado á liquidarse la gelatina ambiente, no puede servir para formar un diagnóstico bacteriológico, toda vez que muchísimas colonias de cocos y bacterias que derriten ó no la gelatina, presentan igualmente en sus comienzos ciertas irregularidades. Señalaré tan solo una bacteria aerobia que constituye más tarde colonias en forma de nubes, las cuales, en sus comienzos, sólo se distinguen de las del vírgula en que son más pálidas de contorno y aparecen algo más tempranamente.

**3.—Zona de liquidación de la gelatina.** Por fuera de la colonia propiamente dicha, y en un tiempo que varía de las 24 á las 30 horas, aparece una franja blanca brillante con toques irrisados. Esta es la primera señal que denuncia el derretimiento de la gelatina en las inmediaciones de la colonia. Más adelante el líquido aumenta en cantidad, y el limbo brillante se extiende y ensancha, contorneándose por su circunferencia externa cada vez con más vigor y distinción.

Este líquido es absolutamente transparente, *rasgo este sumamente importante para el reconocimiento de las colonias de vírgulas*, pues casi todas las de cocos y bacterias que derriten la

gelatina prestan al líquido resultante un aspecto turbio más ó menos lechoso. Examinado el líquido al microscopio, *jamás ofrece bacilos en suspensión*; bien al contrario del engendrado por otras especies que contiene siempre nadando individuos disociados de la colonia.

El líquido se produce desde el principio; mas el examen de las placas al microscopio y sin reactivos, no permite denunciar su presencia más que de las 28 á 36 horas. Sin embargo, utilizando un proceder que nosotros hemos aplicado á la conservación de las placas en preparación definitiva, lógrase fácilmente demostrar que la liquidación de la gelatina tiene lugar *ab initio*. Consiste el *modus operandi* en someter una placa delgada, 20 horas después de sembrada, á una brusca desecación, que puede lograrse, bien por evaporación espontánea, bien por la acción del alcohol fuerte repetidas veces aplicado. Seca la gelatina, se tiñe el todo por cualquiera color de las anilinas, fuchina, violado de anilina, de dalia, etc., disueltos en el agua de anilina.

Tras muy pocos segundos de acción, la preparación, que será lavada como en el procedimiento corriente, volverá á desecarse espontáneamente y se montará en el bálsamo. En estas preparaciones la gelatina obtiene cierto grado de color no tan subido como el de las colonias, y se advierte en torno de éstas una zona más clara, es decir, un limbo en que la gelatina tiene menos tinta que en el resto, con el cual se une por suaves transiciones. Esta zona incolora ó menos teñida marca la pérdida de sustancia ocurrida allí por causa de la evaporación de la gelatina líquida durante el manual operatorio, y no falta jamás en ninguna colonia del vírgula por diminuta que sea; sólo que, como es de suponer, las colonias antiguas (36 horas en adelante) ofrecen un espacio de gran extensión y absolutamente incoloro, y las más jóvenes (18 á 24 horas) solamente un anillo más pálido de color que el resto de la tinta adquirida por la gelatina. (*Fig. 4.<sup>a</sup>, c.*)

Por lo demás, estas preparaciones demuestran que la colonia del vírgula está perfectamente limitada; que el espacio claro correspondiente á la zona liquidada del terreno no encierra bacilo ninguno; y revelan, además, con claridad la disposición del contorno externo de la excavación frecuentemente teñido y festoneado.

El estudio de estas preparaciones arroja algunos datos intere-

santes que pueden servir para la diferenciación de las distintas colonias de bacteriáceas. Es de notar que ninguna adquiere por este proceder de impregnación tanta intensidad de color como la del vírgula, y ninguna ofrece tampoco en tan alto grado como éstas ese aspecto de homogeneidad y apretamiento propio de las colonias formadas de elementos excesivamente apiñados; bien al contrario de ciertas tribus de cocos y de bacterias que, formando colonias algo semejantes á las del vírgula, consienten siempre, gracias á la incoherencia y laxitud de sus elementos, la percepción distinta de los mismos.

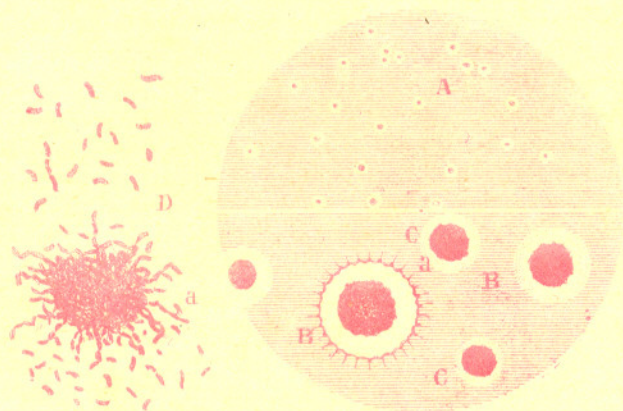


Figura 4.\* Colonias desecadas y teñidas por la fuchina.—A, colonias del vírgula á la simple vista y examinadas por transparencia (á las 48 horas de la siembra); B, colonias de 30 horas examinadas con ligera amplificación; C, colonia de 20 horas vista con mayor aumento, y en la cual la zona gelatinosa a, más pálida que el resto, muestra un principio de liquidación de la gelatina; D, colonias disociadas, desecadas y teñidas; en a, se demuestra que la disposición irradiada de la colonia se debe á las cadenas de vírgulas.

La liquidación de la gelatina es debida á la secreción de una diastasa que el coma-bacilo deposita en sus inmediaciones. El tanto de transformación de la gelatina está en relación con la extensión de la superficie secretante. Y como la colonia del vírgula es aplanada, la gelatina se líquida con más intensidad por debajo de ésta que no en las zonas periféricas, á las que no opone sino la escasa superficie de un estrecho borde.

**4.—Aparición de la burbuja.** Este fenómeno es consecuencia precisa del anterior. El líquido formado en torno de la colonia carece de viscosidad y se evapora rápidamente. Esta evaporación da lugar á la producción de un canal alrededor de la colonia, y, más adelante, cuando ésta ha descendido profundamente, á la formación de un hoyo ó espacio lleno de aire, de forma semiesférica algo prolongada, con todas las apariencias de una media burbuja; aspecto que se presenta lo mismo á la simple vista que al examen microscópico, después de las 30 horas.

*Esta particularidad es uno de los rasgos más importantes de las colonias del vírgula* y uno de los que más vivamente impresionan al observador. Con todo, no puede estimársela como fenómeno exclusivo del coma-bacilo. Más adelante veremos que existen bacteriáceas capaces de desenvolver en la gelatina verdaderas burbujas y más perfectas todavía que las que el coma determina. Por lo densas, la profundidad del susodicho espacio aereo así como su forma varían un tanto según la mayor ó menor densidad de la gelatina y el grado higrométrico del aire. Así, cuando se expone á un aire seco una placa con colonias de bacilos vírgulas de 30 horas de edad, las burbujas surgen bruscamente, ganando rápidamente todo el espesor de la capa de terreno, y adquiriendo, por consecuencia, una forma de cono muy prolongado. La colonia no puede en este caso afocarse convenientemente por causa de la misma estrechez y profundidad de la burbuja. Por el contrario, si la evaporación es lenta, la burbuja es menos perceptible, ofrece más amplitud y la colonia, que está envuelta en cierta cantidad de líquido no evaporado, es de más facil afocamiento.

**5.—Aspecto macroscópico de las colonias.** Hemos dicho ya que á las 24 horas aparece la colonia del bacilo vírgula como una depresión imperceptible de la superficie de la gelatina. Pero sólo á las 36 es cuando puede juzgarse bien de su forma y disposición; se da á conocer entonces por una excavación de forma cónica, perfectamente diáfana, en cuyo centro yace una mancha grisácea, redonda y pálida que llena apenas la tercera parte de la fosa. En el fondo de ésta apenas puede descubriese una pequeña cantidad de líquido transparente.

Cuando la gelatina tiene suficiente consistencia y la evaporación del líquido es rápida, la totalidad de la colonia ofrece al exa-

men macroscópico el aspecto de una burbuja, sobre todo si la observación se verifica á cierta distancia y por el dorso de la placa.

En las colonias confluentes conserva cada masa de vírgulas su individualidad, trabajando en su esfera de acción en la liquidación de la gelatina con completa independencia.

En suma: el aspecto de la burbuja, la transparencia de la excavación, la escasez del líquido contenido, la pequeñez de la colonia relativamente á la amplitud del cono hueco, el color gris trasparente de ésta, son los caracteres macroscópicos por los cuales se distingue en casi todos los casos una colonia de vírgulas colerígenas de otra cualquiera que se le asemeje.

El diagnóstico de las colonias del vírgula es facilísimo cuando se examinan placas procedentes de las deyecciones, por la razón de que en éstas no existe comunmente ninguna especie bacteriológica que tenga la propiedad de excavar la gelatina, dando á la excavación el aspecto de burbuja. Pero cuando las placas han sido sembradas con cultivos impuros de caldo y gelatina, ó también con aguas potables sospechosas de contener coma-bacilos, pueden presentarse colonias tan parecidas bajo el aspecto macroscópico á las del bacilo-colerígeno, que sólo un conocimiento perfecto de todas ellas podría impedir bochornosas equivocaciones.

Hé aquí algunas especies que nosotros hemos estudiado particularmente, con el fin de distinguir bien sus colonias de las propias del microbio colerígeno: todas ellas derriten la gelatina, produciendo excavaciones más ó menos profundas.

1.<sup>a</sup> *Una bacteria prolongada*, recta de dos á tres milésimas de larga, por media de gruesa, habitante en las deyecciones y en las aguas. Sus colonias son muy precoces: á las 12 horas y á la temperatura de 20° inician su desenvolvimiento, adquiriendo á las 20 horas un diámetro de dos á cuatro milímetros.

La diástasa segregada por estas bacterias goza de tal actividad que cuando las colonias son abundantes pueden licuar toda la gelatina antes de las 36 horas, dejando el terreno agotado para las bacterias de más tardío desarrollo.

La colonia propiamente dicha se muestra bajo la forma de una mancha gris redondeada y de contorno irregular.

La zona liquidada presenta un aspecto turbio como de cristal esmerilizado y el líquido que contiene es muy abundante, y encierra multitud de bacterias en suspensión.

No forma burbuja, y la excavación que determina es poca, profunda y cupuliforme.

2.<sup>a</sup> *Un diplococo*, que también suele presentarse en cadenas y cocos independientes.

Sus colonias comienzan á distinguirse antes de las 24 horas bajo la forma de manchas redondas, opacas y coposas constituidas por los micrófitos poco trabados y coherentes. Estas colonias llenan casi todo el hueco abierto en la gelatina, terminando periféricamente por un contorno desigual y como desagregado.

La excavación es poco profunda y no existe burbuja.

La extensión de la zona líquida, que llega á tres ó cuatro milímetros á las 36 horas, la opacidad intensa de la colonia, y la estrechez del limbo de licuación del terreno, son los rasgos que nos servirán perfectamente para distinguir siempre, á la simple vista, estas colonias de las del microbio colerígeno.

3.<sup>a</sup> *Cocos gruesos* de dos á tres milésimas de diámetro, fuertemente refringentes y visibles hasta con aumentos de 120.

Sus colonias aparecen de las 16 á las 20 horas, adquiriendo á las 24 cerca de dos milímetros de anchura. Tan pronto como se hacen visibles toman el aspecto de burbujas transparentes enteramente idénticas á las descritas en las colonias del vírgula.

El acúmulo de micrófitos es redondeado, granuloso, sin las estratificaciones de las colonias del coma-bacilo, y ofrece un borde indeterminado constituido por cocos desagregados.

La zona derretida es bastante extensa y trasparente, y contiene algunos microbios sueltos, carácter distintivo de importancia suma, pues ya hemos dicho que uno de los rasgos más típicos de las colonias del coma es la ausencia de elementos en la zona de licuación.

De las 24 á las 36 horas surge una particularidad que disipa toda incertidumbre. La colonia adquiere un bello tinte rosáceo, dependiente de un pigmento rojo granuloso, segregado por los cocos y depositado entre ellos.

Este coco, que nos parece ser el descrito por Cohn con el nombre de *micrococcus prodigiosus*, lo hemos hallado muchas veces en cultivos impuros á la gelatina y en el aire atmosférico.

4.<sup>a</sup> *Un bacilo muy corto* á manera de bacteria, de una y media á dos milésimas de longitud por algo más de media de grueso.

Sus colonias, que se hacen visibles á las 24 horas bajo la forma de pequeñísimas burbujas, son las que más semejanza tienen con las del coma-bacilo.

Desde las 24 horas son denunciadas al microscopio; pero es tal la pequeñez y profundidad de la burbuja que no es posible afocar la colonia propiamente dicha.

Solo á las 34 horas, en que la burbuja alcanza un diámetro de dos milímetros, se evidencia al microscopio en el centro de ésta, una colonia redondeada, ligeramente pajiza y compuesta de dos zonas: una exterior más pálida, limitada hacia afuera por un contorno festoneado; y una central más amarilla y opaca. A veces, el punto central es más claro y suele encerrar una pequeña burbuja.

Estas colonias se distinguen de las del coma-bacilo, á la simple vista, en que no es posible percibir el acúmulo bacilar del centro de la burbuja, aun en época (á las 36 horas) en la que han alcanzado notable desarrollo. Diríase que son simples pérdidas de sustancia abiertas en la gelatina por un sacabocados. Las materias colorantes tiñen menos intensamente estas colonias que las del coma-bacilo.

Son de notar en tales colonias la escasez de líquido del fondo; la precocidad de aparición de la burbuja; la dificultad de distinguir la masa de microbios á la simple vista, y la cortísima extensión de esta con relación á la zona licuada.

5.<sup>a</sup> *Un bacilo* de 10 á 20 milésimas de largo por dos y media de grueso.

Forma colonias excesivamente transparentes, que brotan de las 18 á las 20 horas. El crecimiento de éstas es tan rápido que á las 24 horas alcanzan ya tres ó cuatro milímetros de diámetro.

Examinada la colonia á un aumento de 100 diámetros, permite observar todo el fondo de la excavación recubierto de una especie de tela delicada, diáfana y como reticulada, constituida por bacilos laxamente asociados y entretrejidos. La línea formada en las fronteras de la colonia por éstos alcanza hasta el mismo límite de la zona licuada, y ofrece un aspecto que recuerda, por la disposición paralela de los bacilos, la capa de los bastones y conos de la retina.

Cuando las colonias son más crecidas pierden diafanidad y presentan un punto más turbio en el centro.

Por lo demás, la excavación de la gelatina es superficial, cupuliforme, y jamás muestra burbuja.

La precocidad de su aparición; su rápida extensión (á las 36 horas puede tener 8 ó 10 milímetros de diámetro); su extrema transparencia, que es tal al principio que no deja ver más que una simple y suave depresión llena de líquido cristalino, nos permitirán diferenciar en todo caso ésta de las demás colonias de la gelatina.

6.<sup>a</sup> *Un leptotrix*, de longitud notable, que á las 24 horas se presenta asociado en colonias redondas ó irregulares de tres ó cuatro milímetros de diámetro, con un fondo cubierto de una red desigual, formada por haces de filamentos terminados periféricamente por prolongaciones paralelas que semejan á una estacada.

Difiere este leptotrix del anteriormente descrito en que es muchísimo más largo, constituye colonias menos transparentes y, sobre todo, en que del contorno de éstas surgen expansiones llamadas formadas por verdaderos bucles de leptotrix que invaden los territorios vecinos, dando á la zona de liquidación gran extensión y contornos muy irregulares; bien que domina la forma triangular en casi todas las colonias.

La excavación engendrada en la gelatina es superficial, sin burbuja y muy abundante en líquido.

#### 5.—Obtención de la semilla en las colonias de la placa.

—Transcurridas 40 horas después de la siembra del coma-bacilo en las placas gelatinosas, las colonias habrán adquirido el desarrollo necesario para que sea posible tomar la semilla. Debe elegirse, á este fin, una colonia bien aislada de las demás y exenta de todo micrófito extraño. Jamás debe procederse á la siembra sin asegurarse bien, á virtud del examen micrográfico, de que la colonia pertenece realmente al coma-bacilo, para cuyo diagnóstico convendrá tener presente los datos específicos anteriormente apuntados.

La siembra se ejecuta con una aguja fina de platino recién esterilizada á la lámpara. Con ella se toca el fondo de la excavación, es decir, el paraje donde yace la colonia propiamente dicha, y se hunde después rápidamente en el espesor de cierta cantidad de gelatina esterilizada, conservada en un tubo de ensayo y preparada con algunos días de antelación. La maniobra

de quitar y poner el tape de algodón del tubo ha de ejecutarse con viveza para que no se intrusen en éste gérmenes atmosféricos.

A pesar de todas las precauciones, acontece alguna vez la penetración de gérmenes extraños en el tubo sembrado, los que desarrollándose, bien sobre la superficie, bien en el espesor de la gelatina liquidada por el coma, concluyen por prevalecer en el cultivo. De aquí la necesidad de sembrar, cada vez que tomemos semilla de la placa, varios tubos; así se consiguen siempre algunos donde no han logrado ingerirse los microgérmenes de la atmósfera, y donde el coma-bacilo se desarrolla con plena libertad.

**6.—Conservación indefinida de la semilla pura.**—Cuando se ha obtenido una semilla pura, es preciso conservarla en el mismo estado durante mucho tiempo. Con este objeto hemos estudiado los procedimientos de siembra y de cultivo que prestan al vírgula mayor permanencia y vitalidad. Entre los medios apropiados merecen citarse la inoculación en el *agar-agar*: en esta materia los hemos encontrado en buen estado cinco semanas después de la siembra. En la gelatina, si la temperatura excede de 25°, agotan sus fuerzas mucho más precozmente: es raro que á los 12 días sean inoculables todavía los vírgulas sembrados en aquella.

El proceder con que la dificultad de la conservación de la semilla se resuelve, consiste en la práctica de las siembras seriales. Se inoculan, por ejemplo, con una semilla pura 10 ó 12 tubos de gelatina: nacidas las nuevas colonias, se elige la más típica y se siembra con ella otra nueva docena, y así sucesivamente.

Nosotros extraemos la semilla valiéndonos exclusivamente de la aguja de platino; la poca cantidad de gérmenes sembrados, operando así, asegura mejor la pureza y cierta beneficiosa lentitud del cultivo. Los tubos preferibles para tomar semilla son aquellos que no hayan sido abiertos nunca, y cuya siembra date de cinco á ocho días. A fin de evitar la equivocación de tomar vírgulas caducos por jóvenes y vigorosos, convendrá elegir tubos cuya gelatina liquidada ofrezca cierta turbidez: una diafanidad absoluta de ésta es señal de que no contiene vírgulas en suspensión; en estos casos el fondo de la colonia presenta un precipitado blanquecino formado de cadáveres de vírgulas desintegrados.

En general, los tubos inoculados muy profundamente y los que se abandonan en posición oblicua, ó se agitan de cuando en

cuando, conservan más tiempo los vírgulas vivos que aquellos en que concurren opuestas condiciones.

Procediendo con sujeción á estas reglas, hemos logrado conservar durante cuatro meses semilla pura procedente de un colérico de Valencia. Esta semilla está hoy todavía en buen estado, igualmente que otra recogida en Zaragoza y que data de dos meses. Y, comparando los cultivos de estas semillas viejas con otros de origen más reciente, nos hemos asegurado que el coma-bacilo no pierde nunca sus caracteres habituales, ni degenera por los cultivos. Tampoco las inoculaciones practicadas en los conejillos de Indias nos han revelado el menor decaimiento ó pérdida de virulencia de las semillas viejas.

Puede ocurrir que, por cualquier accidente imprevisto, los cultivos se impurifiquen, y el vírgula, en concurrencia con otras formas mejor adaptadas al medio, tienda á desaparecer. Échese mano entonces de la siembra en placa y hágase la selección como más atrás hemos expuesto al tratar del modo de obtener semilla pura de las deyecciones.

En resumen: la conservación del microbio vírgula en estado de pureza á través de muchas generaciones *exige proceder por siembras en serie de unos á otros tubos de gelatina, ó de unos á otros tubos de agar-agar, teniendo la precaución de multiplicar las inoculaciones todo lo posible.*

Las siembras de caldo á gelatina, ó de caldo á caldo, concluyen por impurificar el cultivo casi siempre antes de la quinta inoculación. Esta dificultad de conservar puros los vírgulas por siembras repetidas de los caldos, dimana de las excepcionales condiciones de fertilidad que concurren en éstos. Todo microbio que llegue accidentalmente á un caldo alcalino, hallará en él seguramente un buen terreno; pero son pocos los gérmenes (relativamente) que habiéndose insinuado accidentalmente en la gelatina encuentran en ésta un terreno ajustado á sus necesidades.

#### B.—CULTIVO DEL BACILO-COMA EN LOS TUBOS DE GELATINA.

Expongamos primeramente el modo como nosotros preparamos la gelatina, lo que no dejará de tener interés para los debutantes en estos estudios.

Escogemos una gelatina blanca conocida en el comercio con el nombre de marca plata (de que se hace mucho uso en fotografía): la gelatina Nelson, excelente para otros usos, no nos ha dado sino muy mediocres resultados. Esta gelatina tiene el grave defecto de no coagular á 25.º en disoluciones al 10 por 100, por lo cual no puede aprovecharse más que en el invierno. En general, debe preferirse una gelatina que, disuelta al 8 por 100 y después de varias ebulliciones, no haya perdido la virtud de coagular á temperatura de 26 á 28 grados.

Para proceder á la preparación de la gelatina, se pondrán, en un matraz y en baño maría, 10 gramos de gelatina seca, 100 de caldo ácido recién elaborado á beneficio de la cocción prolongada de carne en el doble de su peso de agua, y 2 de peptona. Esta mezcla se calienta hasta 100º agitandola continuamente, y, cuando la gelatina está bien disuelta, se la añade, gota á gota, una solución concentrada de carbonato de potasa, hasta que la mezcla adquiere ligera alcalinidad. Sabido es que el caldo común es ácido, y que en los medios de reacción ácida no se desarrolla bien el bacilo colerígeno, ni la mayor parte de las bacteriáceas.

Alcalinizada la solución, se trasladará á un baño maría á 100º y permanecerá en él hasta que se produzca una abundante precipitación de copos blanquecinos, y el líquido se torne diáfano en las capas más altas. Llegados á este momento, se filtra la gelatina por un papel de filtro muy delgado, y se recoge el líquido en un vaso bien limpio.

