

MÉTODOS RÁPIDOS DE COLORACIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS EN LOS ESPUTOS

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN SUCESIVA DEL BACILO
DE KOCH Y DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS

por

A. GALLEGO

Parecerá extraño que haya todavía quien se dedique a buscar nuevos métodos de investigación de las fibras elásticas en los esputos. Se dirá que la técnica para el reconocimiento de las fibras elásticas es cuestión agotada y que la significación de tales elementos en los esputos no tiene gran importancia desde que se descubrió el bacilo de Koch. Sin embargo, no creemos en la existencia de cuestiones agotadas ni nos preocupa la importancia de los asuntos que nos proponemos estudiar. No hay derecho a exigir a todos los investigadores que se dediquen única y exclusivamente a resolver el problema de la curación del cáncer y de la tuberculosis. Además, bastará leer nuestro trabajo para convencerse de su oportunidad: 1.º, porque ninguno de los métodos propuestos hasta el día para la investigación de las fibras elásticas en los esputos han logrado imponerse aún en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos; 2.º, porque los métodos de coloración más en boga, el de la *orceína* y el de la *fuchselina*, son métodos de excepción, el uno por su lentitud (24 horas) y el otro por exigir el empleo de un colorante difícil de

preparar, que se conserva mal y que sólo es aplicable a éste fin: a la coloración de las fibras elásticas, y 3.º, porque en las obras que hemos tenido ocasión de consultar, con excepción quizá de la de Bezançon y De Jong, las láminas que representan las fibras elásticas en los esputos, son, más que reproducción de tales fibras, vistas con el microscopio, verdaderos esquemas que, lejos de servir de guía para orientarse en el examen de una preparación microscópica de esputos, inducen casi seguramente a error.

Así, pues, siguiendo nuestra campaña de democratización de los procedimientos de laboratorio de más aplicación a la clínica, vamos a exponer los nuevos métodos de coloración de las fibras elásticas en los esputos que, por su rapidez, facilidad, seguridad y economía permiten ser utilizados diariamente en cualquier laboratorio de análisis clínicos por insignificantes que sean sus recursos.

CÓMO ENCONTRAMOS PLANTEADO EL PROBLEMA

Después de la comunicación presentada a la SOCIETAT DE BIOLOGÍA de Barcelona sobre «Nuevos métodos de coloración de las fibras elásticas en los tejidos», nuestro excelente amigo el Dr. Dargallo, nos sugirió la idea de aplicar a los esputos los mismos métodos que con tanto éxito habíamos empleado para la tinción de las fibras elásticas de los tejidos. La idea nos pareció sencillamente admirable y nos comprometimos a ponerla en práctica tan pronto tuviésemos ocasión oportuna.

Pero, claro está, antes de decidirnos, consideramos un elemental deber enterarnos de los términos en que estaba planteado el problema, a cuyo fin echamos una ojeada a las obras clásicas de «Métodos de exploración clínica» y, sobre todo, a las ya más especiales de «Análisis clínico de los esputos».

Pronto nos convencimos de que el problema que nos proponíamos no era cuestión definitivamente agotada. Todos los métodos propuestos hasta el día, desde los más antiguos de Fenwick, Remak, Duval, Lereboullet, Balzer, Hérard y Cornil, hasta los más modernos, el de la coloración con la orceína de Unna-Taenzer, propuesto por May y Barth, y el de la tinción con la fuchselina de Weigert, preconizado por Sahli, nos parecieron poco prácticas, y así logramos explicarnos que, en la inmensa mayoría de los laboratorios, no se intentase la investigación de las fibras elásticas en los esputos sino en casos realmente extraordinarios.

El problema estaba planteado en los términos que, con tanta claridad y galanura expone nuestro sabio amigo, el prestigioso tisiólogo Dr. Dargallo, en su admirable *Manual de análisis clínico de los esputos*.