Ahora no resta más que verter la gelatina en tubos, y hacerla sufrir en ellos una prolongada esterilización. Al efecto, se habrán caldeado previamente en el hornillo de gas de Pasteur algunos tubos de ensayo, hasta que el algodón en rama que les sirve de taponamiento haya adquirido un color amarillo moreno. También puede efectuarse esta operación, aunque más imperfectamente, sobre la lámpara de alcohol ó en las brasas de un hornillo común. En estos tubos se repartirá la gelatina filtrada, poniendo en cada uno de 6 á 10 centímetros cúbicos de ésta. Concluida la maniobra, es preciso proceder á la esterilización de la gelatina. A este fin, se trasladan los tubos á una estufa de vapor que marque 100º y en ella permanecerán una hora. En defecto de una buena estufa, se podrá conseguir también la antiseptia de la gelatina sometiendo los tubos por hora y media á la temperatura de ebullición en baño maría. Algunos aconsejan hacer sufrir á la gelatina, por tres ó cuatro días seguidos, la temperatura de 100º durante 15 minutos: de esta suerte procedíamos al principio de nuestras experiencias; pero la observación nos ha enseñado después que basta sólo, para una buena esterilización de la gelatina, someterla una sola vez, por hora y media, al calor de la ebullición en baño maría: evítanse de este modo los inconvenientes de las ebulliciones repetidas, uno de los cuales

es robar á la gelatina su coagulabilidad á un calor superior á 20 grados.

Sucede, á veces, que la gelatina, durante esta esterilización final, se enturbia ligeramente. Semejante turbidez, debida á la concentración que sufren las sales contenidas en el líquido, no reclama nueva filtración. Por lo común, antes de transcurrido el tiempo de la esterilización se han precipitado en el fondo de los tubos los nuevos copos en suspensión, y la gelatina vuelve á adquirir su transparencia. Para favorecer este resultado, conviene mantener los tubos recién salidos del baño maría en una estufa á 40º por algunas horas. De todas maneras, una ligera opalinidad de la gelatina no daña en modo alguno al resultado.

Concluida la preparación de los tubos, se guardan en observación por ocho ó diez días en un paraje fresco, y sólo aquellos que, transcurrido este plazo, se conserven sin alteración, serán aprovechados para los cultivos.

Para la preparación de la gelatina hemos utilizado también la fórmula de la gelatina-peptona, aconsejada por Koch; pero no hemos hallado en ella ventajas positivas sobre la descrita anteriormente. Prepárase haciendo macerar en el doble de su peso de agua, durante 24 horas y á 0º, cierta cantidad de carne picada. Al líquido resultante filtrado se añaden: 1 por 100 de peptona, medio de sal común, y 10 de gelatina.

De la fórmula que hoy usamos, que no es otra que la primeramente descrita, hemos suprimido la peptona, sobre cuya utilidad en los cultivos del coma abrigamos muchas dudas. En realidad dista mucho el microbio colerígeno de ser tan exigente bajo el punto de vista de la riqueza alimenticia de los medios de cultura como generalmente se cree. Hasta hemos obtenido excelentes cultivos en gelatina preparada con agua común exclusivamente.

**1.—Cultivo en gelatina alcalina al 10 por 100.** Cuando se siembra un tubo de gelatina densa al 9 ó al 10 por 100 por medio de una picadura profunda con la aguja de platino impregnada en una colonia de vírgulas, los fenómenos que se observan son semejantes á los descritos en las colonias de la placa, pero con algunas variantes que dependen del número considerable de comas sembrados, y del modo de efectuar la siembra misma.

Hé aquí la marcha del cultivo.

**a.—Transcurridas las primeras seis ú ocho horas** después de ejecutada la inoculación, comienza á señalarse un rastro turbio apenas perceptible, extendido á lo largo de la picadura, y terminado hácia arriba, en la superficie de la gelatina, por ligerísima depresión. A veces se produce en el trayecto é inmediaciones de la picadura una fila de cristales que marca claramente la ruta

recorrida por el hilo de platino. Este fenómeno, que algunos bacteriólogos dan como general, no lo hemos observado sino con gelatinas ricas, hechas con caldo muy nutritivo.

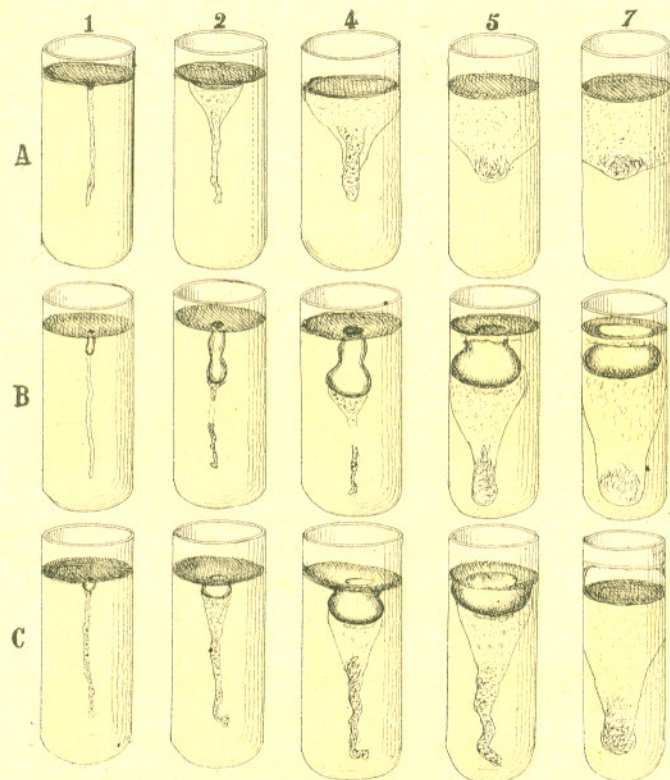


Figura 5.\* Fases evolutivas del cultivo en tubo de gelatina.—Série A: cultivo en gelatina al 7 por 100.—Série B: cultivo en gelatina al 12 por 100.—Série C: cultivo en gelatina al 10 por 100.—(Los números colocados al lado de cada tubo expresan los días que el cultivo tiene de fecha).

**b.**—A las 24 horas, el rastro de la aguja se ha hecho más turbio y opaco. Observado un fragmento de la gelatina en dicho paraje, descúbrese que la opacidad está formada de una serie apretada de colonias correspondientes á cada una de las semillas

sembradas. En la extremidad superior del trayecto se percibe ya un pequeño hoyo transparente. Es de notar que las colonias ú opacidades del trayecto situadas en lo más alto, adquieren mayor espesor que las inferiores; y se advierte también que en ese mismo paraje se inaugura la liquidación de la gelatina. Esto nos enseña cuánta es la necesidad que el vórgula tiene por el oxígeno del aire, y cuán grande es la influencia de éste en su evolución y funciones secretorias. (Fig. 5.<sup>a</sup>, C, 1.)

**c.**—A las 48 ó 50 horas, hay que considerar en el cultivo tres cosas: el trayecto de las colonias, el embudo ó ensanchamiento cónico en que éste remata por arriba, y la burbuja de aire. El trayecto es mucho más ancho y opaco: presenta frecuentemente interrupciones por materia trasparente, pierde su dirección rectilínea para hacerse flexuoso y aun espiróideo, y se termina por abajo en un cabo redondeado más amarillo y oscuro que el resto.

El embudo es todavía pequeño y lo forman, un hoyo cónico continuado por abajo con el trayecto colonial, y un líquido casi transparente que lo llena. Casi siempre la superficie del líquido expresado contiene sobrenadan lo una como mancha turbia, constituida de una ó varias colonias superficiales de comas que respiran poco menos que en plena atmósfera. En este estadio evolutivo puede afirmarse que el tubo de gelatina contiene dos formaciones microbianas: una superior, en la base del embudo; y otra inferior cilíndrica y estrecha, en el trayecto ó parte estrecha de aquél.

La burbuja es debida á la rápida evaporación del líquido en la base del embudo. Su forma y dimensiones son muy variables y dependen de multitud de circunstancias: la higrometricidad del aire, densidad del medio, reacción de la gelatina, etc. En general, en la soluciones gelatinosas al 10 por 100, se presenta de forma esferoidal ó ligeramente ovóidea, y se halla como nadando en el líquido del infundíbulo.

A los cuatro días, el trayecto se ha ensanchado mucho más, y así mismo el embudo, el cual encierra ahora mucha más cantidad de líquido. En torno del cilindro constituido por las colonias inferiores, se ha llegado también á liquidar la gelatina, de lo cual resulta que, perdiendo aquél su natural apoyo, comienza á arrugarse y descender, concluyendo por precipitarse y formar en la parte más honda de la picadura un montón irregular de copos

opacos, tanto más espesos y amarillos cuanto más inferiores. El líquido del embudo se muestra trasparente, cuando más contiene algún pequeño copo grisáceo, y la colonia alta atmosférica ya mencionada más atrás se engruesa aunque ligeramente. La burbuja crece en extensión, y se aplana de arriba á abajo, hasta convertirse en una cavidad aérea, semisteroidal de gran amplitud, bien que sin llegar á las paredes del tubo cuando éste no es muy delgado.

**E.**—*Por último, de los seis á los doce días*, según la temperatura ambiente, la burbuja desaparece por haber alcanzado la zona de liquidación todo el espesor de la gelatina, y el líquido del embudo ha bajado considerablemente de nivel. Muéstrase también este líquido algo más turbio, y la colonia superior, que formaba un micoderma delgado situado por debajo de la burbuja, ha caído en el fondo, donde aparece un detritus turbio é irregular. No hay ya distinción entre el trayecto y el embudo: todas las partes ahuecadas de la gelatina se han refundido en una vasta excavación de forma cónica. Y por fin, hasta la misma gelatina que rodea la extremidad inferior del cono se funde, y el todo se reduce á un trozo de cilindro líquido, rematado por abajo en una superficie casi plana, cubierta por un precipitado blanquecino. Cuando esto sucede puede darse por muerta la colonia: el líquido adquiere la transparencia del cristal, y cuando más se forman en el cabo alto de él algunos micodermas poco vivaces.

La altura de la gelatina liquidada no depende de la cantidad de esta sustancia, sino de la profundidad de la picadura.

**2.—Cultivos en la gelatina al 6 por 100.** Como *á priori* puede ya sospecharse, el bacilo vírgula no se comporta igualmente en los terrenos poco ricos en gelatina. Las variaciones que se observan dependen de que, habiendo menos terreno que liquidar, la diastasa segregada por el vírgula obra en la unidad de tiempo en una mayor extensión; de lo que resulta que la evaporación no puede en las condiciones ordinarias robar todo el líquido formado. De aquí una importante variación: los cultivos del vírgula en las gelatinas al 6 y 8 por 100 carecen de burbuja; pero como la liquidación es más rápida, el cono se forma mucho antes, y la zona derretida á las 48 horas es casi cuatro veces más grande que la observada en la gelatina al 10 por 100. La rápida liquidación de la gelatina pone á disposición del bacilo grandes cantidades

de materias alimenticias, que aprovecha el vírgula acrecentando sus virtudes proliferativas. Por esto, sin duda, todo el líquido del embudo es turbio, en vez de trasparente, asemejándose á un cultivo concentrado de comas en el caldo.

Véase la figura 5.<sup>a</sup> donde están representadas las fases que recorre la colonia del vírgula en gelatina de distintas densidades. En ella se advierte que cuando apenas se ha formado la colonia característica en los tubos de gelatina al 10 y 12 por 100, ya casi ha terminado el vírgula su evolución en los medios al 6 por 100.

**3.—Cultivo en gelatina al 12 por 100.** (Fig. 5. B) Tanto en las gelatinas densificadas expreso por aumento del tanto de materia coagulable, como en aquellas que, por virtud de larga evaporación, han adquirido mucha consistencia, nótese que el desarrollo de la colonia marcha con más lentitud que la ordinaria, y que ciertos fenómenos normales del cultivo se exageran notablemente.

Durante el primer día, nada se observa de particular, sino es el rastro turbio en otra ocasión descrito; pero al comienzo del segundo se revela ya en el extremo superior del trayecto una depresión honda y transparente con apariencias de burbuja.

A veces, esta pequeña burbuja es tan larga y tan estrecha que no parece sino que todo el túnel abierto en la gelatina por la aguja se ha llenado de aire. En estos casos, el derretimiento no tarda en colmar en parte el hueco abierto por la penetración del aire, reduciendo la burbuja á más limitadas proporciones.

Al tercer día, la burbuja adquiere más desarrollo, y, sobre todo, más profundidad: su extremo superior es estrecho y su fondo ancho, aspecto que recuerda el de una botella: á veces, existen lobulaciones en la superficie de la cavidad aérea que dan al todo un aspecto extraño. El infundíbulo es sumamente pequeño con relación á la burbuja, y se prolonga insensiblemente con el trayecto colonial que apenas ha variado de espesor.

Al cuarto día, la base del infundíbulo se ensancha y el líquido turbio que la llenaba se torna transparente. La burbuja crece en espesor y disminuye en altura. El trayecto colonial se amplía, se retuerce, se oscurece por su extremo inferior, y se llena de precipitados opacos.

En adelante, la evolución no ofrece nada de particular; solamente es de notar el extremo retardo de las últimas fases; así, por

ejemplo, sólo del décimo al duodécimo día llega á derretirse todo el espesor de la gelatina inoculada.

En resumen; las gelatinas duras producen colonias muy tardías, en las que la liquidación de la gelatina se verifica muy lentamente, y la burbuja adquiere un desarrollo excepcional.

Este retardo general de la evolución, igualmente que la exageración de la burbuja, se explican del mismo modo que el aceleramiento observado en los medios de cultivos menos ricos en gelatina. Habiendo en igual volumen más cantidad de materia que transformar, el vírgula necesita mucho más tiempo para efectuar la liquidación, mas como el líquido elaborado es escaso, y se acumula con lentitud, la evaporación de éste tiene lugar casi en la misma proporción en que se engendra; de ahí el gran desarrollo de la burbuja, la escasez del líquido del infundíbulo y el retardo general de la evolución.

**4.—Cultivo en gelatinas ácidas.** Aunque en estos medios el vírgula no vive sino precaria y raquíticamente, no deja de ser curioso observar su evolución en ellos.

Al primer día, apenas existe señal de la inoculación; al segundo, nótese un ligero rastro apenas perceptible; al tercero, surge un comienzo de burbuja, y, al cuarto, adquiere ésta mayor desarrollo y una forma semi-ovóidea ó hemiesférica; pero del quinto en adelante los cultivos quedan estacionarios, no pasando, digámoslo así, de sus fases embrionarias.

**5.—Colonias producidas en la gelatina sembrando gran número de gérmenes.** Si, en vez de la aguja de platino, se utiliza para la siembra una pipeta esterilizada cargada con una ó dos gotas de cultivo puro, los fenómenos de colonización se desenvuelven de la propia manera ya descrita, sólo que se aceleran notablemente todas las fases evolutivas del cultivo, y disminuye notablemente el tamaño y duración de la burbuja. Para usar de la pipeta, se comienza por esterilizarla á la lámpara, se sumerge en la gelatina liquidada de un cultivo puro, y se ingiere á través del algodón del tubo en que se quiere practicar la inoculación. Antes de hundir la pipeta en la gelatina, es preciso soplar suavemente por su extremidad superior para que rezume por fuera de su punta el líquido portador de la semilla. En esta situación, se pica rápidamente la gelatina. Si, durante la anterior maniobra, salpicaran algunos gérmenes la superficie del terreno

de cultivo, se obtendrían infinidad de colonias superficiales que, confluyendo luégo entre sí, liquidarían todo el extremo superior de la gelatina, impidiendo el desarrollo típico de la colonia principal.

**6.—Cultivo en la gelatina sembrando un solo germen ó poquísimos gérmenes.** En los procederes de siembra descritos llegan siempre al campo de cultivo infinitos gérmenes, que, esparcidos por la aguja ó la pipeta, á su tránsito por el espesor de la gelatina, dan origen á otras tantas colonias, las cuales forman apretadas un cilindro vertical. De esta riqueza de la semilla depende la rápida liquidación de la gelatina, y la misma disposición del trayecto colonial. Pero si comenzamos por diluir el líquido de la siembra en 20 ó 50 partes de agua hervida, y en él empapamos la aguja de platino, será probable que sólomente hayan llegado al terreno uno, ó dos gérmenes.

En estos cultivos, llama la atención desde luégo la lentitud con que se desarrollan; al tercer día apenas hay señales de germinación: se inicia ésta por la aparición á lo largo del trayecto, invisible entonces, de uno, dos ó más nódulos grises, separados entre sí por intervalos transparentes. Al mismo tiempo se forma un hoyo en la superficie gelatinosa. Del cuarto al quinto día los nódulos (que no son otra cosa que colonias aisladas dependientes de la vegetación de un solo germen) liquidan los intervalos que los separan, se ponen en contacto y se precipitan en el fondo del trayecto. Por entonces también la burbuja y el embudo se han desenvuelto, y el cultivo toma el aspecto de los típicos descritos en otra ocasión. Este proceder no es sólomente un modo de retardar el desarrollo del vírgula, á fin de conservar más tiempo la semilla, sino que es un excelente medio de purificación de los cultivos. Diluyendo convenientemente en agua una gota de caldo con vírgulas mezclados á otros gérmenes, y sembrando este líquido con la aguja en muchos tubos, casi siempre se obtienen varios en que las colonias del coma vegetan en toda su pureza.

**7.—Influencia de la temperatura en los cultivos.** Cuando el calor excede de 27 grados, los fenómenos de la colonización del vírgula adquieren gran intensidad y rapidez. A las 24 horas suele haber una burbuja bien perceptible y un cono bastante extenso. La liquidación es tan rápida en los días siguientes que al sexto

día puede haberse agotado ya todo el terreno del cultivo. Una temperatura más alta reblandece la gelatina, y el cultivo se extiende, y las vírgulas se diseminan, constituyéndose un líquido turbio, análogo al caldo en fermentación. Estos cultivos en nada se distinguen de los en caldo y en suero líquido.

Al contrario, una temperatura de 10° paraliza el cultivo por completo; á los 15° marcha, aunque lentamente, marcándose muy poco ciertos fenómenos como, por ejemplo, la aparición de la burbuja. A esta temperatura se necesitan 15 ó 20 días para que ocurra la liquidación total de la gelatina de un tubo (1).

La temperatura mejor, aquella bajo la cual las colonias se desenvuelven bien, pero con cierta provechosa parsimonia, es la de 18 á 25°.

**8.—Examen microscópico de los cultivos de gelatina en tubo.** Cuando se examina una gota del líquido ligeramente opalino que llena el embudo de la colonia, descúbrense dos órdenes de cuerpos. Percíbense, en primer término, multitud de comas de tamaño normal y forma característica. La densidad del medio gelatinoso les presta cierta palidez de contorno, por la cual cuesta trabajo de ordinario distinguirlos. Ofrecen también movimientos espontáneos: éstos son muy lentos y premiosos en las gelatinas concentradas, más vivos y libres en las gelatinas flojas; pero nunca se muestran tan vivaces como en los cultivos en caldo y en las mismas deyecciones. Véanse también algunos pocos espírilos muy cortos, y séries de vírgulas formando cadeneta; mas no son perceptibles ninguna de las formas modernamente descritas en el bacilo colerígeno.

Además, mezclados con los vírgulas, se descubren ciertos corpúsculos apenas colorables por los reactivos derivados de la anilina, de forma irregular, de tamaño variable, sin movilidad espontánea, ni rasgo ninguno que nos autorice á considerarlos como formas vivas: son estos cuerpos probablemente *detritus* ó precipitaciones de materias orgánicas, ocasionados por la acción química de las diastasas segregadas por el vírgula.

(1) No hemos podido confirmar la aseveración del Dr. García Solá de que el bacilo vírgula obtenido de los coléricos de Valencia coloniza en la gelatina más perezosamente que el descubierto por Koch en Egipto y en la India: cabalmente nos pareció que sucedía lo contrario, circunstancia nada extraña dada la alta temperatura que reinaba en aquella ciudad durante nuestras experiencias.

Cuando el examen se practica en aquellos grumos blancos, precipitados en el fondo del trayecto ó parte estrecha del embudo, adviértense también los vírgulas y los cuerpos irregulares incolorables, pero se nota además la presencia de otras formas, al parecer constituidas por vírgulas en involución. Son éstas, en primer término, vírgulas hipertróficos, de doble ó mayor tamaño que los normales, espírilos gruesos y cortos de vueltas anchas, terminados unas veces en maza, otras por un corpúsculo redondeado probablemente de la misma naturaleza que los descritos por Ferrán con el nombre de *oogonos*; y, por último, cadenetas de comas irregulares de anillos desiguales, y eses monstruosas con ó sin corpúsculo terminal. Estas formas sólo se descubren en los últimos días de la vida de los vírgulas, cuando el cultivo comienza á agotarse y el líquido se hace diáfano.

#### C.—CULTIVO DEL VÍRGULA EN EL AGAR-AGAR.

La preparación de los tubos al agar-agar se efectúa según la técnica general expuesta con relación á los de gelatina, excepción de la fórmula del terreno que es: caldo 100, gelatina 1, agar-agar 1.

La jalea obtenida con el agar-agar goza de dos propiedades preciosas: es la una el no liquidarse á temperatura de 40 á 45°, por lo cual es utilísima en nuestros climas; y es la otra la de conservar mucho más tiempo (tres ó cuatro semanas) la vitalidad de los vírgulas. Podríamos agregar que los cultivos en esta sustancia se impurifican menos frecuentemente que los de la gelatina, sin duda por causa de que, una vez cubierto el terreno de una capa de vírgulas, esta misma sirve de obstáculo al arraigo de gérmenes extraños.

Las siembras en el agar-agar se ejecutan también de la manera corriente, con la aguja de platino.

Hé aquí los fenómenos de vegetación del vírgula observados por nosotros en la citada materia:

Del primero al segundo día, sólo se descubre un rastro turbio en el trayecto de la picadura; no existe depresión ni ensanchamiento en el extremo superior de ésta. Al tercer día, la materia pulposa que llena el conducto colonial parece rebosar por su extremo atmosférico, derramándose por la superficie libre de la

gelatina, y constituyendo una pequeña mancha gris amarillenta semitransparente, á manera de membrana diftérica. Del cuarto al quinto, la colonia se ha extendido por casi toda la superficie libre de la gelatina; la capa formada por los vírgulas se engruesa tomando un matiz un tanto pardusco; en cuanto al trayecto de la picadura permanece lo mismo, sin indicios de extenderse. No existe ni derretimiento del terreno, ni hundimiento superficial, ni burbuja.

Al llegar á este estado, el cultivo se conserva casi lo mismo algunas semanas; únicamente se nota más gruesa y oscura la capa colonial, y un cierto despegamiento de los bordes de ésta con hundimiento de la gelatina, alteración debida probablemente á la condensación del terreno por evaporación.

Cuando se examina al microscopio una pequeña parte de la colonia grisácea que cubre el agar-agar, descúbrense los vírgulas característicos, con todas las particularidades morfológicas descritas; únicamente se advierte que son menos colorables por los reactivos tintóreos, y quizás algo más pequeños que los cultivados en la gelatina. Por lo demás, pueden entre ellos percibirse espírilos cortos, eses y cadenetas de vírgulas; pero nunca espírilos largos, ni formas engruesadas por sus extremos.

D.—CULTIVO DEL VÍRGULA EN LAS MATERIAS POROSAS, ESPONJA, LIENZO HÚMRDO, ETC., ETC.

Consiste este proceder en sembrar, sobre un lienzo mojado y débilmente plegado, una gota de deyecciones ó de materiales procedentes de cultivos impuros. Si el lienzo esta bien esterilizado, y el cultivo se efectúa en cámara húmeda y bajo un calor de más de 20°, el examen micrográfico revelará, 24 horas después de efectuada la siembra, un cultivo natural casi puro de vírgulas en el líquido que impregna los intersticios del tejido. Este método puede utilizarse para purificar ó al menos hacer predominar el coma-bacilo entre otros microbios sembrados en el lienzo; resultado utilísimo si se considera que puede ponerse en practica con deyecciones coléricas poco ricas en vírgulas, y muy abundantes de otros micrófitos.

La explicación que se da (van Ermergen) de esta selección natural del coma es la siguiente: Cuando se siembran varios mi-

crobios en un mismo terreno, igualmente adaptado á cada especie, los que gozan de una multiplicación rápida y activa se sobreponen á los que, aunque más numerosos, se reproducen más lentamente, y aun pueden quedar aquéllos en tan notable mayoría que aparezca, á un examen superficial, el cultivo como absolutamente puro. En el caso actual, existe una circunstancia que contribuye además á dar la victoria al coma en la lucha por la existencia. Este parásito es aerobio y su multiplicación acrece en razón directa de la cantidad de oxígeno de que dispone; ahora bien, no es posible dar al terreno una disposición más apropiada que la del lienzo húmedo y laxamente plegado para que el oxígeno abunde y el vírgula prevalezca.

A pesar de los resultados satisfactorios que se obtienen del cultivo en lienzo, no me parece que debemos confiar demasiado en las virtudes purificadoras de este proceder. En tres cultivos practicados en lienzo con deyecciones que, aunque en escaso número, contenían vírgulas (pues lo demostró así el cultivo en placas), no sólo no pudimos hacer prevalecer el coma, pero ni siquiera demostrar su existencia. Es más, el vírgula dista mucho de ser la especie bacteriana que más se reproduce en las citadas condiciones: hemos visto muchas veces una bacteria de dos milésimas de longitud cubrir en menos de 16 horas todos los intersticios del lienzo, esquilmando el terreno y ahogando con sus productos al coma y otras especies. Por esta causa no apelamos nunca á este recurso para denunciar los vírgulas en los casos de diagnóstico dudoso. Nuestra opinión es que el coma-bacilo prevalece solamente en el cultivo en lienzo mojado, siempre que no existan especies aerobias en los líquidos sembrados, y cuando prepondera realmente en un cultivo cualquiera y se desea que domine todavía más.

En lugar del lienzo, nosotros hemos empleado, con mejor éxito todavía, la esponja esterilizada. Para usarla, se comienza por hervir la esponja en agua por una hora; fría del todo, se exprime ligeramente, se vierte en uno de sus conductos principales una gota de la deyección ó cultivo impuro que se pretenda mejorar, y se encierra el todo en cámara húmeda y en la estufa á 25°. A las 24 horas, se toma una partícula periférica de la esponja y se exprime en un porta-objetos; el líquido revela infinidad de vírgulas característicos.

Estos cultivos son mucho más ricos si, en lugar de humedecer la esponja con agua, se la humedece con un caldo claro previamente esterilizado.

Por lo demás, no sólo el lienzo y la esponja sino casi todas las sustancias porosas pueden utilizarse con éxito. El papel *bubard*, el sin cola ordinario, la estopa, y hasta la médula de sauco, pueden servir; no obstante, los resultados no nos parecen tan constantes como los conseguidos con la esponja y el lienzo mojados.

D.—CULTIVO DEL COMA EN EL CALDO.

*Preparación del caldo.*—En dos litros de agua común se hierve un kilogramo de carne de vaca ó carnero, partida en pequeños trozos. La cocción debe prolongarse hasta que el líquido se haya reducido á la mitad de su volumen. Se deja enfriar después; se quita la grasa por filtración, y se alcaliniza ligeramente con una solución de carbonato de sosa ó de potasa. Acto continuo, se somete el líquido á una primera ebullición, que no tiene más objeto que precipitar las impurezas ocasionadas por la adición del alcalí, y, una vez frío, se filtra segunda vez. El caldo después de tales tratamientos debe tener un color amarillo rojizo y ser absolutamente diáfano. Se encierra ahora en unos matraces especiales donde sufrirá la esterilización final.

Estos matraces son de fondo chato y de cuello corto, cerrado por un tapón de *caoutchouc* con dos aberturas que reciben dos tubos. Uno es corto, recto ó ligeramente acodado; su extremo superior está tapado con algodón estéril; el inferior terminado libremente en la parte más alta del matraz á distancia del nivel del caldo. El otro tubo es más largo, y arranca, por abajo, de cerca del fondo del matraz, y acaba por arriba en punta alargada y capilar, después de haber sufrido en su trayecto dos acodamientos.

En estos matraces, el caldo, si está bien esterilizado, no sufre la menor alteración (como es bien sabido desde las memorables experiencias de Pasteur), porque los gérmenes del aire no aciertan ni á penetrar por el tubo afilado, ni menos á pasar á través del algodón de la otra tubuladora.

Depositado el caldo en los expresados matraces (que no deben estar completamente llenos), es hora de efectuar la esterilización. Para ello se somete el matraz á la temperatura de ebullición durante un cuarto de hora, y se repite después esta operación dos veces diarias durante cinco días. Este proceder da en general buenos resultados. Conviene advertir que no es conveniente la práctica seguida por algunos de hacer actuar directamente el foco calorífico (llama de gas) sobre el matraz que contiene el

caldo destinado á esterilizarse; pues en este caso acontece con frecuencia que el líquido hierva tumultuosamente, el vapor de agua moja las tubuladoras y tape de algodón, y, al enfriarse del todo, se precipita el aire exterior por el tubo afilado, arrastrando á su paso el agua detenida en éste cargada con microgérmenes del aire. Por esta razón, nosotros no calentamos los matraces á la llama de gas directamente, sino que los dejamos sumergidos en baño maria hirviendo durante una hora. Repetimos la operación tres veces en los tres siguientes días. Con este modo de aplicar el calor no llega á hervir tumultuosamente el caldo, y no se acumula líquido en las tubuladoras, ni hay, por tanto, refluencia de éste al enfriarse. Podrá también emplearse con buen éxito la estufa de vapor y la marmita de Papin.

Las esterilizaciones en frío con el filtro Chamberland no nos han dado resultados constantes. Frecuentemente deja pasar cocos y bacterias que no tardan en corromper los caldos.

Preparado el caldo, se le tendrá en observación por cinco días á la estufa: si al cabo de este tiempo no se altera á una temperatura que exceda de 30°, puede sembrarse sin escrúpulo.

Según el Dr. Ferrán, el caldo se hace mucho más nutritivo añadiéndole bilis esterilizada. La bilis usada por nosotros es de vaca y la adicionamos á los matraces antes de haber éstos sufrido la esterilización final. La cantidad de bilis añadida no debe exceder del 30 por 100. Es preciso que la bilis esté bien esterilizada á prevención, á fin de que no contenga microorganismos que, aunque muertos por las sucesivas ebulliciones, ensuciarían siempre los cultivos. Entre los microfitos que la bilis ofrece, llama la atención una bacteria en cadeneta que adquiere gran longitud y dirección flexuosa.

**1.—Siembra de los caldos.** En realidad puede efectuarse por medio de la aguja de platino, apartando ligeramente el tapón de algodón del tubo corto; pero este proceder es muy expuesto á impurificaciones, por lo cual es más conveniente apelar á la pipeta.

Las pipetas preferibles son tubos de cristal de 15 á 20 centímetros de longitud, por medio de anchura: uno de sus extremos está cerrado por un copo de algodón estéril, y el otro, sumamente adelgazado, termina libremente en punta aguda. Cuando se necesite practicar siembras con gran cantidad de semilla, será conveniente que la pipeta ofrezca en su trayecto una dilatación ampuliforme.

La semilla para la siembra en caldo puede tomarse indistintamente de colonias de comas en placas de gelatina, de cultivos en caldo ó de gelatina en tubos. Nosotros preferimos esta última semilla porque es la que más fácilmente se conserva pura, y se nos ofrece con la suficiente abundancia para sembrar grandes cantidades.

Para ejecutar la operación de la siembra, se comienza por esterilizar la pipeta á la lámpara, se sumerge el pico en el líquido semilla, y después, sin pérdida de tiempo, se insinúa en el matraz á través del algodón del tubo corto. No resta ahora sino soplar por la extremidad superior de la pipeta, á fin de precipitar la semilla que penetró en el tubo por capilaridad. Acto continuo, se agita suavemente el líquido del matraz para diseminar los gérmenes, y se traslada el cultivo á una estufa á 37°, donde permanecerá 24 horas. Transcurrido este tiempo, se observará que el líquido ha perdido su transparencia, tomando un aspecto turbio y lechoso. La presencia de micodermas y grumos irregulares en el líquido acusa por lo común impurificaciones del cultivo.

Después de las 24 horas de incubación conviene dejar reposar el líquido en un paraje fresco, cuya temperatura no pase de 17°. De otra suerte los comas agotarían muy pronto los recursos alimenticios del caldo, concluyendo por destruirse.

**2.—Examen micrográfico de los cultivos en caldo ordinario, sembrado con semilla de tubos de gelatina.** Cuando se observa una gota de un cultivo en caldo que haya sufrido 6 ú 8 horas tan sólo de incubación, se presentan al examen las formas que ya conocemos, pero con algunas nuevas particularidades muy interesantes. (Fig. 6.<sup>a</sup>, A.)

Los comas son abundantísimos y presentan una incuación muy aparente, sobre todo en aquellos micrófitos que, fijos sobre el cobre-objetos, carecen de movimiento; pero se nota que son más largos y gruesos que los de la gelatina. Los movimientos de locomoción observado en estas condiciones son vivísimos, y están en relación con la proximidad de los comas al aire atmosférico. En los alrededores de las burbujas, agítanse con gran actividad, y se advierte que la dirección del movimiento ofrece cierta regularidad, pues cada coma ejecuta dos movimientos: uno de aproximación á la burbuja, en el cual muchas veces llega hasta ponerse en contacto con el aire; otro de separación y sumersión en las capas lejanas del oxígeno. En esta ruta el coma no marcha en línea recta, sino trazando giros y revueltas, andando y desandando en parte el camino, de un modo que recuerda el revolotear de los mosquitos. No es raro percibir algunos comas que, fijos por una extremidad al porta-objetos, dan vueltas por la otra, á la manera de una honda, hasta que un choque violento de la corriente los desprende de su posición.

Al lado de vírgulas normales existen vírgulas mucho más pe-

queños, y algunos que son simples corpúsculos ovóideos, sin señales de incubación. Estos comas embrionarios son abundantísimos en los cultivos de 6 y 10 horas de incubación; mucho más raros en los que datan de dos á cuatro días. Adviértense además series de dos vírgulas pequeños, cuyo punto de unión se percibe con toda claridad. Si añadimos á esto el hecho de que se ven muchas veces comas con estrangulaciones centrales, vendremos á parar fácilmente á esta conclusión: al principio de los cultivos en caldo, el vírgula en su actividad generativa no espera, para segmentarse, á adquirir la forma de S y la de espirilo, sino que, desde luego y apenas desarrollado, inicia la segmentación. Depone en pró de este modo de ver la circunstancia de que, en estos cultivos precoces, no existen ni espirilos, ni eses; al menos, de existir, deben ser sumamente raros, cuya extremada rareza, en unas formas que los bacteriólogos señalan como fases intermedias de división, no puede explicarnos satisfactoriamente la rápida aparición de tantas miriadas de comas como pululan en el caldo.

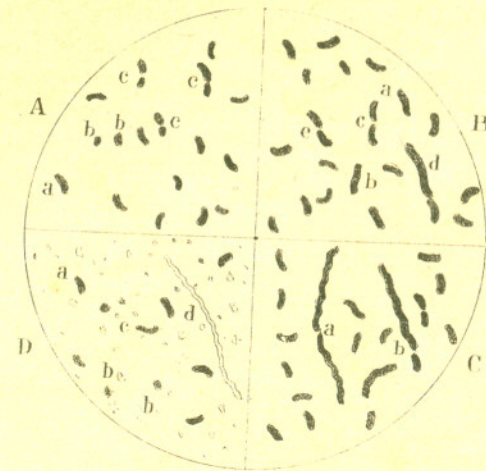


Figura 6.\* Formas del microbio colerígeno tales como aparecen en el caldo ordinario: Preparación teñida por el violado de genciana.—A, caldo examinado á las ocho horas de incubación; a, comas adultos; b, comas embrionarios; c, en vías de segmentación; d, coma segmentado —B, caldo examinado á los tres días de efectuada la siembra; a, ese; b, transición entre la ese y espirilo; c, ese invertida ó forma en 3; d, espirilo.—C, caldo á los cinco días: los espirilos son más abundantes

y se vé en a, uno en segmentación central y otro en b, en división terminal.—D, caldo á los ocho días de sembrado; a, comas que todavía se tiñen por el dalia; b, puntos pálidos, indudablemente restos de comas desintegrados.

De las 12 ó 18 horas en adelante, pueden observarse ya muchas eses y algunos aunque raros espirilos. Las formas en *S* presentan con frecuencia señales de partición, y no es raro el notar, tan pronto como ésta se inicia, una inversión de la forma: las corvaturas en vez de ser alternadas están dispuestas en igual sentido, semejando á un 3. Entre la *S* perfecta compuesta de dos comas y el coma sencillo existen todas las transiciones, igualmente que desde la forma *S* hasta el espirilo de tres ó cuatro vueltas. (*Figura 6.*)

El espirilo se revela como un hilo de bordes correctos, de superficie tersa, con curvas alternadas cóncavas y convexas en número variable desde 3 á 10 y más. Cuando son muy largos, presentan también flexiones más grandes, y no es raro hallar varios enredados unos con otros. Poseen también movimientos, si bien menos vivos que los de los vírgulas. Los espirilos pequeños son especialmente notables por sus movimientos de oscilación y torsión; marchan como los comas atravesando grandes distancias en busca del oxígeno. Pero los espirilos grandes apenas tienen otra movilidad que la de flexión y encorvamiento de sus extremos.

La aparición del espirilo en los caldos se debe al retardo en los fenómenos de partición del coma y de las eses. Este retardo es causado por empobrecimiento del líquido en materiales nutritivos. Así que cuanto más tiempo lleva de fecha un cultivo, más espirilos contiene, y cuanto más claro y pobre el caldo, más precozmente surgen los espirilos. Obstáculos de otra naturaleza, que contrarían la actividad generativa de las vírgulas, favorecen también la presentación de los espirilos; tales son las bajas temperaturas, la escasez de oxígeno y la acidez ligera de los cultivos.

Aunque el espirilo anuncia lentitud generativa no debe pensarse que el fenómeno proliferativo esté abolido en absoluto. El mismo espirilo se fragmenta dando lugar á espirilos más cortos y comas independientes. Los detalles de este proceso no dejan de tener interés. Es frecuente ver que un largo espirilo se dobla hácia su mitad, ó cerca de un extremo; el segmento más

corto oscila entonces en todos sentidos, como forcejeando para desasirse del resto; en breve se divide en el codo una resquebrajadura, y, por último, tras un tirón más violento y ayudándose á veces de los choques de las vírgulas traganantes por las cercanías, el trozo de espirilo se hace libre, alejándose de su compañero. Nótese que los espirilos largos, por punto general, sólo se dividen en otros más cortos; y que éstos dan lugar especialmente á las formas en ese y á los comas. No es raro ver, en caldos de 24 horas de incubación, espirilos de cuatro á seis vueltas, que presentan en su extremo un coma arrastrado á remolque, fenómeno que prueba indudablemente la posibilidad de que las vueltas terminales de un espirilo puedan segmentarse, originando nuevas vírgulas.

El examen del caldo á los cuatro ó seis días después de la incubación, demuestra mayor número de espirilos; pero comienza á notarse que los comas se tiñen menos intensamente por el dalia, y que el líquido se llena de unas granulaciones pálidas irregulares, incolorables, vestigios probablemente de comas fragmentados. (*Fig. 6.<sup>a</sup>, D.*)

Por último, de los seis á los ocho días, según la cantidad de caldo, temperatura, etc., las vírgulas se destruyen, los espirilos desaparecen, y, en lugar de los micrófitos, se ven sólo aquellos grumos irregulares, poco refringentes, incolorables, anteriormente señalados. Puede entonces darse el cultivo como muerto; al menos las siembras no son ya fecundas en los medios ordinarios.

En resumen; la evolución del vírgula en el caldo se condensa en las siguientes fases:

1.<sup>a</sup>—Cuando el caldo es rico y la siembra es reciente, el coma se alarga ligeramente y se fragmenta, dando origen á dos comas pequeños, á veces conformados á la manera de las bacterias. De esta suerte se engendran esas miríadas de vírgulas que pueblan un caldo en menos de ocho horas de incubación.

2.<sup>a</sup>—Cuando el terreno es más pobre, la evolución se alarga por causa del retardo en el acto generativo. Puede decirse que el campo, medio esquilado, da todavía pábulo para el entretenimiento de la vida nutritiva, pero muy escasos recursos para el mantenimiento de la vida de generación. Por eso el coma se alarga, creciendo sin segmentarse, y llega á la forma *S*, y luego pasa por la de espirilo largo, para venir después por una curva

descendente á la de espirilo corto, ese y vírgula. No entendemos, sin embargo, que siempre pasan las cosas de este modo: creemos que al lado de la evolución larga que tiene lugar en los caldos empobrecidos, se da también otra más abreviada, que es: coma, ese y coma; modo generativo probablemente más común que el anterior.

**3.—Cultivo del vírgula en los caldos con bilis.—Cuerpos muriformes.** El Dr. Ferrán ha sido el primero en anunciar que, cuando se cultiva el coma-bacilo en el caldo mezclado con bilis, aparecen ciertas formas especiales, sobre cuya significación y naturaleza se ha suscitado en estos últimos tiempos empeñada controversia.

La técnica recomendada por este bacteriólogo es la siguiente: A un caldo muy nutritivo y ligeramente alcalino se le añade bilis humana ó de herbívoros en proporción de un 25 por 100. La bilis debe ser cuidadosamente esterilizada, sin cuyo requisito aparecerían en el cultivo multitud de impurezas. Preparado el terreno, se siembran vírgulas procedentes de un cultivo puro en caldo ó gelatina. Acto continuo, se lleva el cultivo á la estufa á 37°, donde permanecerá el tiempo suficiente para enturbiarse, conseguido lo cual se saca de la estufa, y abandona á la temperatura ordinaria por dos ó tres días. Al cabo de este tiempo, se añade al matraz cierta cantidad de caldo nuevo con bilis, á fin de que no se agote el terreno, y para que se diluyan los productos de desasimilación de los vírgulas que tanto dañan al ulterior desarrollo de éstos, y se vuelve á abandonar el cultivo á sí mismo, á la temperatura ordinaria, por 10 ó 12 días.

Terminado este plazo, la exploración micrográfica revelará los cuerpos muriformes.

Según el Dr. Ferrán puede suprimirse sin inconveniente de esta técnica la operación cuyo fin es renovar el caldo del cultivo; pero se necesita, para que esta simplificación no sea dañosa, que un previo análisis de la semilla haya evidenciado unos comas especiales, que se distinguen de los otros en que presentan un grano ó esporo en cada extremidad.

Por este último proceder simplificado (siembra una vez en caldo biliar que se deja reposar por 12 días) hemos confirmado repetidas veces en el laboratorio del Dr. Ferrán la existencia de los cuerpos muriformes.

Son los cuerpos muriformes glóbulos esféricos, de superficie desigual, con mamelones y asperezas que dan á los más grandes aspecto de fresas y á veces de cristales estelares. Su tamaño, extremadamente variable, oscila entre 2 y 30 milésimas. Su refringencia es tan grande que son visibles sin previa coloración hasta en el bálsamo del Canadá.

En los líquidos de cultivo aparecen con un contorno oscuro, áspero, como en serreta. Vistos á medianas ampliaciones se presentan con un cierto matiz verdoso amarillento, que no es real sino debido á su misma refringencia, como lo prueba la desaparición del color en el bálsamo y en la glicerina. Los muriformes más chicos semejan á protoplasmas libres, ligeramente granulados de superficie; los más grandes ofrecen más áspero contorno, y cierto aspecto irradiado que les da, al primer golpe de vista, cierta semejanza con los cristales de margarina ó con los del lactato de cal.

Representan, según Ferrán, los muriformes un órgano reproductor, algo así como el óvulo del coma-bacilo. Hé aquí, según este microbiólogo, su origen y evolución. El vírgula cultivado en el caldo con bilis se alarga, y constituye eses y espirilos cuyas vueltas se ensanchan perdiendo algo de su aspecto espiróideo. En el interior del tallo de éstos surgen unos puntos brillantes: estos son los esporos. A consecuencia de la dehiscencia del protoplasma envolvente, los esporos se hacen libres, nadando en el líquido al lado de los vírgulas; y después, y en virtud de su crecimiento y diferenciación, se transforman en cuerpos muriformes. Cuando éstos alcanzan todo su apogeo, por consecuencia de ciertas contracciones de su protoplasma, emiten una proyección de su contenido que, al condensarse, forma los espirilos delgados y pálidos. Estos, caracterizados por no teñirse apenas por los reactivos colorantes, crecen y engruesan, pasando á ser espirilos ordinarios, y dando lugar, á favor de divisiones reiteradas, á la forma de origen ó coma-bacilo.

Tan singular modo generativo que, á decir verdad, desvía de todos los procedimientos de reproducción conocidos en los *schyromicetos*, ha sido, según afirmación del Dr. Ferrán, repetidas veces observado por él (*de visu*) en los cultivos puros del coma-bacilo en el caldo biliar.

No cabe negar la existencia de los muriformes, ni la de espirilos

gruesos con apariencia de contener esporos. Repetidas veces los hemos descubierto en los cultivos del Dr. Ferrán y en los nuestros; pero cabe discutir la significación de estas formas y averiguar hasta qué punto son admisibles las interpretaciones del bacteriólogo español.

Con el propósito de estudiar á fondo esta cuestión, sin partido previamente tomado, y sin esos apasionamientos que tan mal sientan en los hombres que sinceramente se dedican á la inquisición de la verdad, comenzamos nuestras experiencias sobre los cuerpos muriformes. Los primeros trabajos (1) fueron practicados en los mismos cultivos del Dr. Ferrán, cuya condescendencia en esta parte facilitó singularmente nuestra tarea, y tuvieron por fin conservar los citados cuerpos en preparación definitiva y estudiar su comportamiento ante los reactivos.