«Coloración de las fibras elásticas del esputo. Hay que recurrir a una coloración particular. El colorante preferible es el de Weigert, que vende preparado la casa Grüber con el nombre de *Färbung u. Weigert f. elast. Fasern* (solución colorante de Weigert para las fibras elásticas). Las diversas muestras no tienen el mismo valor colorante y deben preferirse aquellas en que el color es negro-azul. Las que contienen un colorante rojizo son inferiores y menos electivas.

»Este colorante que es el más rápido y el que da imágenes más bellas y finas se lo puede preparar uno mismo según la técnica siguiente:

»Se preparan dos soluciones: Fuchina rubina (o magenta), 1 gr. en agua dest. 100 c. c. y Resorcina 2 gr. en agua dest. 100 c. c. y se mezclan en una cápsula de porcelana que se pone al fuego.

»Se agita y cuando la mezcla entra en ebullición, sin dejar de agitar, se vierten 25 c. c. de percloruro de hierro al 30 por 100. Se agita durante 5 minutos mediante una varilla de vidrio, con lo que se forma un precipitado barroso. Se retira la cápsula del fuego, se deja enfriar y se filtra cuidadosamente sobre un papel de filtro.

»El líquido que pasa se tira. Entonces el filtro con el depósito se coloca en la cápsula que ha servido para la ebullición y se vierten 200 c. c. de alcohol absoluto.

»El contenido con la cápsula debe de hervir de nuevo: el peligro está en que se inflamen los vapores de alcohol y se estropee el colorante. Se evita hirviendo al baño maría o sencillamente hirviendo agua en una cápsula más grande, apagando el foco calorífico, cuando se haya llegado a la ebullición y haciendo flotar la cápsula con el colorante en el agua hirviendo; el alcohol empieza a hervir al cabo de poco. Si es menester, se vuelve a hervir el agua y se vuelve a hacer flotar la cápsula.

»Después de hervido el precipitado y el filtro en el alcohol, se quitan los restos del filtro y se deja enfriar. Se completan los 200 c. c. de alcohol (para reponer los que se han evaporado) y se añaden 4 c. c. de ácido clorhídrico puro. Esta mezcla se conserva bien dos o tres meses. No es menester filtrar antes de usarla.

»Para investigar las fibras elásticas puede bastar en ciertos casos, cuando sean lo bastante abundantes, hacer la extensión del esputo como de ordinario, pero en general conviene que la observación recaiga sobre mayor cantidad de esputo, porque las fibras elásticas son poco abundantes.

»Nosotros procedemos así corrientemente:

»Tomamos una buena cantidad de partículas que macroscópicamente nos prometan el mejor resultado, es decir, las más purulentas, y la colocamos sobre un porta-objetos. Luego la extensión en capa gruesa.

»Para hacer esta extensión, con otro porta-objetos extendemos la expectoración *grosso modo* y calentamos y agitamos al aire para que se sequen algunas porciones. Después, sobre estas porciones secas extendemos las que no lo están aún y hacemos una nueva extensión más perfecta y nuevamente calentamos y agitamos al aire. Con esto se secan otras porciones y repetimos la operación tantas veces como sea necesario, hasta lograr una extensión en capa homogénea y gruesa. El esputo resulta además concentrado porque se evapora una cierta cantidad de agua.

»Se puede lograr el mismo fin, extendiendo y secando sucesivamente varias porciones de esputo sobre un mismo porta-objetos.

»No hay inconveniente en que la temperatura sea algo elevada, porque las fibras elásticas resisten bien, ni en obtener una capa gruesa de los esputos, porque la coloración es electiva para las fibras elásticas, es decir, porque sólo se tiñen éstas.

»Para obtener una gran cantidad de fibras elásticas y especialmente cuando el anterior procedimiento resulta negativo hay que homogenizar previamente el esputo. Se toma en un frasco tapado o sencillamente un tubo de ensayo una cierta cantidad de esputos, 5, 10 ó 15 c. c. y se añade igual cantidad de lejía de potasa o de sosa al 10 por 100. La mezcla se agita bien hasta obtener una homogenización grosera. Luego se hierve hasta su completa diso-

lución en una cápsula de porcelana o en el mismo tubo de ensayo. La lejía disuelve todos los elementos del esputo respetando las fibras elásticas.