Para cumplir con nuestro primer propósito tuvimos que modificar algo la técnica corriente, porque los muriformes se tiñen poco por las anilinas, se deforman por la desecación, y se despegan del porta-objetos durante la coloración y el lavado. El método de preparación que mejores resultados nos dió consistió en tratar una gota semi-desecada de caldo con muriformes, por el alcohol de 40°; teñir después la preparación (no desecada aun) por la hematoxilina, y por último, previa acción de una gota de ácido acético, efectuar la conservación de la glicerina. El método ordinario de impregnación de micrófitos, más atrás expuesto, es aplicable á los comas y espirilos que acompañan á los muriformes, mas no á éstos, que sufren grandes deformaciones, pierden su aspecto granuloso, y apenas si adquieren ligero matiz en el contorno, y aun aquí la coloración es irregular y discontinua, y más parece precipitación del color que efecto de verdadera selección.

Todas las materias colorantes tiñen ligeramente los muriformes; mas ninguna tiene por ellos marcada afinidad. Los reactivos del núcleo (verde metileno, ácidos, carmin, etc.) no revelan en ellos la menor huella de nucleína, ni rastro de construcción estratificada. El ácido acético les presta cierta transparencia, robándoles el aspecto ásperamente granuloso que los caracteriza. El ácido nítrico obra de igual manera, tiéndoles muy ligeramente de amarillo. El sulfúrico los palidece también, y exagera notable-

(1) Estos ensayos tuvieron lugar en los últimos días del mes de Junio último.

mente aquella apariencia de cristalización irradiada que ofrecen los gruesos muriformes. El yodo los amarillea y, con el ácido sulfúrico, los enrojece un tanto. La potasa, al 40 por 100, apenas los modifica: solamente los hace más diáfanos y en ocasiones determina en la superficie de ellos ciertas plegaduras y desigualdades nuevas: á menor proporción no logra la potasa disolverlos tampoco. El ácido clorhídrico y el nitrato ácido de mercurio les dan más transparencia. El agua, el éter y el alcohol obran exagerando su oscuridad, mas sin modificar su naturaleza. Algunas veces el alcohol determina en los muriformes una cristalización periférica en finas agujas, pero sin modificación del cuerpo propiamente dicho. El ácido ósmico los fija y conserva sin ennegrecerlos, cuando más los enmorencece ligeramente.

Como se ve, los cuerpos muriformes resisten extraordinariamente á los reactivos, siendo comparables, bajo este punto de vista, con la mico-proteína, la elastina, la plastina y la sustancia cornea. Sin duda esta resistencia química, propia hasta cierto punto de los micrófitos, ha sido una de las circunstancias en que más se ha fijado el Dr. Ferrán para estimar los muriformes como fases evolutivas del micrófito colerígeno.

Estas propiedades químicas no nos enseñan nada acerca de la naturaleza del cuerpo muriforme. Para fallar respecto de su vitalidad es preciso acudir á informes más ciertos y eficaces, tales son: los movimientos espontáneos, el crecimiento, la generación y demás actos característicos de la vida.

Así que, á fin de salir de dudas no disipadas por estas primeras experiencias químicas, nos propusimos estudiar de un modo más completo los mencionados cuerpos, fijándonos especialmente en las condiciones de su aparición en los cultivos, y en las manifestaciones fisiológicas consignadas y descritas por el Dr. Ferrán. La técnica seguida fué la misma preconizada por este bacteriólogo con ligeras modificaciones. Hicimos la siembra con cultivos en gelatina, y, después de 24 horas de incubación, abandonábamos los virgulas á la temperatura ordinaria. Por punto general, tanto cuando añadíamos caldo estéril á los tres días, como cuando dejábamos de cumplir este requisito, los muriformes aparecían en el cultivo á los 10 ó 12 días de la siembra.

Hé aquí la marcha observada en los cultivos. En los primeros días el líquido contenía casi exclusivamente comas: apenas

si era de notar alguna ese y espirilo corto. Del tercero al sexto, ya se advertían más espírilos y de mayor longitud. Un examen atento y continuado no permitió descubrir en ellos el menor rastro de cuerpos brillantes. En los restantes días hasta el décimo ninguna señal de esporulación; nada que revelara tampoco la presencia de esporos libres en el líquido. Al décimo día el campo aparecía plagado de corpúsculos de dimensión variable entre 1 y 4 milésimas, y notables por la extrema oscuridad de su contorno y su aspecto mamelonado. Entre ellos se veían algunos con todas las apariencias de los muriformes descritos por Ferrán. Por otra parte, los reactivos confirmaron nuestra sospecha, permitiéndonos identificarlos.

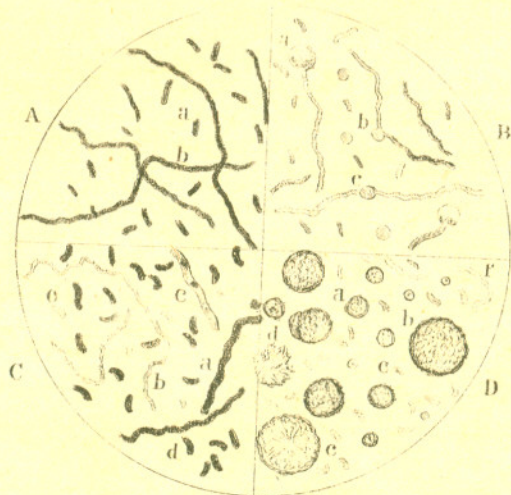


Figura 7.ª A, cultivo del vírgula en caldo de pollo claro después de varias siembras de caldo á caldo; a, comas ligeramente incurvados ó rectos; b, espírilos largos, flexuosos, cuyas ondas están apenas indicadas.—B, cultivo á la cuarta generación del coma en caldo flojo de carne; a, filamento provisto de oogono; b, oogono inserto en un recodo de un espirilo; c, oogono situado en el trayecto de un espirilo; véanse además algunos comas y oogonos libres.—C, cultivo del coma en caldo con bilis examinado en fresco al octavo día de la siembra: en él se ven comas y espírilos pálidos al lado de otros más refringentes y que tienen más aptitud por los colores de las anilinas; a, espirilo grueso y colorable; b, espirilo delgado é incolorable; c, espirilo grueso y corto con puntos brillantes que semejan esporos; d, comas incolorables.—D, cultivo del coma en caldo biliar al dozavo día de la siembra; a, muriforme incipiente; b, muriforme más grande con aspecto

tuberoso; c, muriforme con aspecto de agrupado cristalino; d, muriforme semi-desagregado; e, comas; f, espirilo pálido.—Nota. Los dos cuadrantes de la izquierda figuran preparaciones teñidas; los de la derecha, frescas.

Las preparaciones desecadas y teñidas de estos cultivos mostraron: 1.º, comas fuertemente impregnados; 2.º, comas extremadamente pálidos, sólo visibles con buenos objetivos de inmersión; 3.º, espírilos largos, delgados, pálidos, arremolinados, pero siempre independientes de los muriformes; 4.º, espírilos gruesos, más cortos é intensamente teñidos; 5.º, corpúsculos redondos, homogéneos, de tamaño vario, contorneados irregularmente por un limbo colorado, y sólo á trozos teñido. Estos últimos eran los muriformes. Jamás pudimos observar un espirilo continuado directamente con muriforme: en los casos en que aparentemente se daba esta continuidad, un buen objetivo de inmersión (1-18 Zeiss) nos hacía ver que el espirilo correspondía á un plano distinto.

La observación de los muriformes en cámara húmeda por largas horas no nos permitió percibir nunca la emergencia del chorro protoplasmático, señalado por Ferrán, ni advertir en la masa del cuerpo susodicho el menor movimiento espontáneo.

Estos hechos negativos llamaron mucho nuestra atención, y suscitaron en nosotros dudas vehementes, relativamente á la naturaleza de estos cuerpos; así que no pudimos menos de preguntarnos, si no serían acaso los muriformes simples precipitaciones, de principios orgánicos, que la gradual condensación del caldo y el incansante acúmulo de productos de desasimilación determinaban.

Nuevas experiencias y nuevos argumentos corroboraron nuestras dudas. Hé aquí algunos de los que más contribuyeron á formar nuestro juicio.

1.—*La refringencia de los muriformes.*—Ningún cuerpo protoplasmático la posee en tan alto grado. Esta no puede ser debida á la presencia de cubierta, ni á la inclusión de partículas grasientas, porque de nuestras experiencias se desprende que carece de estas dos cosas. Bajo este punto de vista, el muriforme sólo es comparable con la mielina, la keratina, la elastina, la cubierta celulósica de los corpúsculos vegetales, etc.

2.—*Los muriformes no tienen tamaño determinado.*—Es rasgo peculiar de los seres vivos la limitación en el espacio: toda célu-

la crece y se desenvuelve, hasta un cierto punto prestablecido por las causas evolutivas; y el muriforme ofrece tal elasticidad de dimensiones que sería muy difícil fijar su estatura media. En ciertos cultivos no pasan los mayores de 20 milésimas, y en otros alcanzan 50 y más.

3.—*Los muriformes grandes tienen aspecto de cristales.*—Esta apariencia se exagera después del tratamiento por los ácidos. Así el ácido acético revela claramente, previa coloración en húmedo con la hematoxilina, una cristalización estelar incolora en la masa del muriforme, destacando sobre una ganga amorfa ligeramente teñida. No es raro además observar muriformes rotos y desagregados.

4.—*El muriforme es duro, incompresible.*—Cuando se aprieta entre el porta y cubre-objeto, no se logra aplastarlo como sucede con todas las células, sino que resbala y huye como los cuerpos duros y elásticos.

5.—*El muriforme no viene precedido siempre de la apariencia esporulcr de los espirilos.*—De ser cierta la función atribuida por Ferrán á los cuerpos muriformes, éstos deberían ser siempre precedidos de aquellos espirilos con puntos brillantes que este autor considera como esporos. Ahora bien; en más de diez cultivos de caldo con bilis observados diariamente hasta la aparición de los muriformes, sólo una vez creímos ver los citados puntos brillantes. Dada esta inconstancia en su presentación (declarada por el mismo Dr. Ferrán) no puede en rigor concluirse que los muriformes dimanen de esporos transformados.

Además, existen otras razones para negar la esporulación de los vírgulas. Sabido es que los esporos resisten la desecación, y que poseen una resistencia extrema á todos los agentes exteriores. Y sin embargo jamás se obtienen, en ningun tiempo de su evolución, siembras fértiles de cultivos de comas desecados. Una preparación desecada más no teñida, procedente de un cultivo con espirilos esporularios, que debimos á la amabilidad del Dr. Ferrán, fué humedecida con caldo estéril y sembrada en gelatina sin éxito ninguno.

Los esporos terminales del coma que Ferrán ha anunciado y que otros autores (Ceci) han confirmado y descrito, no nos parecen esporos. Examinados estos comas con el objetivo 1-18 de Zeiss de inmersión homogénea, previa coloración en fresco con el da-

lia sobre el porta-objetos, se descubre que la apariencia susodicha se debe á comas en segmentación (véase más atrás nuestra descripción de las formas del caldo ordinario), cuya parte central, por ser más delgada y pálida, semeja un coma con dos nódulos terminales.

Si los vírgulas y espirilos con puntos brillantes poseyesen esporos verdaderos, deberían presentar en su seno en las preparaciones teñidas por las anilinas, espacios claros, redondos, de igual modo que los bacilos del antrax maligno, de la tuberculosis, etc.; pero no sucede así, tiñéndose uniformemente toda la masa del micrófito. Esta circunstancia la hemos podido demostrar en espirilos de apariencia esporularia, facilitados por el mismo Dr. Ferrán.

De esto se infiere que, ó no posee el coma generación esporular, ó de tenerla, sus esporos no gozan de las propiedades comunes á estos gérmenes. Sea de esto lo que quiera, es indudable que carece el coma de forma de resistencia; conclusión á que por otra parte han llegado también distinguidos bacteriólogos (Koch, Van Ermergen, etc.)

6.—*No existe relación entre el número de espirilos y muriformes.*—Hemos hallado caldos muy ricos en muriformes y escasísimos de espirilos delgados, y al contrario. Este caso no se daría probablemente si los espirilos delgados se debieran á la segmentación parcial de los muriformes.

7.—*El cuerpo muriforme sembrado no da comas ni espirilos.*—Cuando un cultivo rico en muriformes se impurifica, desaparecen rápidamente los comas y espirilos, no pudiendo resistir la concurrencia vital de otros micrófitos mejor adaptados al medio; pero los muriformes se conservan sin alteración por mucho tiempo. Ahora bien, sembrada una parte de este cultivo, en placa gelatinosa, jamás da colonias de vírgula, ni menos espirilos.

8.—*Los muriformes resisten á la putrefacción indefinidamente.*—Abiertos varios matraces con cultivos de muriformes, se les abandonó á la descomposición por 20 días. Al cabo de este tiempo no sólo no habían desaparecido, sino que eran más grandes y numerosos.

9.—*Los muriformes no cesan de crecer con la ebullición.*—Un cultivo al décimo día en que comenzaban á diseñarse estos cuerpos, fué sometido durante media hora á la ebullición, maniobra

que se repitió al siguiente día. Parecía natural que, de ser los muriformes protoplasmas jóvenes, cesasen bruscamente en su desarrollo; pero todo lo contrario, crecieron y evolucionaron como si se hubieran cultivado en ordinarias condiciones.

10.—*Los muriformes no son exclusivos de los caldos donde el coma se cultiva.*—Tomóse caldo bien nutritivo y se mezcló con bilis esterilizada; abrióse el matraz á fin de que penetrasen en él los microgérmenes de la atmósfera; se cerró después; se sometió á 37.º en la estufa, y se abandonó á sí mismo por 12 días en paraje fresco.

El caldo, examinado en preparación húmeda, mostró innumerables cocos y bacterias, y en especial un bacilo corto en cadena de gran longitud; y se dejaron ver también unos corpúsculos semejantes á los muriformes en tamaño, refringencia, aspereza, etc. El ensayo reiterado de los reactivos puso en evidencia que se trataba aquí de los verdaderos cuerpos muriformes descritos por Ferrán.

Nuevas experiencias pusieron de manifiesto que los mencionados elementos no aparecen en la bilis con caldo simplemente esterilizado y conservado indefinidamente; ni se presentan tampoco en los cultivos del coma en otros terrenos, como el caldo sencillo, la gelatina, el suero, etc.

Los corpúsculos que algunas veces se descubren en el caldo ordinario y la gelatina no nos parecen idénticos á aquéllos. Así que no puede menos de pensarse si algún principio biliar se combina con productos elaborados por los micrófitos, ó si ciertas sustancias de desasimilación de éstos, hallando en el medio biliar menos condiciones de solubilidad que en el caldo ordinario, son precipitadas bajo la forma mencionada; opinión que abona el hecho harto significativo de aparecer los muriformes solamente tras largos hospedajes de microbios en el terreno de cultivo, cuando éste se ha concentrado por evaporación, y las ptomainas y demás productos análogos se han acumulado en notable cantidad.

Por todas estas experiencias y razones, entendemos que los cuerpos muriformes descritos por Ferrán no son cuerpos vivos, sino concreciones orgánicas de una materia dura, resistente á los reactivos, amorfa unas veces, cristalina otras, y cuya naturaleza química no es posible determinar en el estado actual de la cien-

cia, aunque todas las semejanzas parecen colocarla entre las amidas y demás productos de desnutrición del protoplasma.

En cuanto á los espirilos delgados y pálidos, descritos por Ferrán en los caldos biliares, existen realmente; pero no nos parece justa la interpretación que este autor les da. Lejos de ser las formas más jóvenes, nos parecen ser justamente las más viejas. Es sabido que, cuando el terreno de cultivo se agota á consecuencia del largo mantenimiento de una especie, los microbios se achican, se hacen menos colorables por los reactivos, menos refringentes, hasta que por fin se fragmentan, reduciéndose á granuaciones irregulares y pálidas. Esto es, á nuestro juicio, lo que sucede también en los cultivos viejos del coma, únicos que ofrecen los espirilos pálidos. Un hecho que abona esta conclusión es que, al lado del vírgula colorable, existen también en estos casos comas incolorables, á veces deformados y extremadamente pálidos.

**Cultivo del coma en caldos claros.** Si en vez del caldo fuerte de carne se utiliza uno flojo de pollo como terreno de cultivo, y se practica la siembra de caldo á caldo por varias generaciones, al cabo de algún tiempo la descendencia del vírgula se desvía un tanto de su forma originaria. Los comas poseen curvadura menos pronunciada y son más grandes, y, sobre todo, los espirilos alcanzan una abundancia y desarrollo extraordinarios, siendo de notar lo poco pronunciado de sus ondas, circunstancia que presta á estos filamentos notable semejanza con los *leptotrix*. (Fig. 8, B.)

Modificando ligeramente el anterior procedimiento (siembra de caldo á caldo flojo de carnero durante cinco ó más generaciones, incubación corta á 37º, abandono después á menos de 15 centígrados), el Dr. Ferrán ha logrado demostrar en las culturas ciertas formas muy notables, cuya significación no ha podido aclararse todavía.

Consisten éstas en unos abultamientos esféricos, ora libres, ora prendidos del tallo de los espirilos. Los hay de dos clases, homogéneos y con diferenciación. Los primeros son hialinos, redondeados, visiblemente continuados con la masa protoplasmática del espirilo, del cual parecen ser simples dilataciones. Yacen, en su mayor parte, en el trayecto del espirilo, bien en su parte media, bien al nivel y por fuera de una inflexión de éste, como adheridos al ángulo saliente; y se ven también algunos

insertos en los extremos, semejando á frutos pendientes de su tallo. Los diferenciados están situados en un cabo del espirilo, y ofrecen dos zonas: una hialina periférica de forma semilunar ó hemiesferoidal, constituida por un líquido extremadamente diáfano y limitada por delicadísima cubierta, tan delgada y diáfana que apenas puede percibirse; y otra central más irregular, continuada directamente con el protoplasma del espirilo, de cuyas propiedades ópticas y químicas participa.

La figura total se ha denominado *oogono*, la zona transparente periférica *periplasma* y *oosfera* el protoplasma retraído del centro, designaciones con que el Dr. Ferrán ha bautizado estas partes por su semejanza con las que integran el ovulo de las *peronospóreas*.

Tratada una preparación de oogonos por la desecación y la coloración á las anilinas, la testura indicada desaparece, tiñéndose solamente la oosfera y los oogonos no diferenciados, y sufriendo graves deformaciones.

¿Qué son los oogonos? ¿Son formas monstruosas debidas á las excepcionales condiciones de cultivo en que se coloca al coma-bacilo para obtenerlas? ¿Son simples dilataciones accidentales del protoplasma con ó sin desprendimiento de la cubierta, debidas á fenómenos locales de involución? Realmente satisface poco al entendimiento esta interpretación, pues las formas involutivas que conocemos en algunos micrófitos (*amilobacter*, *bacterium cyanogenum*, etc.), no desvían tanto de la forma originaria, y, sobre todo, no presentan una tan acabada diferenciación.

El Dr. Ferrán supuso en un principio que tales disposiciones constituían el órgano generador de una *peronospórea*, pero abandonó después la idea en vista de la imposibilidad de enlazar etiológicamente estas formas con los cuerpos muriformes.

Por nuestra parte, consideramos muy lógico prescindir de toda relación entre los oogonos y las formas con esporos, desde que hemos observado que jamás se presentan aquéllos en los caldos con bilis ni en los cultivos con muriformes.

¿Son los oogonos simples bosquejos de una evolución incapaz de completarse en los terrenos artificiales de cultivo (caldo, gelatina, agar-agar, etc.), pero que en las naturales infusiones de las aguas del delta del Ganges, pátria del vírgula, alcanzarían todo su desarrollo dando margen quizá á nuevos procederes generativos?

En el estado actual de la ciencia no es posible contestar satisfactoriamente á estas cuestiones. Sólo un conocimiento perfecto del estado natural del coma-bacilo podría resolver este problema, hoy envuelto en las más espesas sombras.

### CAPÍTULO III.

CONDICIONES DE VIDA DEL COMA-BACILO.—DESINFECTANTES.

**1.—Influencia de la temperatura.** *El coma-bacilo sucumbe de ordinario en los cultivos cuando la temperatura llega á 65 centígrados.*—Para demostrarlo, fué elevándose gradualmente la temperatura de una estufa donde había depositado un cultivo puro en caldo del bacilo vírgula. Desde los 40° en adelante se sembró sucesivamente en varios tubos de gelatina semilla del matraz, y los vírgulas se mostraron fértiles hasta los 65 grados.

**2.—Influencia de la desecación.** *La desecación reciente no mata al vírgula.*—Sembróse el coma en placa gelatinosa, y una vez desarrolladas las colonias (48 horas) se abandonó el cristal á una corriente de aire hasta la desecación de la gelatina. Transcurridos dos días, reblandeciéronse las colonias con una gota de caldo tibio, y sembróse el contenido de ellas en tubos de gelatina: en ninguno apareció el cultivo característico de este micrófito, por más que en algunos germinasen otras bacterias. Inoculóse también, de igual manera, una colonia semidesecada, todavía viscosa: las siembras resultaron fecundas.

Estas experiencias ejecutáronse del mismo modo con el caldo seco de larga fecha y con el recientemente desecado: los resultados fueron idénticos. La gota de caldo apenas evaporada, fué avivada por la simple proyección sobre ella del aliento, como lo probaron las siembras fértiles en gelatina; mas las inoculaciones ejecutadas con vírgulas secos de una hora no fueron seguidas de germinación. Estos resultados tienen especial importancia. Por ellos se ve cuán de temer es el contacto con utensilios, ropas, etc., manchadas por deyecciones recién desecadas ó á medias evaporadas; igualmente que fiar á la desecación, cuando las manos del médico ó de los asistentes se manchan con productos coléricos, una desinfección á que se opone la humedad natural del epidermis.

**3.—Necesidad del aire para la vida del vírgula.** Aunque este micrófito pasa por aerobio, no es tan exigente como otras especies por el oxígeno libre, pues en realidad vive y prospera en medios muy poco ricos en aire. Un litro de caldo hervido y no agitado, apenas encierra aire en su masa, y, sin embargo, sembrado el vírgula en la superficie del líquido y colocado el caldo en la estufa, al siguiente día de la siembra se encuentran casi tantos vírgulas en las zonas profundas como en las superficiales.

Cuando se inoculan profundamente en gelatina algunos pocos vírgulas, cada uno de éstos forma colonias aisladas, y todas, tanto las superficiales como las profundas más alejadas del aire, se desenvuelven perfectamente; solamente se advierte que estas últimas vejetan con más lentitud.

¿Puede con esto afirmarse que el coma es aerobio y anaerobio á la vez, según las condiciones del terreno? Nosotros nos inclinamos á pensarlo así, sobre todo considerando las débiles proporciones de aire que encierra el contenido intestinal, y la vida próspera y fecunda que en este medio alcanza el coma-bacilo.

**4.—Acción del agua común.** Es bien sabido desde las notables investigaciones de Koch, que dieron por resultado el hallazgo del vírgula en un *tenck* indiano á donde iban á parar todas las excreciones de los coléricos de una aldea, que el coma-bacilo no sucumbe, aunque permanezca algún tiempo en contacto con el agua, con tal de que ésta posea alguna cantidad de materias orgánicas.

A fin de asegurarnos de este hecho hemos sembrado varias gotas de caldo con vírgulas en agua esterilizada. A los diez días de hecha la siembra todavía contenía el líquido vírgulas vivos, como lo probó la inoculación seguida de buen resultado en las placas de gelatina.

No posee tanta resistencia el vírgula cuando se siembra en un medio sin materias orgánicas, el agua destilada por ejemplo; á las veinte y cuatro horas no es ya inoculable. En el agua común hervida sembrada con aguja de platino no viven más que tres ó cuatro días.

Estas experiencias prueban que la vida del coma es muy efímera en el agua poco aereada y pobre en materias orgánicas; pero esto no autoriza á suponer que suceda lo propio en las

aguas corrientes y estancadas, donde jamás puede ni agotarse el oxígeno, ni faltar materias orgánicas continuamente renovadas.

Si el vírgula puede vivir en las aguas, ocurre naturalmente preguntar: ¿se le halla en los ríos, canales, estanques, etc., donde van á parar las deyecciones de los enfermos en época de epidemia? Las modernas observaciones acerca de la marcha de la epidemia colérica nos enseñan que si en muchos casos la propagación se debe, de un modo directo, al hombre enfermo y las cosas manchadas por él, más frecuentemente es achacable á las aguas contaminadas procedentes de puntos donde reside la epidemia.

La trasmisión del cólera en la provincia de Valencia y Zaragoza lo prueba de un modo perentorio. En aquella provincia inicióse el cólera en Játiva é inmediatamente después fueron invadidas las poblaciones de Sueca, Cullera, que toman las aguas del mismo río, pero por debajo de Játiva. Carcagente, que bebe agua de manantial, libróse por mucho tiempo del azote colérico, á pesar de estar materialmente cercado por pueblos epidemiados. En la provincia de Zaragoza, el cólera se inició en Ricla y fué invadiendo todos los pueblos de la ribera del Jalón, pero solamente río abajo. Calatayud, que está por encima, fué atacado mucho más tarde. Todos los pueblos que no hacían uso de las aguas de aquel río, aun que próximos á parajes epidemiados, lograron librarse por mucho tiempo del contagio. En Zaragoza comenzó el cólera poco después; pero cosa singular, las primeras invasiones recayeron en aquella parte de los alrededores que riegan con agua del Jalón. En Villanueva (Zaragoza) apareció el cólera á consecuencia de su importación por unos segadores, y la acequia que arranca del Gállego y riega el término de S. Juan y del Arrabal de Zaragoza, fué, por consecuencia, contaminada. Y el cólera llegó á S. Juan y al Arrabal y á los numerosos caseríos de la huerta del Gállego mucho antes de que hiciera sentir sus efectos en el casco de la población, que bebía agua del Canal del Ebro, tomada de este río en Tudela, es decir, por encima de la afluencia del Jalón. En el término de S. Juan, donde habíamos instalado nuestro laboratorio, era de ver cómo se libraban del cólera los habitantes de todos los caseríos que hacían uso de agua de pozos que en esta zona alcanzan gran profundidad, en tanto que eran atacados muchos de los que consumían agua de la acequia del Arrabal.

No cabe duda, pues, que el vírgula puede vivir en las aguas; pero lo demuestra realmente el análisis micrográfico?

A decir verdad, hemos practicado repetidas veces el análisis de aguas sospechosas, sin resultado alguno. No pudimos demostrar el vírgula ni en las del Júcar, ni en las del Turia, ni en la de las acequias de Zaragoza, ni en el Ebro, etc., etc. Sólo en dos ocasiones obtuvimos éxito. Fué la primera en el agua de un pozo de Valencia, perteneciente á una casa donde habían muerto algunos individuos atacados del cólera; (1) y la otra en el agua de la acequia del Arrabal de Zaragoza: en esta última, no toda el agua ofrecía vírgulas, sino solamente la de un pequeño remanso junto á la aldea de San Juan, donde recientemente se habían lavado ropas de coléricos. En estos dos casos, los vírgulas se presentaron abundantes en las preparaciones por desecación, y se hicieron evidentes por los cultivos en placa de gelatina.

En otros análisis, las aguas han presentado muchas veces formas análogas al vírgula, pero nunca pudimos cerciorarnos de la realidad de su presencia mediante el único criterio positivo, el cultivo. Por lo demás, los resultados negativos en el examen de un agua sospechosa no autorizan la afirmación de que no contiene-coma-bacilos: porque puede suceder que habiten en tan corto número (y este debe ser el caso más general) que resulten idemostrables por los procederes analíticos de la bacteriología.

**5.—Acción de los antisépticos.** Como tales consideramos á todos aquellos agentes que son susceptibles de matar los microbios á dosis cortas y en poco tiempo: si prescindimos de estas dos últimas condiciones no existe sustancia, incluso el agua, que no pueda llevar legítimamente el título de antiséptica.

Es preciso distinguir, en lo que se refiere á la acción de estos agentes, la dosis que suspende de la que destruye en absoluto la vida del microbio. La determinación de la primera tiene escásimo interés práctico; pues la desinfección de una materia contumaz cualquiera de esta suerte ejecutada no puede evitar que uno de estos gérmenes adormecidos reviva y prolifere, sin perder su virulencia al cambiar de terreno. En cambio el conocimiento de la menor dosis á que tal ó cual materia venenosa puede aniqui-

(1) Las aguas de los pozos de Valencia son muy superficiales, y, á consecuencia de la costumbre de utilizarlas para el lavado de ropas dentro de las casas, se mezclan muchas veces con los productos de los enfermos.

lar un micrófito reviste inusitado interés por las fecundas aplicaciones que resultan á la higiene y á la terapéutica.

Es indudable que determinada la localidad orgánica donde un microbio patógeno reside, y la dosis del agente tóxico que le mata, hay mucho adelantado para la institución de un tratamiento antiséptico racional; pero no hay que hacerse ilusiones acerca de la eficacia de los antisépticos en medicina. Matar el germen fuera del organismo, es decir, en las cosas, es negocio fácil y llano; destruirlo sobre el organismo lo es también, que al fin y al cabo importa poco aquí matar con los microbios las células que los sustentan; pero destruir los micrófitos en el interior del organismo, llevando á la sangre, al intestino, á los nervios, el tóxico destructor, es lo mismo que si en una batalla entre dos ejércitos, á pretexto de auxiliar á los más débiles, un tercero en discordia acabase con los unos y con los otros. Porque no debe olvidarse que los microbios son células, tan células como los elementos que pueblan los organismos elevados que les sirven de hospedaje, y están por tanto sometidos á las mismas leyes generales anatómicas y fisiológicas que rigen á la materia viviente. Y aun es más fácil destruir una célula que matar un microbio, como lo prueba la práctica diaria de la esterilización bacteriológica. Existen micrófitos que soportan impunemente la desecación, la privación de aire, una temperatura de 70°, etc., condiciones que serían fatales al protoplasma animal más resistente.

Con todo, no puede en absoluto negarse la posibilidad de que la terapéutica realice progresos en esta vía de la antiseptia intraorgánica, á despecho de tantas limitaciones é inconvenientes. Conócense agentes tóxicos para unos elementos, é inofensivos para otros, y cabe suponer que algún día tropiece el terapeuta con sustancias que aniquilen tal especie de microbios sin dañar á las células.

Aunque este ideal de la medicina haya de esperarse mucho tiempo, no por eso quedará esta ciencia indefensa en frente de las afecciones parasitarias. Si no le es dable oponerse á la vida del germen, puede atajar su proliferación y suspender quizás su actividad secretoria; y, en último término, cabe llevar al encuentro de las ptomainas elaboradas por el parásito sustancias que las neutralicen en el mismo obrador en que se fabrican, antes que á la sangre lleguen y al organismo entero contaminen.

Entre tanto que estos progresos se realizan y hasta que la

ciencia nos muestre la naturaleza de los venenos segregados por la bacteria colérica, para oponerles una medicación antidiastásica ó antiptomáica, no deja de tener interés el conocimiento de aquellos agentes más activamente destructores del vírgula; si quiera en la actualidad de estos estudios no puedan derivarse más que aplicaciones puramente higiénicas: la desinfección de las cosas, en vez de la desinfección intersticial de las personas objetivo de la patología de las infecciones.

El método que hemos empleado en estos trabajos, aun no concluidos hoy, es el siguiente: En una copa graduada echamos la solución antiséptica titulada y agregámosle una ó dos gotas de un cultivo en caldo rico de vírgulas. De esta mezcla sembramos con aguja de platino varios tubos de gelatina, si la siembra es fecunda, esto nos prueba la insuficiencia de la dosis del agente tóxico; si la semilla no vegeta es síntoma seguro de la destrucción del vírgula. A fin de no alterar las proporciones de las soluciones antisépticas por la adición del caldo semilla, mezclamos constantemente 10 centímetros cúbicos del agente parasitocida y dos gotas de aquél. El tiempo de impregnación tiene decisiva influencia en la antisepsia. Nosotros dejamos obrar sólo un minuto el líquido antiparasitario; operamos así porque nos propusimos determinar cuáles son los antisépticos que más pronto obran y son por consecuencia más ventajosos en esa desinfección rápida, única aplicable en ciertas telas y objetos delicados, y, sobre todo, en el hombre, cuyas manos se ponen frecuentemente en contacto con materias coléricas ó sus inmediatos cultivos.

Hé aquí las dosis á que algunas sustancias destruyen la vida de los vírgulas, según nuestras experiencias.

SUSTANCIA.	Tiempo de acción.	Dosis mínima que mata.
Acido clorhídrico . . . . .	1 minuto. . . . .	1 por 500.
Acido sulfúrico . . . . .	» » . . . . .	1 por 200.
Acido fénico . . . . .	» » . . . . .	1 por 200.
Acido bórico . . . . .	» » . . . . .	1 por 100.
Bicloruro de mercurio. . . . .	» » . . . . .	1 por 200,000.
Acido acético. . . . .	» » . . . . .	5 por 100.
Alcohol de 28°. . . . .	» » . . . . .	» » . . . . .
Cloruro de zinc. . . . .	» » . . . . .	2 por 100.
Sulfato de hierro. . . . .	» » . . . . .	20 por 100.
Sulfato de cobre . . . . .	» » . . . . .	1 por 600.
Nitrato de plata . . . . .	» » . . . . .	1 por 500.
Cloro . . . . .	» » . . . . .	(atmósfera á saturación).
Acido hiponítrico. . . . .	5 minutos. . . . .	» » . . . . .
Acido sulfuroso . . . . .	2 » . . . . .	» » . . . . .

El cuadro adjunto pone de manifiesto que los antisépticos más enérgicos son también los que más rápidamente actúan; y bajo este aspecto nuestras investigaciones confirman las experiencias de Koch, Nicati y Rietsch, van Ermergen. Llama la atención sobre todo el extraordinario poder microbicida del sublimado corrosivo. A dosis de 1/200,000 y aún de 1/250,000 mata los comas, sin más que un minuto de impregnación; y si se considera que parte del reactivo es precipitado por causa de sus combinaciones con los albuminóides del caldo, todavía resulta mucho menor la dosis tóxica útil en estas experiencias. Es, pues, el sublimado, el antiséptico por excelencia, y su empleo preciosísimo para el médico, y todas aquellas personas que, por razón de sus ocupaciones, se exponen al *máximum* del contagio, avalorando más sus virtudes antisépticas, la rapidez de su acción muy á propósito para las desinfecciones instantáneas, tales como las que se ejecutan por medio de lociones, pulverizaciones, etc.

El ácido fénico nos ha dado resultados menos eficaces y completos. A rápida impregnación y con dosis de 1 por 300 ó por 500, no destruye el poder vegetativo de los comas. Solamente puede confiarse en él cuando se le utiliza en proporciones mucho más grandes, 2 á 4 por 100.

Ni el ácido bórico, ni el cloruro de zinc, ni menos el sulfato de hierro son recomendables en las antisepsias rápidas. Este último agente no destruye el vírgula aún bajo dosis de un 10 por 100, por lo cual su empleo sólo en casos muy especiales podría ser de alguna utilidad.

En cambio se nos han revelado bastante enérgicos dos antisépticos muy acreditados: el nitrato de plata y el sulfato de cobre. Después del sublimado corrosivo estimamos este último agente como el más provechoso para las desinfecciones rápidas.

De las sustancias gaseosas, el cloro es el que nos ha parecido poseer la virtud antiséptica más rápida y poderosa. Después del cloro debe figurar el ácido sulfuroso, y el último de todos, por la lentitud y debilidad de su acción, el ácido hiponítrico. Por lo demás, las condiciones bajo las que estas experiencias se han llevado á cabo, han sido las más favorables para el desenvolvimiento de las virtudes tóxicas de estos agentes, procurando imitar en lo posible las circunstancias operatorias que concurren en la práctica corriente de las fumigaciones. Producimos el gas en un ma-

traz cerrado con dos tubuladuras: una destinada á dar acceso á los reactivos; otra continuada con un tubo de *ccoutchouc*, que conduce el gas á una caja depósito, donde se pone en contacto con el cultivo que se quiere esterilizar. En esta caja donde el gas alcanza un grado vecino de la saturación, se coloca un porta-objetos con una gota de caldo de vírgulas, y después de un tiempo variable de acción del antiséptico, se practican siembras en tubos de gelatina. El gas hiponítrico lo desprendemos por el proceder corriente (acción del ácido nítrico sobre el cobre): el ácido sulfuroso por la combustión del azufre, ó por la acción del ácido sulfúrico sobre el sulfato de sosa; el cloro por la reacción del ácido clorhídrico sobre el peróxido de manganeso.

Estos ensayos evidencian la utilidad de las fumigaciones como recursos destructores del parásito colérico, pero sólo cuando se practican en buenas condiciones, es decir, cuando la atmósfera puede saturarse del gas, y las materias sospechosas húmedas yacen extendidas en capa delgada y en superficies libres; circunstancia esta última difícil de llenar en la práctica diaria de la fumigación, pues á menudo las materias infecciosas alcanzan capas espesas y se cobijan en la trama de ropas, colchones y muebles, á cuyo interior no llegan sino tardía é incompletamente los vapores antisépticos (1).

También hemos ensayado otras materias no reputadas como antisépticas. El alcohol, el vino, el vinagre, la infusión de azafrán, las materias colorantes, la orina, etc., etc. El alcohol de 30° no mata por rápidas lociones los coma-bacilos, pero los aniquila seguramente después de una maceración de 10 minutos.

Si una colonia de estos parásitos se tiñe por una solución concentrada de dalia, fuchina, etc., en aceite de anilina, los bacilos detienen su vegetación y parece que han perdido su vitalidad; mas si luego se los siembra en un medio apropiado, despier-

(1) Una demostración decisiva de la ineficacia de las fumigaciones en presencia de materias infecciosas dispuestas en espesa capa obtuvimosla accidentalmente en uno de nuestros viajes. Al entrar en la provincia de Castellón, procedente de Valencia, nuestro equipaje abierto sufrió la fumigación oficial por el ácido sulfuroso a saturación ó poco menos; y aunque el gas actuó mas de media hora sobre varios cultivos en gelatina que yacían abiertos en la maleta, no pudo destruirlos ni aun retardar su evolución en lo mas mínimo. De estos gérmenes importados de la región valenciana, recogimos abundantes generaciones de vírgulas vigorosos, que aún hoy mismo gozan de buena salud.

tan de su letargo y proliferan abundantemente. En las mismas colonias teñidas de uno ó dos días puede observarse esta especie de resurrección, anunciada por la aparición en torno de la antigua masa bacilaria teñida, de un limbo de vírgulas incoloro, franjeado, que crece rápidamente, licuando la gelatina.

El vinagre fuerte, igualmente que el vino (10 por 100 de alcohol), aniquilan el vírgula en uno ó dos minutos de imbibición. Las infusiones concentradas de azafrán, de café y de té carecen de acción germicida.

El láudano puro destruye los vírgulas en un minuto; pero en este mismo tiempo son inofensivas las dosis de un 10 y un 20 por 100.

La orina, el sudor y el jugo gástrico suspenden la vegetación del coma-bacilo, pero no lo destruyen.

En resumen; de nuestras investigaciones resulta: 1.º Que los ácidos minerales suspenden y aún aniquilan los bacilos colerígenos (clorhídrico al 1 por 500, sulfúrico al 1 por 200, etc.), por lo cual el empleo de estos agentes puede ser beneficioso para esterilizar los alimentos y las aguas potables. 2.º Que el mejor y más rápido desinfectante para las cosas, igualmente que para las personas, es el sublimado corrosivo. 3.º Que el ácido fénico y el sulfato de cobre son mucho menos activos y es preciso aplicarlos en las desinfecciones rápidas á dosis fuertes (2 ó 4 por 100 en el fénico, 1 por 100 ó por 200 en el sulfato). 4.º Que el mejor medio de matar el coma-bacilo, en las cosas que pueden impunemente soportar el calor, es una temperatura de 100°, ora obtenida por la ebullición del agua, ora mediante las estufas de vapor. 5.º Que la desecación es un recurso harto engañoso para que pueda ser recomendado, atendido á que si es reciente no aniquila los microbios del cólera.

## SEGUNDA PARTE.

---

### ACCIÓN PATÓGENA DE LOS CULTIVOS

DE GOMAS.

---

#### CAPÍTULO PRIMERO.

INYECCIONES DE LOS CULTIVOS EN EL TEJIDO CELULAR,  
PERITONEO, ETC.

**Experiencia primera** (29 de Junio). Tomóse un lote de seis conejillos de Indias de tres á cuatro meses de edad, y por consiguiente, de escasa talla. Tres de ellos sufrieron bajo la piel del dorso una inyección de un cultivo puro de vírgulas en caldo. Uno recibió medio centímetro cúbico de cultivo, otro un centímetro cúbico y el tercero dos. A los otros tres conejillos se les inyectó igual cantidad de caldo de cultivo, pero sin vírgulas.

A las pocas horas después de la operación, los conejillos inoculados con vírgulas parecieron más tristes y apáticos que los otros: indiferentes al alimento buscaban un rincón donde reposar tranquilamente. Los más gravemente afectados eran los que habían recibido uno y dos centímetros cúbicos de cultivo: éstos se mostraban con el pelo erizado, y cuando se les tocaba el sitio de la inyección, que estaba ligeramente tumefacto, exhalaban plañideros chillidos. No se presentó en ninguno diarrea, cianosis, ni calambres.

A las 16 horas aumentó la postración de los más enfermos,

palidicieron sus mucosas, y enfriaron de un modo visible. Un termómetro de máxima insinuado en el recto marcó 33° (la temperatura normal del conejillo en el recto es de 38° y 5 décimas á 39°). Por fin, después de acostarse de lado, como si las piernas atacadas de parálisis se negaran á sostenerlos, murieron sin presentar diarrea ó flujo seroso en sus últimos instantes.

El conejillo que había recibido el medio centímetro de cultivo solamente, transcurridas 8 ó 10 horas, recobró el apetito y no presentó nada de particular.

Los inyectados con solo caldo sin vírgulas no ofrecieron la más mínima incomodidad.

*Autopsia.*—Practicóse en los dos conejillos muertos, y las lesiones halladas fueron tan semejantes que las reuniremos en una sola descripción.

*El tejido celular subcutáneo* de la región inoculada estaba hinchado, congesionado y como edematoso; al cortarle brotaba abundante serosidad sanguinolenta y turbia. El análisis micrográfico reveló: 1.º, comas abundantísimos, en cultivo puro y dotados de gran movilidad, pero sin espirilos, ni esporos, ni cuerpos muriformes; 2.º, algunos glóbulos rojos de forma esférica, á veces mamelonada, 1 ó 2 milésimas más pequeños que los normales, como sucede siempre que los hematíes pierden su configuración discoidea; 3.º, corpúsculos blancos granulosos, de contorno irregular, que albergaban ciertos gránulos gruesos, muy refringentes, con apariencias de gotitas de grasa: estos nos parecieron células emigrantes de esas que habitan en gran número en los tejidos flogoseados; y 4.º, unos corpúsculos diáfanos, perfectamente esféricos, de contorno correcto y pálido, de contenido homogéneo, á veces estratificado como los gránulos de almidón, de diámetro variable, y escasa refringencia. Estos corpúsculos son análogos á los que se hallan en el caldo alcalino, y son, á nuestro juicio, cristales de materias orgánicas.

De esta serosidad tomóse un poco con aguja de platino y sembróse en tubo de gelatina; á las 48 horas apareció el cultivo característico del coma y el análisis micrográfico demostró ser completamente puro.

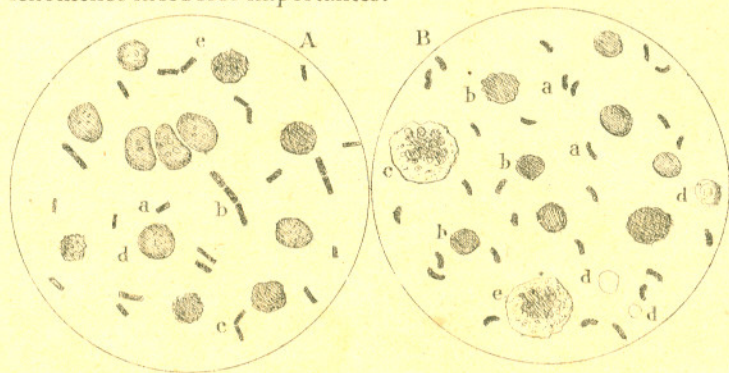
Examinóse también en la sangre, y, además de las alteraciones globulares ya dichas, era de notar cierta coloración amarillenta del plasma, debida á un principio de solución de la hemoglobina. La sangre del bazo y del hígado presentó abundantes tetraedros de materia colorante espontáneamente cristalizada; prueba inequívoca de la disolución de la hemoglobina en el suero.

El examen en fresco de estas sangres no permitió la percepción de ningún micrófito; pero la sangre desecada y teñida por el violeta de genciana reveló alguno que otro coma en escaso número, difícilmente encontrables en el corazón, algo más abundantes en la de las venas del territorio afecto. Sembrada en

gelatina la sangre del bazo, corazón y venas afluyentes de la región inoculada obtuviéronse cultivos característicos del coma.