»Lograda la disolución, se diluye la mezcla en agua, en cantidad cuatro veces mayor y el todo se deja sedimentar en una copa durante 24 horas o, mejor, se centrifuga.

»El depósito se extiende sobre un porta-objetos. Si fuera difícil hacer que se quede pegado, agréguese una pequeña partícula de esputo y la extensión se logrará fácilmente.

»Después de la extensión se fija la preparación en alcohol absoluto durante 5 minutos, se vierte el alcohol y, sin lavar ni secar se añade el colorante de Weigert. Este debe de actuar de 20 a 30 minutos por lo menos, cuanto más mejor. Luego se diferencia con alcohol absoluto y se deja secar sin lavar con agua.

»Las fibras elásticas quedan en violeta rojizo, o en violeta negro, según el valor del colorante y el tiempo que ha actuado.

»Si se quiere se puede prescindir de la fijación en el alcohol absoluto, puesto que basta el alcohol del colorante. También la diferenciación se puede hacer con alcohol clorhídrico al 3 por 100 en lugar del alcohol absoluto. (*Bamberguer y Michaelis.*)

»En lugar de la fuchselina de Weigert se puede emplear la orceína, según la técnica de Barth, que consiste en someter las preparaciones 24 horas a la acción de la solución siguiente: Orceína, 1 gr.; agua, 40 c. c.; alcohol de 95°, 80 c. c.; ácido nítrico, XL gotas.

»Luego lavar con agua y diferenciar con ácido clorhídrico, I gota, en alcohol de 95°, 50 c.c.

»Las fibras elásticas aparecen en rojo moreno-oscuro.»

LOS PRIMEROS TANTEOS

No es nuestro propósito aparecer como un investigador que nada se le resiste, algo así como un especialista en la resolución de acertijos complicados. Al contrario; nos interesa sobremanera hacer resaltar nuestros tanteos infructuosos, el desaliento que nos causaron las primeras derrotas, los razonamientos sencillamente infantiles que se nos ocurrieron en los momentos de desorientación, las alegrías sin causas bien justificadas y en fin, las satisfacciones que experimentamos al sentirnos dueños de hechos

y fenómenos que primero jugaron con nosotros y por fin quedaron sometidos a nuestro capricho.

Nuestro trabajo tendrá, pues, el sello de autobriografía que queremos aparezca en todas nuestras publicaciones. Así contribuiremos a combatir ese terror casi supersticioso que se apodera de todo aficionado a los problemas biológicos ante la idea de realizar labor original, de llegar un poco más lejos que los demás investigadores, que, a su vez, también pasaron por la fase de modestos aficionados.

Se verá en el curso de nuestro trabajo cómo cuanto hemos logrado ha sido producto de la constancia, de la casualidad, de la audacia, y, en menor grado, del razonamiento.

Comencemos ya a exponer nuestro punto de partida en la labor que hemos realizado.

En nuestra comunicación a la SOCIETAT DE BIOLOGÍA de Barcelona, presentamos como definitivos tres métodos de coloración de las fibras elásticas en los tejidos.

PRIMER MÉTODO: *Fuchina acética Formol-alumínico acético*
(Fa. Fal.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Tinción con la fuchina de Ziehl diluida al 7.5 por 100 y acetificada (agua destilada 4 c. c.; fuchina de Ziehl, VI gotas; ácido acético I gota), 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Viro-fijación en formol alumínico acético (solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100, 5 c. c.; formol, I gota; ácido acético I gota) 10-15 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Serie de alcoholes.
- 8.º Xilol fenicado. — Bálsamo en xilol.