*El hígado, el bazo, el intestino delgado*, etc., no presentaron lesión ninguna apreciable. El análisis micrográfico y bacteriológico del líquido intestinal no mostró la presencia de comas: halláronse únicamente algunas cocos y bacilos rectos que parecen existir normalmente en las heces del conejillo de Indias.

*Conclusiones:* 1.º Los efectos morbosos observados en estos conejillos fueron verosimilmente debidos á la acción patógena del báculo-virgula; pues en el tejido celular subcutáneo y en la sangre ninguna otra especie de bacteria pudo encontrarse. 2.º Una dosis de medio centímetro cúbico es tolerada perfectamente por los conejillos de pequeña talla. 3.º Una dosis de dos y aún de uno puede ser mortal en 16 á 20 horas. 4.º Los efectos mecánicos ocasionados por la inyección del caldo solo no desarrollan fenómenos morbosos importantes.



*Figura 8.\** A serosidad, del tejido celular subcutáneo de un conejillo de Indias muerto accidentalmente de edema maligno, cuatro días después de haber sufrido una inyección subcutánea de 8 centímetros cúbicos de cultivo puro de comas; a, bacilo corto; b, bacilos en cadena; c, bacilos en ángulo; d, glóbulo rojo empequeñecido y esférico; e, glóbulo rojo en serreta -- B, serosidad sanguinolenta tomada del tejido celular subcutáneo de un conejillo de Indias muerto en diez y seis horas á consecuencia de una inyección hipodérmica de 10 centímetros cúbicos de cultivo puro de vírgulas en caldo; a, comas característicos; b, glóbulo rojo achicado y esférico; c, corpúsculo emigrante cargado de granulaciones grasientas; d, corpúsculos pálidos, alguno de ellos estratificado, menos refringentes al parecer que el medio y procedentes del caldo con que se ejecutó la inyección. (Estos corpúsculos parecen ser precipitaciones de productos orgánicos, y acompañan ordinariamente al caldo alcalino).

Por lo demás, debemos consignar que, en ninguna de las ex-

perencias de esta índole practicadas después, hemos notado tan grande virulencia en los cultivos puros de vírgulas. Quizás esto se deba á lo reciente de la semilla; pues el cultivo utilizado estaba á la tercera generación: es decir, que los vírgulas inyectados procedían de una semilla tomada de placa, inoculada con deyecciones frescas de un colérico. El cultivo en caldo databa de dos días solamente.

**Experiencia segunda** (30 de Junio). Los conejillos inyectados con caldo inerte días antes, recibieron cada uno medio centímetro cúbico de cultivo en caldo, á la 5.<sup>a</sup> generación. Después de sufrir ligera incomodidad recobraron su aspecto normal.

Transcurridos 10 días (10 de Julio), tanto á éstos como á aquel otro conejillo que recibió en la anterior experiencia medio centímetro cúbico de cultivo, se los inoculó con dos centímetros: resistieronlos sin experimentar graves molestias; á las 48 horas parecían completamente restablecidos. En cambio, dos conejillos no vacunados de igual talla, que sufrieron una inyección de la misma cantidad de cultivo, sucumbieron en 24 horas, después de haber presentado los mismos síntomas que aquéllos de que ya hicimos mención en la primera experiencia.

Resulta de este primer ensayo, como muy probable, la afirmación establecida por el Dr. Ferrán de que, una inoculación de un cultivo de comas, preserva al animal de los efectos tóxicos de una nueva inoculación con una dosis doble, ordinariamente mortal para los conejillos no vacunados.

**Experiencia tercera** (18 de Julio.) Ocho conejillos de Indias de diversas tallas se inocularon con un cultivo puro de vírgulas en caldo á la quinta generación. Un adulto recibió 7 centímetros cúbicos, otro 6 y otro 5. Los restantes, de menos talla, fueron inoculados con 3 centíms. cubs. de cultivo. La inyección se verificó de una sola vez y bajo la piel movediza del abdomen.

El primer día lo pasaron los conejillos un tanto apáticos é inapetentes, especialmente los de los 6 y 7 centímetros cúbicos. El sitio de la inyección apareció duro, tumefacto, caliente y doloroso al tacto. Del segundo al tercer día recobraron todos su normalidad. La piel de la región inoculada continuaba en algunos dura, como infartada y de color violáceo; en uno formóse una escara que se eliminó á poco; en otro quedó por muchos días una tuberosidad inflamatoria; ninguno presentó flemones, ni otras complicaciones.

Trascurridos diez días, recibieron todos una segunda inyección que se hizo extensiva á seis conejillos no vacunados á fin de que sirvieran de contra-prueba. Los conejillos de escasa talla que habían sido inoculados con 3 centímetros lo fueron ahora con 6. Los vacunados con 6, 7 y 5, lo fueron entonces con 10.

Y recibieron 10 también, excepto dos más pequeños que se inocularon con 8, los conejillos no vacunados anteriormente. Todos, vacunados y no vacunados, sufrieron mucho el primer día; cosa fácilmente explicable si recordamos la viva flegmasia y el notable traumatismo que los tejidos y la piel distendida por tan enorme cantidad de líquido han de sufrir forzosamente; pero los vacunados pasáronlo mejor, tomaron alimento, restableciéndose casi completamente al segundo día. No así los no vacunados; negáronse desde luego á tomar alimento, agitábanlos ciertas ligeras convulsiones, tuvieron el pelo erizado, las mucosas pálidas y cierta algidez especialmente perceptible en las últimas dos horas de su vida. Por último, tres de ellos sucumbieron antes de las 24 horas. La autopsia denunció en el tejido celular violenta congestión edematosa; el líquido sanguinolento que llenaba las areolas del tumor ofrecía notable cantidad de comas: en la sangre del corazón no los evidenció el microscopio; pero se comprobaron por el cultivo, sembrando con pipeta una gota de sangre en gelatina.

De los otros tres conejos, dos continuaron graves hasta el tercer día en que murieron; y otro, después de permanecer inapetente y postrado varios días, recobró la salud y el apetito, á pesar de la inyección de los 10 centímetros cúbicos de cultivo que había recibido.

La autopsia de estos dos últimos conejos muertos reveló lesiones especiales muy dignas de notarse. La piel de la región inoculada (abdomen) ofrecía una hinchazón edematosa enorme y un cierto despegamiento ya reconocible al tacto. Cuando el tumor fué abierto, mostróse un vasto receptáculo situado entre los músculos y la piel, que rodeaba gran parte del tronco, y en cuya cavidad anfractuosa veíanse aquí y allá músculos desprendidos, aislados, como disecados, y un líquido turbio sanguinolento. Expansiones de esta cavidad penetraban entre los músculos del pecho disecándolos, y como macerándolos. Las partes limítrofes no disecadas estaban rojas, turgentes, edematosas.

Practicóse el análisis histológico del líquido turbio susodicho, y reveló: 1.<sup>o</sup>, glóbulos rojos en corto número, redondos y con puntas; 2.<sup>o</sup>, corpúsculos embrionarios; y 3.<sup>o</sup>, gran cantidad de unos bacilos rectos, con extremos esquinados, de longitud varia (no pasaba de 5 milésimas) más espesos que el coma y diseminados en el líquido, ora sueltos, ora formando cadena de dos, tres ó más (*Fig. 8, A.*) La serosidad contenía también hemoglobina en solución, y gran cantidad de granulaciones incolorables, quizás *detritus* de tejidos desorganizados.

La sangre de la región afecta, del hígado, del pulmón, del corazón, etc., reveló también profusión de estos bacilos; no obstante, eran mucho más abundantes en la sangre de las venas de la región inoculada que en ninguna otra parte.

Contenía también estos bacilos la serosidad peritoneal. Por lo

demás, ni el intestino, ni el hígado, bazo, etc., presentaban alteraciones dignas de notarse: únicamente llamaba la atención una ligera inyección rosácea de parte del tubo intestinal delgado, su estado de vacuidad casi completa, pues solo en su extremo superior albergaba alguna cantidad de gases y de bilis, y el volumen considerable del estómago é intestinos gruesos distendidos por gran cantidad de materias. No pudo encontrarse el susodicho bacilo recto en las heces ni entre las células epiteliales descamadas que contenían el intestino delgado.

Uno de estos conejillos era hembra y estaba en gestación: sus fetos hallaróñse muertos, y analizada su sangre no pudo demostrarse el bacilo mencionado.

De la sangre, serosidad, etc., recogida en los citados conejos, practicáronse siembras en gelatina. El bacilo prendió, formando colonias infundibuliformes, con ligera depresión superficial: mas sin burbuja. El cultivo fué tan rápido que á los dos días había disuelto gran parte del terreno, presentándose un hueco sacular, lleno de un líquido turbio, blanquecino, con precipitados en el fondo. El microscopio reveló los mismos bacilos que en la sangre, pero algo más cortos y gruesos.

Lo más notable del caso fué que ni en la sangre, ni en el tejido conjuntivo subcutáneo donde tuvo lugar la inyección pudo hallarse ningún vírgula; ni aun echando mano para su demostración de las siembras en placa gelatinosa.

Comparando estas lesiones con las que Koch ha descrito en la afección conocida con el nombre de edema maligno del conejo, y cotejando el bacilo hallado por aquel ilustre bacteriólogo con el ya descrito, nos inclinamos á pensar que los conejillos atacados fueron víctimas de esa afección bacteriana. Nuevas experiencias de inoculación ejecutadas con tierra, agua, etc., en el conejo, nos han confirmado en nuestras presunciones.

Por último, en otras experiencias de inoculación con los vírgulas, hemos observado otros dos casos de muerte, en condiciones idénticas, solamente que las lesiones eran menos extensas, los músculos no estaban tan disecados, ni desprendidos, la piel ofrecía un aspecto más sanguinolento y edematoso, y la sangre del corazón solo mostró, al contrario que en los anteriores casos, escasísimo número de bacilos rectos.

De las expuestas experiencias resulta: 1.º, que los conejillos adultos pueden sufrir impunemente una inyección de 5, 6 y 7 centímetros cúbicos de cultivo puro de vírgulas en caldo de tres días sembrado con gérmenes á la quinta generación; 2.º, que en ciertos casos y después de ofrecer graves trastornos pueden soportar una dosis todavía mayor (8 ó 10 centímetros cúbicos), aunque esto es excepcional; 3.º, que los conejillos inoculados con 5, 6 ó 7 centímetros cúbicos de cultivo de comas pueden tolerar

después una inyección de 10 centímetros cúbicos; 4.º, que algunos de los conejillos inoculados por primera vez con una fuerte dosis de vírgulas, en cultivo, puro, pueden ser accidentalmente contaminados por el bacilo del edema maligno del conejo: en este caso se establece entre el coma y el bacilo del edema una concurrencia vital, de la cual sale vencedor este último, gracias á su aptitud superior de colonizar en el plasma interorgánico, desapareciendo, como consecuencia, el coma del líquido inyectado, y ocurriendo la muerte sin su concurso, ordinariamente más tarde (tres días ó cuatro después de la inoculación).

Cosa singular, ningún conejo de los sometidos á segunda inoculación con el coma nos ha presentado el edema maligno, á pesar de haber ejecutado las inoculaciones en las mejores condiciones para estas contaminaciones accidentales. ¿Será que la vacuna del coma determine cierta inmunidad para el edema maligno? En realidad, tienen ambos ciertos puntos de semejanza; su poca aptitud para vivir en la sangre, su acción sobre el hematíe y hemoglobina, etc., etc.: pero faltan nuevas experiencias para fallar aun definitivamente sobre este asunto.

**Experiencia cuarta** (1.º de Agosto). Vacunáronse cuatro conejillos pequeños (un mes de edad) con centímetro y medio de caldo con vírgulas, dos (de dos meses) con 2 centímetros, y dos grandes (adultos) con 8. De ellos, ninguno había sido anteriormente inoculado.

Uno de los medianos (vacunado con 2 centím. cúb.) murió al siguiente día, revelando la autopsia, en la región inoculada, abundantes comas, algun diplococo, hematíes esféricos, etc. No había desprendimiento de la piel ni de los músculos; solamente se mostraba aquella congestionada y edematosa. Los cultivos de la sangre fueron fecundos y se cosecharon comas en abundancia.

El intestino no mostró vírgulas, y estaba casi completamente vacío. Ninguna otra lesión apreciable en las vísceras.

Uno de los que recibieron 8 centím. cúb. estuvo abatido é inapetente hasta las 20 horas; después pareció comer y restablecerse; pero llegado á las 30 horas rechazó el alimento, se enfrió, hinchándosele el vientre y murió. La autopsia reveló las lesiones del edema maligno: glóbulos deformados; bacilos en la sangre, en la serosidad peritoneal y en la que ocupaba el receptáculo de la región inyectada; inyección rosácea del intestino delgado y vacuidad casi completa del mismo.

El otro de los 8 centímetros cúbicos estuvo grave, pero se restableció á los dos días.

Los demás conejillos recobraron en breve su normalidad.

Esta experiencia demuestra cuán varia es la virulencia de los cultivos del coma; conejos iguales en talla á los pequeños de la primera inoculación, que, como ya hemos dicho, murieron á consecuencia de una inyección de 1 centímetro cúbico de cultivo puro, se los ve ahora resistir 2 centímetros cúbicos. De los dos conejos inoculados con 8 centímetros cúbicos, uno se salvó y el otro probablemente habría también sobrevivido si no hubiera sido contaminado accidentalmente por el bacilo del edema.

**Experiencia quinta.** Dos conejos comunes fueron inyectados con 10 centímetros cúbicos de cultivo puro de vírgulas en caldo. Prodújose bajo la piel enorme hinchazón caliente y dolorosa. Efecto de la flegmasia determinada, mostráronse un tanto abatidos; mas al siguiente día recobraron las fuerzas y el apetito. Gran parte del líquido había desaparecido.

Repetióse esta misma experiencia con conejos de más pequeña talla, los cuales resistieron también la misma dosis sin mostrar graves trastornos.

Dos gatos (de 15 días de edad) sufrieron una inyección de 3 centímetros de cultivo puro del vírgula. El primer día pasáronlo aplanados con el pelo erizado y quejumbrosos, pero á poco se restablecieron.

Experiencias idénticas en perros, pollos, etc., nos han demostrado que el vírgula no encuentra condiciones de existencia en el tejido celular subcutáneo de estos animales, y que no reproduciéndose sino limitadísimo, sus efectos tóxicos se concretan á poquísima cosa. En cuanto á los productos elaborados por los comas y que con éstos penetran en el tejido conectivo, no parecen ejercer una acción tóxica determinada.

#### INYECCIONES PERITONEALES.

**Experiencia sexta** (2 de Agosto). Tres conejillos vacunados con 5 centímetros cúbicos de cultivo y revacunados con 10 centímetros cúbicos, sufrieron la inyección peritoneal de otros 10 centímetros cúbicos de una cultura pura de vírgulas en caldo. Inmediatamente después de la operación experimentaron ciertos temblores y convulsiones parciales especialmente de los músculos del cuello, cayendo inmediatamente en grandísima apatía. El pelo erizado, la mirada triste, la repulsión del alimento, la actitud de reposo descansando sobre el vientre, con las patas separadas, y más adelante, á las 24 horas de la inoculación, algidez marmórea, respiración fría y ansiosa, orejas y mucosas pálidas, convulsiones ligeras de las extremidades, fueron los síntomas más salientes que presentaron hasta su muerte ocurrida, en uno, á las 23 horas de la operación, en los otros, á las 34 y 36. La temperatu-

ra del recto en las últimas horas no pasó de 30°. No hubo diarrea; pero sí vómitos biliosos en dos. Después de la muerte derramóse en la abertura uretral una orina cetrina, espesa, como albuminoide.

Durante la vida habíase observado la sangre de la oreja. Los hematíes eran normales; sólo se notaba cierta disolución de la hemoglobina y algunos cristales aislados de esta materia.

La autopsia reveló en todos ellos el peritoneo inyectado y conteniendo en su cavidad un líquido seroso sanguinolento filante, que contenía: 1.º Glóbulos rojos deformados en estrella. 2.º Comas en abundancia. 3.º Bacilos cortos y rectos en corto número. La sangre sólo los ofrecía en cortísima cantidad. El intestino grueso estaba distendido por heces normales y gases; el delgado hiperemiado y con bilis en abundancia; en él no existían vírgulas; el estómago repleto de materias medio digeridas.

**Experiencia séptima.** Cuatro conejillos de Indias adultos sin vacunar y cuatro vacunados recibieron una inyección de un cultivo puro de vírgulas en la cavidad peritoneal. De los sin vacunar, uno la sufrió de 2 centímetros cúbicos, dos de 5 y otro de 10. Antes de las 24 horas murió uno de los inoculados con 5 y el inoculado con 10. Este último apenas vivió 12 horas.

La autopsia comprobó en el peritoneo la existencia de una gran cantidad de líquido turbio, filante, no coagulable, esparcido por todo el abdomen. Examinado al microscopio este licor, se vió que estaba literalmente lleno de vírgulas, que gozaban de gran vivacidad: veíanse también eses y espirilos cortos, y algunos hematíes esféricos y pequeños. La sangre del corazón, del hígado, etcétera, reveló algunos comas, fácilmente demostrables por la coloración por el dalia. Sembróse sangre y serosidad peritoneal en gelatina estéril y obtuviéronse excelentes cultivos de comas.

El intestino, completamente normal; su contenido sin vírgulas. Los demás órganos al parecer íntegros y fisiológicos; solamente los epíplones aparecían algo hinchados y edematosos.

Los vacunados fueron sucesivamente inoculados en la cavidad abdominal con 6 centímetros cúbicos. Uno de ellos lo fué con la serosidad llena de vírgulas recientemente extraída del conejo muerto, de que hemos hecho mención. Repusieronse todos en breve, excepto dos que sucumbieron antes de las 24 horas. Uno de éstos era el inoculado con serosidad. La autopsia reveló vírgulas en uno, mas no en este último, en el cual sólo pudieron á duras penas hallarse algunos bacilos rectos en la serosidad peritoneal, y ninguno en la sangre. ¿Cómo se explica esto? Porque es de advertir que este conejillo recibió en la cavidad peritoneal 6 centímetros de serosidad llena de vírgulas. ¿Murió exclusivamente por los productos tóxicos elaborados por el coma después de haber desaparecido éste por desorganización? ¿sucumbió á la septicemia? No es fácil decidirlo; solamente indicaré que el lí-

quido peritoneal era abundante y que el cortísimo número de bacilos rectos que contenía no explica fácilmente una muerte, tan rápidamente llegada; tanto más cuanto que no se pudo demostrar lesión visceral ninguna.

Aunque estas dos últimas experiencias no son terminantes, prueban á nuestro juicio que el vírgula es más patógeno en el peritoneo que bajo la piel, y que la inmunidad que la vacuna concede á un conejillo, no parece hacerse extensiva á todas las regiones del cuerpo por donde el ataque del coma pueda venir; puesto que ya hemos visto sucumbir dos conejillos con solos 5 centímetros cúbicos de cultivo, siendo así que inyectados por otra vía pueden resistir 8 y 10 centímetros cúbicos. De todos modos, sólo experiencias repetidas y más concluyentes, podrán resolver esta cuestión envuelta todavía en sombras y vaguedades.

#### INYECCIÓN DE CULTIVOS HERVIDOS.

**Experiencia primera** (10 de Julio). Comenzó por elevarse á 100°, en baño maría, un cultivo de comas en caldo al cuarto día de la siembra. Tomáronse seis conejillos, tres de un mes de edad, y otros tres de dos meses. Los primeros fueron inonulados con 3 centímetros cúbicos del cultivo hervido; los segundos con 5 centímetros cúbicos. Pusiéronse en observación en un departamento especial. El primer día pasáronlo tristes, abatidos, repugnando el alimento, y quejándose cuando se les tactaba el sitio de la inyección. Pero, al finar las 24 horas, recuperaron el apetito y la movilidad natural, sin mostrar la menor alteración funcional. La región inoculada de la piel, al principio fuertemente tensa y dolorosa, adquirió presto pastosidad y blandura, desapareciendo toda tumefacción al terminar el tercer día.

Ocho días después, recibieron estos conejos una inyección de 3 centímetros cúbicos de cultivo de comas vivos á la tercera generación y á las 24 horas de siembra. Todos ellos soportaron perfectamente esta inoculación, aun los conejillos más pequeños de un mes y días de edad, que en otros casos no resistieron á 2 centímetros cúbicos de cultivo puro de comas.

**Conclusiones.**—Parece probable que no es el vírgula precisamente el que presta inmunidad al organismo de los conejos para nuevas dosis más potentes de cultivos, sino ciertos productos engendrados por él, no descomponibles á temperatura de 100°. Y es de notar también que estos animales de pequeña talla, que sin previa vacuna no tolerarían una dosis de 5 centímetros cúbicos de cultivo de vírgulas vivos, apenas sienten efectos morbo-

sos cuando reciben hervida esta misma cantidad. Por lo cual no es aceptable la opinión sostenida por el Dr. Ferrán y el Dr. Van Enmergen que atribuyen los efectos tóxicos de las inyecciones subcutáneas de grandes cantidades de cultivos en los conejillos de Indias á la sola influencia de las ptomainas ingeridas: es preciso aceptar que el vírgula puede vivir y proliferar hasta ciertos límites en el tejido conjuntivo del conejillo, segregando nuevas materias tóxicas que se adicionan á la que ya llevaba el cultivo inyectado; esto es evidentísimo en las inyecciones peritoneales (en 24 horas hemos visto en un caso producirse 30 centímetros cúbicos de cultivo concentradísimo en la serosidad exudada), á lo cual quizás sea debida su excepcional gravedad. Si sólo fuese el veneno inyectado con el vírgula el responsable de los fenómenos morbosos que sobrevienen, no se concibe como no los producen también los caldos hervidos en igualdad de cantidades, los filtrados por el filtro Chamberland, y las inoculaciones á dosis masivas en el gato y conejo ordinario, cuya diferencia estructural con el conejillo indiano no es tanta que autorice á pensar que un veneno mortal para éste sea absolutamente inofensivo para aquél (1).

**Experiencia segunda** (20 de Julio al 1 de Agosto). Inoculáronse bajo la piel del dorso cinco conejillos, dos pequeñitos (de mes y medio) con 5 centímetros cúbicos de caldo hervido, dos grandes con 10 del mismo cultivo, y con 12 uno vacunado y revacunado que había sufrido ya una inoculación duodenal 20 días ántes.

Ninguno tuvo novedad digna de mentarse.

Transcurridos 10 días, se inocularon todos con un cultivo de comas en caldo al segundo día de sembrado. La dosis para cada cual fué la misma que en la anterior operación: el que había recibido 5 de caldo hervido, inoculóse con 5 de cultivo de vírgulas vivos, el que con 10, con 10, etc.

A fin de que la experiencia fuese más concluyente inyectóse á dos conejillos no vacunados 10 centímetros cúbicos de cultura viva.

Este experimento fué concluyente: ninguno sucumbió excepto éstos dos últimos que no habían sido vacunados.

En la autopsia que se practicó evidenciáronse las mismas lesiones ya descritas en otra ocasión, y de la sangre y serosidad, obtuviéronse cultivos característicos de comas.

(1) El mismo Ferrán asegura haber inyectado sin resultado alguno 12 centímetros cúbicos de cultivo de vírgulas filtrado. Nosotros hemos comprobado la exactitud de esta experiencia.

*Es de notar en esta experiencia:* 1.º Lo inofensivo de los cultivos hervidos que apenas produjeron trastornos á la dosis de 5 centímetros cúbicos á conejillos de escasísimo volumen como los de mes y medio de edad. 2.º Que estos mismos conejillos, que hubiesen sucumbido seguramente á una dosis de cultivo vivo de 2 centímetros cúbicos, soportasen perfectamente 5 y 3.

Nuevas experiencias practicadas posteriormente y seguidas de iguales resultados, ponen, á nuestro juicio, fuera de duda que la sustancia ó sustancias que el caldo lleva, y no los vírgulas, son la causa de la inmunidad que al conejo presta una primera inyección de comas vivos y que en todo caso puede sustituirse la inyección de éstos por la de aquellas sustancias, con ventaja positiva para el conejo, que las soporta mejor y no corre tanto riesgo de ser contaminado accidentalmente por otros gérmenes patógenos.

**Experiencia tercera** (5 de Setiembre). Tomáronse deyecciones frescas de colérico y abandonáronse 24 horas á cultivo espontáneo. Hirviéronse después y se inyectaron á dos conejillos á dosis de 6 centímetros cúbicos.

Parecieron algo molestos los animales en las primeras horas; mas no tardaron en volver á su estado normal.

Ocho días después inyectamos 8 centímetros cúbicos de un cultivo puro de vírgulas sumamente rico. Aguantáronlo éstos sin ofrecer síntoma alguno digno de mención.

Esta experiencia parece probar, que las deyecciones poseen como los caldos de vírgulas la misma sustancia que presta inmunidad. Empero no habiendo podido repetir nuevamente la experiencia (practicóse en Zaragoza al final de la epidemia), no osaremos deducir consecuencia ninguna importante. Con todo, ellos demuestran que los venenos existentes en las deyecciones no son bastante activos para matar á dosis considerables al conejillo de Indias, á menos que no se suponga que la ebullición los ha descompuesto y desnaturalizado.

#### EXPERIENCIAS EN EL HOMBRE.

Las inyecciones subcutáneas del cultivo puro de vírgulas en el organismo humano fueron por primera vez ejecutadas por el Dr. Ferrán y su discípulo Pauli, en sí mismos, comenzando por dosis ligeras y ascendiendo gradualmente hasta un centímetro cúbico, y aun dos, cantidad que puede tolerarse impunemente.

Los efectos de estas inoculaciones son harto conocidos para que insistamos mucho en su descripción.

Expondremos los que en mí mismo he podido experimentar en dos inoculaciones sufridas, una de mano del Dr. Ferrán con uno de sus cultivos, y otra de propia mano, y con una cultura en caldo perfectamente pura, de mis cosechas de comas, á la tercera generación.

La inyección verificóse la primera vez en el tejido celular subcutáneo del brazo en cantidad de 2 centímetros cúbicos. Excepción hecha de la vaga sensación de quemadura que se experimenta al practicar la inyección, nada anuncia durante las dos ó tres horas subsiguientes la penetración en el organismo de una sustancia tóxica y de un microbio patógeno. Inicianse los síntomas por el aumento del dolor en la región posterior del brazo, y por el entorpecimiento en los movimientos de extensión. Exacerba el dolor al menor roce ó contacto, y se buscan instintivamente aquellas actitudes que ponen á la región más al abrigo de toda violencia. Poco más tarde (4 ó 6 horas después de la inoculación) que el dolor se exagera, inicianse los fenómenos generales. Consisten éstos en una ligera fiebre pocas veces precedida de escalofrío, acompañada de ligera cefalalgia, inapetencia, sensación de malestar, inquietud y otros síntomas menos constantes, como las náuseas, calambres, y en casos muy especiales y raros, diarrea. El máximum de estos efectos corresponde 8 ó 10 horas después de ocurrida la inyección. A las 24 horas ó antes comienza á disminuir la fiebre, la cefalalgia y el malestar, sobreviniendo un sudor más ó menos copioso que pone remate á los fenómenos generales.

Al siguiente día, el apetito se restablece, el quebrantamiento general se disipa, y el dolor de los brazos, que molestaba en las primeras 12 horas hasta el punto de hacer imposible el sueño, cede también, recobrando el codo su flexibilidad y el brazo sus funciones.

En la región inyectada existe ligero infarto rojizo, un tanto doloroso á la presión, cuya existencia suele prolongarse tres ó cuatro días.

Es indudable que gran parte de estos síntomas son debidos á la enérgica flegmasia sobrevenida en el sitio de la inyección, por efecto sin duda de la irritación causada por las ptomainas ó pro-

ductos elaborados por el vírgula. Algunos otros, la ansiedad, el malestar, las náuseas y en ciertos casos los calambres son efecto de la absorción de aquellos productos? Es probable, pero no es cosa demostrada.

Hemos verificado el análisis micrográfico de la sangre en el paraje de la picadura, y en el pulpejo de los dedos, 10, 14 y 24 horas después de realizada la inoculación. En ningún caso hemos podido demostrar la existencia de vírgulas ni por el examen directo ni por los cultivos. Creemos que la vida del vírgula en el tejido celular es extremadamente fugaz, y que al contacto con los elementos de los tejidos este parasito se fragmenta y reabsorbe. Sin embargo, juzgamos muy probable que algunos vírgulas, á la manera de lo que sucede en el conejo de Indias, lleguen accidentalmente al torrente sanguíneo, y en él sucumban incapacitados de vivir en este terreno, pero deben ser escasísimos en número, puesto que el cultivo no puede evidenciarlos. Una cosa análoga acaece en el conejillo cuando se inocular con una dosis pequeña y tolerable de cultivo. Los vírgulas tan numerosos en el tejido conectivo de la región inyectada, no pueden descubrirse en la sangre; pero si se fuerza la dosis y resultan efectos tóxicos, el coma invade ó al menos llega pasivamente á la sangre, donde no falta jamás en los casos graves.

Los análisis de la diarrea, que accidentalmente ha presentado algún vacunado, no nos han permitido descubrir el bacilo vírgula, resultado negativo por otra parte previsto, pues no es de pensar que un micrófito que no vive en la sangre pueda arribar desde la piel al intestino y vegetar en él.

Cuando un inoculado sufre, 5 ó 6 días después, otra segunda inoculación con la misma cantidad de cultivo, los efectos locales suelen ser los mismos, pero los generales son menos graduados, y aun pueden faltar en absoluto. Sin embargo, sobre este particular se conocen excepciones, y sabemos de muchos, que todavía han sufrido más á consecuencia de la segunda que de la primera inoculación. Estas irregularidades pueden depender de la desigual virulencia del cultivo de la primera y segunda vacuna. Habrá ocurrido quizás, en algunos casos, que la segunda vacuna, por datar de 6 ú 8 días ó por otras condiciones, encierre tan gran cantidad de comas y sus productos que la acción profiláctica de la primera resulte deficiente. También cabría explicar estas in-

constancias por lo escaso de la dosis utilizada en las inoculaciones, como sucede en el conejillo indiano cuando, en lugar de inyectar una dosis preservativa de 2 ó 3 centímetros cúbicos, es vacunado con 1/10 de centímetro cúbico, por ejemplo. Suponiendo que 2 centímetros cúbicos sean el minimum susceptible de producir efectos preservativos, toda condición que tienda á rebajar esta dosis, bien absoluta, bien relativamente, aniquilará la acción profiláctica. Así una cantidad dada podrá determinar efectos profilácticos en un individuo de pequeña estatura y no en otro de opuestas circunstancias. Un cultivo recién sembrado y pobre en comas, no determinará tampoco inmunidad en un sujeto de mediana estatura y regular volumen, etc. Hubiera sido de desear que individuos recién curados de un ataque colérico, se hubieran sometido á las inoculaciones ferranianas. No tenemos noticia sino de un solo caso en que apenas se sintieron los efectos de la vacuna; pero no es posible deducir de esto, sin más amplia experimentación, consecuencia ninguna positiva.

**Conclusiones.** 1.<sup>a</sup> El microbio vírgula de Koch cuando es inyectado en cantidad considerable en el peritoneo, en el tejido celular sub-cutáneo del conejo de Indias, produce efectos tóxicos especiales.—2.<sup>a</sup> Estos efectos, aunque mucho menos graduados, han sido producidos en el hombre.—3.<sup>a</sup> La acción tóxica indicada es debida al cultivo del vírgula en el tejido conjuntivo y en los plasmas inter-órganicos; pues que ni los cultivos hervidos ni los filtrados los producen.—4.<sup>a</sup> El vírgula vive mal en el tejido conjuntivo donde, ingerido á pequeñas dosis, desaparece rápidamente, prospera algo más en el plasma peritoneal, y no tiene aptitud para desenvolverse en la sangre. En este líquido sólo se le halla forzando considerablemente las dosis; pero nunca se le encuentra en él cuando la inoculación se realiza, como sucede en el hombre, á dosis moderada.—5.<sup>a</sup> Si para producirse efectos tóxicos requiérense dosis masivas, el vírgula no es un microbio propiamente patógeno del tejido conectivo, linfa, sangre, etc.—6.<sup>a</sup> No pasando sino rara vez el vírgula á la sangre, menos podrá alcanzar el intestino, y aparecer en las heces. Experiencias concluyentes lo demuestran y ningunas tan demostrativas como las inoculaciones intraperitoneales. En conejillos cuya cavidad peritoneal contenía más de 50 centímetros cúbicos de serosidad riquísima de vírgulas, y la sangre los encerraba tam-

bién, el intestino estaba vacío, normal y sin el menor rastro de estos parásitos.—7.<sup>a</sup> La ingestión de cierta cantidad algo importante de cultivos de comas, presta al organismo tolerancia para otras inoculaciones del mismo microfito á dosis dobladas y aun mortales.—8.<sup>a</sup> Estos efectos profilácticos se dan, aunque menos constantemente, en el hombre.—9.<sup>a</sup> No son los vírgulas los que otorgan la inmunidad, sino alguno de los productos que los acompañan. Esta inmunidad puede explicarse suponiendo que el coma deja en el tejido conjuntivo y, en general, en los plasmas interorgánicos, una materia, que soporta la ebullición sin descomponerse, y nociva para el ulterior desenvolvimiento de otros vírgulas.—10. Es verosímil que no se haga extensiva á todo el organismo esta acción profiláctica. Los conejillos vacunados con dosis masivas que sucumbieron después á la acción de 5 y 10 centímetros cúbicos, inyectados en el peritoneo, inducen á pensar así.—11. No cabe deducir de estas experiencias que el vírgula ú otro parásito causante del cólera sea incapaz de desenvolverse en el intestino de los conejillos y de las personas vacunadas y revacunadas; porque en realidad el tubo intestinal es parte del mundo exterior y sobre él pueden no tener influencia esas sustancias preservadoras elaboradas por el vírgula.

## CAPÍTULO II.

### ACCIÓN PATÓGENA DEL VÍRGULA EN EL TUBO INTESTINAL

#### DE LOS CONEJOS DE INDIAS.

Inmediatamente después de anunciado el descubrimiento de Koch, que enlazaba la patogénia del cólera con la biología del bacilo-vírgula, multitud de observadores se dieron á investigar el poder colerígeno de estos microfitos, único punto sujeto á controversia en los trabajos del ilustre microbiólogo. Aunque parecía extremadamente probable que el coma-bacilo inyectado ó ingerido en el intestino de los animales había, en alguna especie por lo menos, de producir un estado sintomatológico al cólera semejante, ello fué que las primeras tentativas fracasaron, y el mismo Koch hubo de confesar con pena que ni en los cone-

jos, ni en los perros, ni en los monos, el coma podía desenvolverse, ni determinar, por ende, el cólera experimental.

Ensayos más afortunados de Nicati y Rietsch de Marsella y de Van Ermergen en Bélgica hicieron suponer que el problema había sido resuelto, y que la virtud colerígena del coma-bacilo podía darse como cosa demostrada. Inyectaban los primeros experimentadores, bien en el coledoco de los perros, bien en el intestino de los conejillos de Indias, cierta cantidad de un cultivo puro de vírgulas. Al cabo de algún tiempo los síntomas observados (diarrea, algidez, anuria) anunciaban que el microfito había arraigado en el intestino, y proliferado en él, de manera idéntica que en el hombre, y la autopsia ponía en evidencia, ora por el examen directo, ora por los cultivos, el bacilo colerígeno, único responsable de los accidentes ocasionados. El mismo Koch pudo ahora, repitiendo estas experiencias, determinar el cólera en los conejillos de Indias, inoculando en el duodeno una centésima parte de gota de un cultivo puro de vírgulas.

Confieso que antes de comenzar mis experiencias sobre las inyecciones duodenales de comas, no abrigaba duda relativamente á la naturaleza colérica de los accidentes determinados en los conejos por hábiles experimentadores, y tanto que, al proponernos repetirlos, no llevábamos más objeto que ver si los animales que sufrían una vez el cólera experimental eran refractarios á un segundo contagio, y si los inoculados por el procedimiento Ferrán, es decir por las inyecciones subcutáneas de cultivos puros, quedaban realmente inmunes para el cólera ocasionado mediante las inoculaciones intraduodenales.

Pero nuestros primeros ensayos de colerización en los conejillos de Indias suscitaron en nosotros no pocas dudas relativamente á la naturaleza de los accidentes ocasionados, y nos advirtieron que pisábamos un terreno todavía poco firme, sobre el cual nada sólido y completo podía edificarse.

Hé aquí un resumen de nuestras experiencias:

La técnica seguida en estas inoculaciones fué la siguiente: Comenzamos por sujetar perfectamente el conejillo sobre una tela metálica, fijando sus patas por ligaduras, é inmovilizando la cabeza á favor de un cordón que, abrazando los dos incisivos superiores, se fija fuertemente á un alambre de la rejilla. Antes de proceder á la operación, afeitamos la piel de la región epigástrica, lavándola después con una solución de sublimado corrosivo.

La primera incisión la limitamos á la piel y tejido celular subcutáneo: su extensión es de 2 centímetros ó algo más, y recae sobre la línea media abdominal, medio través digital por debajo del cartílago xifoídes. A favor de una segunda incisión, incídese la línea alba y se llega hasta el peritoneo. El último tiempo consiste en cortar esta serosa, maniobra que se practica con ayuda de la sonda acanalada. Es conveniente esperar algunos minutos antes de proceder á la sección peritoneal; así se da lugar á que espontáneamente se cohíba la ligera hemorragia ocasionada por la incisión de la piel y músculos rectos, evitándose el derrame de sangre en el abdomen.

Abierta la cavidad peritoneal, preséntase entre los labios de la herida el epiplón mayor y el estómago; menos frecuentemente el hígado y el intestino delgado. Cuando aparece el estómago en la herida (caso común si la incisión se ha hecho suficientemente elevada y está el conejillo en ayunas), para encontrar el duodeno, no hay más que tirar delicadamente de aquél hácia fuera y á la izquierda: no tarda en surgir á nuestra vista el piloro y el arranque del duodeno, que se da á conocer por una dilatación ampular donde descarga el coledoco, y de donde parte el epiplón gastro-hepático. A veces, se consigue extraer el duodeno tirando con un ganchito de cristal sin punta las asas intestinales colocadas á la derecha y detrás del estómago. Si este pequeño *tour de main* tiene éxito, la operación de la inyección se practica comodamente y sin el menor traumatismo. Distinguiremos el duodeno de las demás asas intestinales en su adherencia al páncreas y en su color sonrosado amarillento que contrasta con el gris azulado de otras partes del intestino. Dispuesto el cultivo en la jeringuilla de Prabaz, se le inyecta suavemente en la dilatación ampular del duodeno en dirección al intestino. Después se verifica la táxis y se unen los labios de la herida con una sutura de *catgut*.

No usamos apósito: únicamente protegemos la herida con un tafetán engomado ó con una capa de colodión normal.

Por lo demás, el traumatismo ocasionado, es inofensivo, y la herida cicatriza perfectamente á los pocos días. La experiencia nos ha enseñado que es muy raro que ocurran accidentes y complicaciones, aun sin echar mano durante el manual operatorio de precauciones antisépticas.

**Experiencia primera.** Cinco conejos de Indias adultos recibieron, dos de ellos en el estómago y tres en el duodeno, un centímetro cúbico de gelatina líquida, procedente de un cultivo puro de vírgulas. La operación se ejecutó sin novedad, excepto en un caso en que, por consecuencia de los movimientos inusitados del animal, se hernió varias veces el intestino delgado, habiendo sido preciso practicar tres veces sucesivas la táxis.

Terminada la operación, los conejillos quedaron como aplañados, con la mirada apagada, el pelo erizado, apáticos é inapetentes; pero á las pocas horas recobraron su alegría y comenzaron á comer. Solamente aquel, cuyos intestinos sufrieron grandes zarandeos durante el manual operatorio, no mejoraba ni comía, permaneciendo horas enteras arrinconado y triste.

Al siguiente día continuaban bien, menos este último conejillo que murió á poco. La autopsia demostró extensa peritonitis con gran derrame, en el que hormigueaban numerosos bacilos y cocos. No existían lesiones intestinales ni alteraciones que hiciesen sospechar la complicación del coma en aquel funesto desenlace.

Lo demás conejillos continuaron bien. La herida abdominal, después de supurar unos días, cicatrizó perfectamente.

Esta primera experiencia, ejecutada en conejos adultos y no vacunados, prueba que no siempre se determina el cólera en estos animales por inyección duodenal, y que debe existir alguna condición oculta, que impide obrar el vírgula en determinadas ocasiones.

**Experiencia segunda.** Esta vez se eligieron ocho conejos de buena talla y en ayunas. Cuatro de ellos fueron inoculados en el duodeno con un centímetro cúbico de dilución acuosa de un cultivo puro en gelatina, y otros cuatro con un centímetro cúbico de cultivo en caldo con vírgulas á la tercera generación.

Pasado el choque operatorio, los conejos parecieron un tanto apáticos, mas no gravemente enfermos. Al día siguiente, todos estaban bien, excepto uno (inyectado con caldo) que, arrinconado y quejumbroso, rechazaba el alimento y no se movía de su sitio aunque se le tocara. La simple palpación demostraba en él cierta frialdad; el termómetro marcó 32 grados en el recto á 4 centímetros de profundidad.

A poco rato inicióse una diarrea serosa. Las heces eran inodoras, transparentes, rosadas y coagulables. El vientre se mostraba hinchado y doloroso á la presión. La respiración frecuente y ansiosa, la orina suspendida, las mucosas palidas. Por fin, echado sobre el vientre con las patas separadas, fué agitado de algunas ligeras convulsiones, acostóse de lado y murió.

**Autopsia.**—La herida no ofrecía cosa de particular, pero la cavidad peritoneal estaba llena de una serosidad sanguinolenta, abundante y notablemente espesa. El intestino aparecía inyectado y dilatado por una gran cantidad de líquido, á manera de exudado, cuya transparencia comunicaba al intestino cierta translucidez. Puesto el líquido intestinal sobre un porta-objetos se vió que era transparente con ligero tinte rosáceo, y cosa notable, se advirtió que se coagulaba espontáneamente como los exudados fibrinosos.

Examinóse este líquido, así como el peritoneal, al microscopio, primero en fresco y luego en preparaciones secas, y pudieron

comprobarse en ellos ciertos bacilos cortos, con extremidades redondeadas, á manera de bacterias alargadas. Los vírgulas, caso de existir, debían de estar en una notable minoría, pues no impresionaban á la vista, aun después de largas exploraciones.

El análisis de la sangre dió iguales resultados. La del corazón, del bazo, del hígado, de las venas superficiales, presentaba invariablemente, además de los glóbulos deformados, los referidos bacilos cortos en notabilísima cantidad y con exclusión de otras formas bacilarias.

El contenido intestinal fué sembrado en esponja y en placa de gelatina; en esta última obtuviéronse algunas colonias de comas características, prueba inequívoca de que este microbio residía en el intestino y formaba parte del líquido seroso coagulable.

En esta última experiencia, única en que el cuadro sintomático ofreció gran analogía con el del cólera, ¿cuál de los dos micrófitos hallados fué el responsable de los síntomas? ¿El bacilo recto ó el coma-bacilo? Dos hipótesis caben aquí; ó el bacilo recto penetrado accidentalmente en el intestino durante el manual operatorio, es un microbio inofensivo que se limitó á utilizar un terreno preparado por el vírgula, en cuyo caso toda la reponsabilidad de los síntomas pertenece á éste, á pesar de su inferioridad numérica en los materiales intestinales; ó el bacilo recto es una especie patógena nueva, que puede vivir en el intestino, donde desarrolla violenta flegmasia, invadiendo la sangre, y desenvolviendo un cuadro fenomenal parecido al cólera; es decir, un pseudo-cólera que algunos han tomado por cólera verdadero. Yo me inclino á sospechar lo último más bien que lo primero, sobre todo, tomando en consideración el carácter del exudado intestinal que fué sero-fibrinoso, es decir, coagulable espontáneamente; la ausencia del aspecto riciforme de las deyecciones, y particularmente la diseminación del bacilo recto en la sangre, en los líquidos serosos, en fin, en todas partes, circunstancia que jamás se da en ningún microbio inofensivo. La misma inconstancia en la aparición del cuadro morbozo señalado, se armoniza mucho mejor con la hipótesis de la contaminación accidental por un microbio patógeno, que con la opinión que atribuye los efectos al coma; pues de ser esto último valedero, no se concibe bien cómo, inoculando este micrófito en cantidad suficiente y en su natural terreno, no desarrolla el cólera experimental con esa

seguridad y fijeza con que el experimentador determina por inoculación, el mal del bazo, el cólera de las gallinas, las septicemias, etc., etc.

Además, no es nuevo el hecho de que, en casos reputados por cóleras experimentales hayan predominado bacilos rectos. Hé aquí lo que expone el mismo Van Ermergen describiendo las lesiones halladas en conejillos de Indias muertos de cólera experimental: «Los vírgulas han sido hallados en las diversas tunicas del intestino y, sobre todo, en las glándulas de Lieberkühn que tapan literalmente. Se los encuentra hasta en la serosa. Pero al lado de estos microbios se ven en las diversas tunicas y principalmente en las vellosidades *una cantidad increíble de pequeños bacilos rectos*. El animal parece haber sucumbido á una enteromycosis bien caracterizada y extremadamente intensa, como lo indica, no solamente la invasión de las tunicas intestinales, sino la presencia de estos microbios en la mayor parte de los órganos. En efecto, estos mismos bacilos cortos y rectos existen en el hígado, los riñones, en los líquidos de las pleuras, peritoneo y *hasta en la sangre*.» Este mismo autor habla en otro pasaje de la existencia en el intestino de un líquido sero-fibrinoso; con lo que ya no puede dudarse de que los bacilos rectos y pequeños observados por nosotros en casos de supuesto cólera experimental, lo fueron también por él, así como todas las lesiones concomitantes. Pero, cosa singular, en lugar de poner en tela de juicio la naturaleza colérica de los accidentes desenvueltos en estos casos, da á entender que los fenómenos coleriformes se deben al coma inyectado, y no á los microbios rectos tan preponderales.

Otros autores son más explícitos aún. Doyen y Chautemese declaran que cuando se inoculan los conejillos de Indias por la vía duodenal no ofrecen nada de particular, á no ser que, como consecuencia de la operación, son atacados de peritonitis. Cornil y Babes han practicado estas experiencias con igual inconstancia que nosotros en cuanto á los resultados. De cinco conejillos inoculados por la vía duodenal dos solamente fueron invadidos de síntomas coleriformes. Klein dice acerca de éstos accidentes ocasionados por las inoculaciones duodenales de vírgulas, que, ó son debidos al traumatismo, ó á un *virus* septicémico.

**Experiencia tercera** (29 de Agosto). Ocho conejillos, en-

tre los que se contaban cuatro de pequeña y cuatro de regular talla, fueron inoculados por la vía duodenal con un centímetro cúbico de cultura de vírgulas en caldo, á la cuarta generación y sembrado de tres días.

Transcurrido el aplanamiento producido por la operación, los conejillos se repusieron, y la herida cicatrizó perfectamente. No hubo síntoma ninguno que hiciera sospechar que el microbio colérico había proliferado y prosperado en el intestino.

Uno sólo de éstos conejillos se puso enfermo y murió; y fué precisamente uno en que no pudo efectuarse la operación sino á costa de muchas peripecias, y en el que no se cumplieron las precauciones antisépticas más elementales. La autopsia manifestó una violenta peritonitis. La serosa estaba inyectada y cubier- ta á trechos de una masa puriforme. En el líquido turbio sanguinolento que la llenaba pululaban infinidad de microbios, la mayor parte de forma bacilaria.

**Experiencia cuarta** (30 de Agosto). Pensando si lo excesivo de las dosis pudiera perjudicar á los resultados, nos resolvimos á usar cantidades mínimas de cultivos. Mezclóse al efecto el líquido de un tubo de gelatina sembrada cuatro días antes, con 20 centímetros cúbicos de caldo estéril; y se inocularon tres conejillos indianos con un céntimo cúbico de esta mezcla. Los conejillos no presentaron sino ligera molestia y recobraron rápidamente su estado fisiológico.

**Experiencia quinta** (5 de Setiembre). Tratando de ver si con grandes dosis de cultivos seríamos más afortunados, cuatro conejillos adultos recibieron en este día por inyección duodenal 5 centímetros cúbicos de caldo con vírgulas en cultivo puro. Atajando la posible incredulidad del lector, debo manifestar que jamás practicamos una inoculación sin asegurarnos bien á favor de la coloración en porta-objetos y bajo la amplificación de un buen objetivo (118 Zeiss, iluminador Abbe), de la absoluta pureza del cultivo.

Pues bien, los conejillos inoculados esta vez tampoco presentaron síntomas coléricos ni ofrecieron sino ligera molestia en el primer día, á pesar de sus 5 centímetros cúbicos de inyección, cantidad verdaderamente enorme que llenó casi todo el duodeno y aún parte del estómago, por forzada del piloro.

**Experiencia sexta** (20 de Setiembre). Sospechando aún si la ausencia de resultados dimanaba del empleo de vírgulas atenuados por cultivos sucesivos, preparamos una cultura en caldo, sembrando directamente de una placa cuya semilla se tomó de deyecciones frescas de colérico. Un centímetro cúbico de este cultivo, que databa de dos días y era riquísimo de comas, fué inoculado á cuatro conejillos en la misma ampolla duodenal. Uno sólo de estos enfermó á las pocas horas con el mismo cuadro observado en el caso de la experiencia primera, es decir, apatía, mirada triste,

algidez, respiración frecuente y ansiosa, diarrea de materias coagulables y transparentes, anuria en las últimas horas, etc. Este animal sucumbió á las 36 horas de inoculado, y la autopsia reveló violenta flegmasia del peritoneo y del intestino, exudación fibrinosa en el interior de éste y bacilos cortos, pequeños y con extremos redondeados en la sangre y derrames patológicos. No era apreciable el vírgula en el duodeno; pero el cultivo en lienzo lo puso en evidencia.

Hemos realizado también algunas otras experiencias á fin de cerciorarnos si, por otras vías, puede determinarse el cólera en los conejillos; empero los resultados tampoco han sido satisfactorios.

Cuatro conejillos en ayunas recibieron en el estómago 10 centímetros cúbicos de una solución fuertemente alcalina de carbonato de potasa; é *incontinenti* hicimosles tragar alimentos regados por cultivos de vírgulas, bien en gelatina, bien en caldo. La ligera incomodidad que el choque operatorio y la inyección produjeron, disipóse en breve sin ocurrir nada de particular.

Sometiéronse también tres conejillos durante ocho días á una alimentación humedecida diariamente con cultivos de comas en caldo fuertemente alcalino; iguales resultados negativos.

Con el fin de averiguar si las inyecciones de otras sustancias son capaces de suscitar un cuadro fenomenal que pudiera darnos la clave de la naturaleza de los accidentes que rarísima vez se presentan en los conejillos de Indias inoculados por la vía duodenal, comenzamos una série de experiencias de contra-prueba, cuyos resultados no fueron concluyentes: dos conejillos sufrieron una inyección duodenal de 5 centímetros de caldo en putrefacción, uno se inoculó con cultivo impuro de comas, otro con agua simplemente, y dos con tierra diluida tomada de las calles. Uno de estos últimos enfermó y murió, demostrando la autopsia una peritonitis intensa y un bacilo recto y numerosos cocos en la sangre y líquido peritoneal.

De todas estas experiencias resulta: 1.º Que no puede determinarse el cólera experimental en el conejillo indiano mediante inoculaciones duodenales con cultivos puros de comas, aún inyectando grandes cantidades. 2.º Que los síntomas coleriformes que en ciertos casos se desenvuelven pueden ser simple resultado de la contaminación accidental durante el manual operatorio, de un microbio patógeno especial, capaz de engendrar una violenta

entero-peritonitis. Hacen verosimil esta interpretación, la inconstancia de estos pseudo-cóleras, la naturaleza del exudado intestinal que no es riciforme, sino serofibrinoso transparente, y la preponderancia de los bacilos rectos sobre los vírgulas, tanto en la cavidad intestinal como en la sangre y líquidos patológicos.

## TERCERA PARTE

---

### CAPÍTULO PRIMERO.

#### VACUNACIÓN ANTICOLÉRICA.

Partiendo de la suposición que el agente del cólera es el bacilo-vírgula de Koch, ocurre naturalmente preguntar: ¿podría lograrse, por la atenuación de los cultivos de comas y por la ordinaria vía del contagio, un cólera benigno, que preservase al organismo de un nuevo ataque natural del cólera en su forma más violenta? ¿Las experiencias con las vacunas pasteurianas que tan brillantes resultados han dado en el mal del bazo, en el cólera de las gallinas, en la rabia, en el carbunco sintomático, podrían realizarse con éxito en el cólera? Para resolver este interesante problema profiláctico era preciso hallar un animal capaz de adquirir el cólera, en el cual pudiera ensayarse la acción de cultivos de comas en distintos grados de atenuación, para determinar la virulencia máxima compatible con la vida, y con las exigencias prácticas de una vacuna eficaz. Este era el único camino llano que recorrer para llegar á la solución del problema; ya que en el hombre consideraciones morales muy atendibles han impedido é impedirán siempre tales experimentos. Pero desgraciadamente no ha podido hallarse un animal, próximo al hombre por su estructura, donde el cólera genuino haya podido desarrollarse por la ingestión de los vírgulas; y aun aquellos autores que descri-

ben formalmente el cólera experimental, nada dicen de la atenuación de los cultivos, y de si hay esperanza de resolver el problema; al contrario, desahucian al investigador, como Koch que declara punto menos que ilusorio el hallazgo de una vacuna anti-colérica, y Van Ermergen que afirma que en los conejos un ataque de cólera experimental no hace al organismo refractario, ni aún por poco tiempo, para una nueva invasión. Y, sin embargo, declarada la virtud colerígena del coma y la doctrina de la inmunidad relativa que el cólera proporciona al individuo que lo sufrió, es forzosa consecuencia la admisión de una vacuna, y legítima la esperanza de su descubrimiento. El calor, el cultivo ante el oxígeno, el paso por el cuerpo de un animal de especie diferente, la influencia misma de los terrenos de cultura, alguna, en fin, de las condiciones que rebajan la virulencia de otros microfitos, deben atenuar también las actividades patógenas del coma.

Que esto es posible, lo prueba la desigual intensidad de la afección colérica y su desaparición en las poblaciones intensamente invadidas. Sabido es que la enfermedad tiene matices, gradaciones de gravedad, desde la simple colerina hasta el ataque fulminante, y que al final de las epidemias como si el agente colérico hubiese sido atenuado por alguna circunstancia cósmica, los ataques son más benignos y las invasiones menos rápidas y frecuentes.

Parécenos que imitando los procederes de la naturaleza, determinando esas condiciones exteriores que regulan la marcha y conservación de los cultivos naturales del coma-bacilo, podría hallarse el secreto de la atenuación y con él, el descubrimiento de una verdadera vacuna.

No habiendo marchado los investigadores por este camino, el único fecundo quizás, pero también el más difícil, algunos bacteriólogos, llevados acaso de cierta justificada impaciencia, han intentado resolver el problema por una vía indirecta.

Uno de estos investigadores ha sido el Dr. Ferrán. Experto en la técnica bacteriológica, apasionado de las fecundas conquistas de la ciencia de los gérmenes, y lleno de fé en cuanto á los resultados prácticos de estas novaciones, habiendo observado que las inoculaciones subcutáneas de vírgulas preservaban á los conejillos de Indias de los efectos tóxicos de una dosis mortal, creyó encontrar

aquí una prueba del poder preservativo de las inyecciones locales de vírgulas respecto del cólera verdadero. Llevado de su entusiasmo, no advirtió que los efectos producidos en los conejillos y luego en el hombre no eran el cólera atenuado, sino una infección especial que el vírgula ocasiona cuando se le fuerza á vivir fuera de su medio natural; en una palabra, el Dr. Ferrán no echó de ver que había descubierto una enfermedad nueva, y que, sin forzar mucho las cosas, no le era lícito suponer que tal afección preservase al organismo del hombre de los perniciosos efectos de un ataque del cólera morbo. Un cólera sin diarrea, sin calambres, sin anuria, sin cianosis, con sólo un síntoma del síndrome colérico, la algidez, no puede reputarse como verdadero cólera, aún cuando el agente determinante de aquel estado morboso sea la misma causa del cólera. Porque lo que determina la acción patógena, no es tanto el microfito, como el sitio en que vive y desarrolla sus efectos. Tal parásito inofensivo en la piel podrá quizás determinar importantes lesiones en otros órganos. Y en general, puede afirmarse que un microbio que no es cultivable á pequeñas dosis en un medio orgánico, no es patógeno en él, y si á grandes dosis desarrolla efectos tóxicos, éstos en gran parte deben atribuirse al traumatismo, y á los productos venenosos introducidos en el organismo con el terreno de cultivo.

Con todo, no dejan de existir algunas razones teóricas en favor de la vacunación subcutánea, y éstas reciben su apoyo de una hipótesis no confirmada aún, pero bastante verosímil, acerca del mecanismo de la preservación en las enfermedades infecciosas.

Que el microbio colerígeno no mata por sí, por acción de contacto exclusivamente, sino por virtud de la influencia de ciertos venenos elaborados por él y circulantes en la sangre, es cosa extremadamente verosímil, y por casi todos admitida, como lo es también que el vírgula no puede vivir más que en el intestino, donde tiene su fábrica y su centro de acción. Pero lo que no está todavía dilucidado es la causa de esa inmunidad relativa que el cólera presta al organismo, al igual de otros parásitos bacterianos. Dos hipótesis principales se disputan la solución del problema. Hélas aquí:

*Teoría del agotamiento del terreno.*—Puede suponerse que el vírgula al vegetar en el intestino y sus glándulas anejas, gasta cierta materia necesaria para su vida. La desaparición de este prin-

cipio, que tarda algún tiempo en reponerse, no sólo limita la evolución actual del parásito, sino que presta al tubo digestivo cierta esterilidad temporal, comparable á la de los terrenos esquilmos á fuerza de cultivos. Haciendo aplicación de esta opinión á la vacunación ferraniana, podría decirse: Que el vírgula inyectado subcutáneamente consume aquel principio, abono de su especie, imposibilitando hasta en el intestino ulteriores vegetaciones de vírgulas. Esta hipótesis resulta insostenible, entre otras razones: 1.º porque no pasando el germen del tejido conjuntivo, no es probable que consuma aquel principio en todo el organismo incluso el tubo intestinal; 2.º porque las siembras de vírgulas en los líquidos patológicos y caldos de las carnes de conejillos muertos á consecuencia de inoculaciones de cultivos de comas, van siempre seguidas de abundante proliferación; 3.º porque en los casos en que se muestra refractario el tejido conjuntivo, al cultivo no lo es la serosidad peritoneal, etc.

*Teoría del envenenamiento del terreno.*—Enfrente de la anterior hipótesis, afirman otros que los micrófitos, al cultivarse en un medio orgánico, dejan en él un producto tóxico para ellos que limita la proliferación del parásito é impide más adelante el cultivo de otros de idéntica naturaleza. El tiempo que tal veneno tarda en eliminarse marca la duración de la inmunidad. Si no se expulsa nunca, la profilaxis es completa (sarampión, escarlata, etc.); si se elimina después de un período de tiempo más ó menos largo, es transitoria (viruela, cólera, mal del bazo, etc.); y si inmediatamente sale no hay profilaxis, como sucede con ciertas afecciones bacterianas (tuberculosis, erisipela, intermitentes, blenorragia, etc.).

Esta hipótesis satisface más al entendimiento, se armoniza mejor con las experiencias bacteriológicas y tiene en su apoyo algunas razones de analogía. Es sabido, que cuando un germen pulula en un terreno de cultura, sus mismos productos de excreción lo ahogan y aniquilan; así sucumbe el *torula cerevisiæ* cuando el alcohol que es su obra alcanza cierta proporción en el terreno, esterilizándose el líquido para nuevos cultivos del mismo fermento; y así se destruye también el vírgula en sus mismos cultivos puros por falta de eliminación de los productos que segrega. Aplicando la hipótesis á la vacuna Ferrán, cabría decir que el coma ingerido en el tejido conectivo deja cierta materia

que esteriliza todo el organismo para las nuevas siembras que pudieran ocurrir con los mismos gérmenes, tanto cuando éstos penetran por la vía intestinal como por la hipodérmica.

Por poco probable que parezca esta opinión, es preciso reconocer, que era razonable y científico intentar una prueba experimental decisiva de la misma en los animales y en el hombre.

Por otra parte, tan científico y tan importante es un resultado negativo como uno positivo. Ambos son hechos que sirven al experimentador, el uno marcándole el derrotero que debe seguir, señalándole el otro los falsos caminos y los escollos. Bajo este punto de vista, nosotros hemos aconsejado la realización de las experiencias ferranianas, pues de confirmarse la hipótesis de la inmunidad anteriormente expuesta, resultaba un progreso positivo y se abrían para la ciencia nuevos horizontes.

Porque si lo que da la inmunidad es una sustancia tóxica para el vírgula é inofensiva para el organismo, y la tal materia por todo éste se extiende, esterilizándolo químicamente, bastaría en realidad, para que se diesen los efectos profilácticos en las enfermedades infecciosas, inocular aislado ese producto, y tanto más de apreciar serían los resultados obtenidos, cuanto que la vía de introducción podría ser indiferente, y no habría apenas efectos morbosos, desterrándose para siempre la práctica, un tanto peligrosa, de las inoculaciones de bacterias vivas.

Desgraciadamente, este *desideratum* está todavía muy lejano. La química bacteriológica no puede aislar el producto esterilizante de las materias tóxicas que los vírgulas segregan, y no queda más recurso para ensayar la confirmación de la hipótesis, que inocular el coma con sus productos, ó estos mismos productos separados del microbio por filtración.

Nosotros hubiéramos preferido que el Dr. Ferrán, si es que estos puntos de vista teóricos guiaban sus experiencias, hubiera comenzado las inoculaciones con los productos de vírgulas y no con los parásitos vivos, no tanto por el peligro, ciertamente ilusorio, que podían envolver tales inoculaciones, sino para apagar suspicacias y temores que tanto daño han hecho á la causa de la profilaxis.

Estas eran las razones científicas que hacían recomendable la vacuna Ferrán como experiencia ó ensayo profiláctico; en cuanto á las razones morales estaban todas de su parte desde que se

probó que á cortas dosis y con las precauciones necesarias manejado, el bacilo coma resultaba inofensivo introducido en la sangre.

Por nuestra parte, y en tanto que el Dr. Ferrán buscaba por experiencias en el hombre confirmación de sus juicios, nosotros, en otra más modesta esfera, sometíamos la hipótesis profiláctica á la piedra de toque de la experimentación en los animales. Si es cierto, decíamos entonces, que el microbio vírgula es la causa del cólera, y que una inoculación subcutánea de este microbio puede otorgar inmunidad al organismo enfrente de los ataques del mismo germen arribado por la vía intestinal, el conejillo de Indias inoculado del propio modo debe mostrarse refractario á los efectos morbosos de las inyecciones duodenales.

Con este fin, sometimos á la inoculación duodenal (20 Agosto) 8 conejillos de Indias vacunados y revacunados fuertemente (10 centímetros cúbicos de cultivo puro de vírgulas). Uno solo de los ocho fué atacado de aquellos síntomas coleriformes anteriormente anunciados y discutidos.

Reiteramos las experiencias, sometiendo á la inyección duodenal tres conejillos que la habían sufrido ya una vez y estaban vacunados y revacunados, y otros tres solo vacunados. Dos de éstos tuvieron síntomas coleriformes, pero solo uno murió y en su sangre encontróse aquel bastoncito corto ya otra vez descrito.

Estas experiencias no las reputamos concluyentes ni en pro ni en contra de la cuestión; por eso no las anunciamos á su tiempo, ni hicimos mérito de ellas, por más que se ejecutaron en el mes de Agosto, mucho antes de las que más tarde fueron publicadas por el Dr. Gibier y Van Ermergen.

Porque es evidente que, si no es el cólera experimental lo producido por las inyecciones duodenales, no es posible sacar consecuencias ni en favor ni en contra de la profilaxis Ferrán. Sólo puede afirmarse que, si realmente los fenómenos coleriformes descritos por los bacteriólogos bajo el nombre de cólera experimental, son producidos por el coma, la inmunidad, que las inyecciones subcutáneas prestan al organismo, no parecen extenderse en el conejo, hasta los órganos abdominales, atendido á que casi iguales proporciones de pseudo-cóleras nos han presentado los conejos vacunados que los no vacunados.

En último término, las experiencias en los animales no

pueden generalizarse al hombre sin reservas y limitaciones, y el problema ha de resolverlo la experimentación en éste, y el instrumento de la demostración no puede ser otro que la Estadística. Aparte de esto, cualquiera que fuese la hipótesis patogénica y profiláctica que eligiésemos, nunca cabría evitar que resultase cierta y evidenciada por hechos incontrovertibles una opinión contraria.

Más extrañas que la preservación del cólera por las inyecciones subcutáneas de un cultivo del agente colerígeno resultan las inoculaciones de la vacuna preservativa de la viruela, á pesar de ser afecciones distintas; las del virus septicémico del conejo, que dan inmunidad contra el cólera de las gallinas, y, no obstante, son hoy conquistas positivas y hechos por todos reconocidos.

Y los que dudan que los virus sin atenuar puedan ser usados con buen éxito como vacunas, deben recordar la práctica de la variolización que fué un verdadero progreso antes del hallazgo de la vacuna, y lo que hoy mismo se ejecuta con el virus no atenuado de la perineumonía infecciosa de los animales, que preserva, por inoculaciones locales, de la enfermedad más grave y virulenta.

No entraremos aquí en el examen de las estadísticas presentadas por Ferrán y sus discípulos. Estos documentos son todavía incompletos y cualquier juicio que sobre ellas se pronunciase sería aventurado. En general, las estadísticas están en favor del procedimiento; pero para decidirse en materia tan ardua requiérense más hechos y de otro modo clasificados y organizados. Por otra parte, en algunas existe contradicción entre los datos oficiales y los publicados por el Dr. Ferrán y sus ardientes partidarios, y un dictamen serio y riguroso sólo podría hacerse en los pueblos epidemiados sometidos á la inoculación, compulsando datos, recogiendo noticias, interpretando hechos sobre los que en las estadísticas se pasa ordinariamente de ligero.

Quizás algún día emprendamos esta pesada labor, única que puede decidir de la eficacia de la colerización Ferrán; entre tanto los argumentos sacados del terreno de la experimentación en que nos hemos colocado, y donde exclusivamente hemos girado en estos estudios, no favorecen gran cosa al método del bacteriólogo tortosino; y aún autorizan á afirmar que puede habers e equivocado en sus juicios, y haber sido defraudado en sus esperanzas.

## CONCLUSIONES.

**1.<sup>a</sup>** Es muy probable que el bacilo-vírgula descubierto por Koch en las deyecciones é intestino de los coléricos sea la causa específica del cólera morbo.

**2.<sup>a</sup>** El bacilo-vírgula de Koch debe considerarse todavía como una bacteriacea, perteneciente á la familia de los espirilos, que carece de esporos ó de formas de resistencia y se reproduce por fisiparidad. El complicado proceder genético descrito por el Dr. Ferrán no ha sido comprobado por nosotros.

**3.<sup>a</sup>** La acción colerígena del vírgula no ha podido confirmarse completamente en los animales. Las experiencias de inyección duodenal en el conejillo de Indias están todavía sujetas á varias y encontradas interpretaciones.

**4.<sup>a</sup>** Las inoculaciones subcutáneas, á pequeñas dosis, de los cultivos puros del coma son inofensivas en los animales y en el hombre. A grandes dosis, producen una infección particular que puede llegar hasta la muerte; pero no desarrollan el cuadro fenomenal del cólera morbo.

**5.<sup>a</sup>** Los animales inoculados por los comas en inyección subcutánea son preservados de los efectos de dosis dobles de cultivos. Pero esta acción preservativa no parece ser general, ni está probado que se extienda hasta el intestino, impidiendo el cultivo de gérmenes coléricos arribados por esta vía natural de infección.

---