SEGUNDO MÉTODO: *Fuchina acética — Formol férrico acético*
(Fa. Ffa.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.

- 3.º Tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada, 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Viro-fijación en formol férrico acético (agua destilada 5 c. c. formol, I gota; percloruro de hierro, III gotas; ácido acético, I gota), 5-10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Serie de alcoholes.
- 8.º Xilol fenicado — Bálsamo en xilol.

TERCER MÉTODO: *Fuchina acética*. — *Formol nítrico*. (Fa. Fn.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Tinción con fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada, 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Viro-fijación en formol nítrico (agua destilada 5 c. c.; formol, I gota; ácido nítrico, I gota), 10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Serie de alcoholes.
- 8.º Xilol fenicado — Bálsamo en xilol.

Con tales métodos lográbamos teñir los núcleos en violeta intenso; los citoplasmas en violeta pálido; las fibras conjuntivas en violeta muy débil, ligeramente rosado; las musculares, en rojo violáceo; el cartílago y las granulaciones de las células cebadas de Ehrlich, en violeta azulado; la mucina en violeta negro y las fibras elásticas en violeta intenso. Con el segundo método (Fuchina acética-Formol férrico acético) la coloración de los epitelios pavimentosos estratificados resultaba poco electiva, pero la coloración de las fibras elásticas era más rápida y más intensa. El tercer método (Fuchina acética-Formol nítrico) nos parecía preferible a los otros dos.

También en la citada comunicación insistíamos en la necesidad de usar, en ciertas ocasiones, un colorante de fondo que permitiera el resalte de las fibras elásticas en los órganos poco ricos en estos elementos o en los que, aun

siéndolo, la extrema finura de tales fibras, o estar éstas entre gran número de células de núcleos muy colorables, impedían que se percibiesen con toda claridad por el poco contraste entre el violeta intenso de las fibras elásticas y el violeta también, aunque menos intenso, de los núcleos. Y citábamos como órganos en que se daban tales condiciones, la matriz (escasa en fibras elásticas) y el pulmón, principalmente el pulmón de carnero y de perro (ricos en fibras, pero muy finas y entremezcladas con numerosas células de núcleos muy colorables).

En tales casos aconsejábamos el siguiente procedimiento:

SÉPTIMO PROCEDIMIENTO: *Carmín* — *Fuchina acética* — *Formol nítrico* o *Formol férrico acético*. (C. Fa. Fn. o Ffa.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Carmín, cualquier fórmula, la de P. Mayer entre otras:

Carmín aluminoso de P. Mayer

Acido carmínico	0'50 gramos
Alumbre potásico	5 »
Agua destilada.	100 c. c.
(Disolved en caliente y filtrad)	

1 minuto.

- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Tinción con fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada, 1 minuto.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Viro-fijación en formol nítrico o en formol férrico acético, 10 minutos.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Serie de alcoholes.
10. Xilol fenicado — Bálsamo en xilol.

Operando así, los núcleos se tiñen en rojo violáceo, las granulaciones de las células cebadas de Ehrlich y el car-

tilago en violeta azulado, la mucina en violeta negro, las fibras elásticas en violeta intenso. Con este procedimiento habíamos logrado poner de manifiesto fibras elásticas que, por su escasez o finura, ni siquiera se podía sospechar su existencia.

Es más; aconsejábamos que para obtener preparaciones impecables se duplicase la cantidad de ácido carmínico en la fórmula de P. Mayer, pero haciendo la viro-fijación con el formol férrico acético, pues si se usaba el formol alumínico, las fibras elásticas fuertemente impregnadas por el carmín, no eran visibles.

Era, pues, lógico que, así como May y Barth intentaron la coloración de las fibras elásticas en los esputos utilizando la orceina, que ya Unna y Taenzer habían ensayado con éxito en la coloración de las fibras en los tejidos, y así como Sahli procedió de igual suerte utilizando la fuchselina, que Weigert empleaba corrientemente en técnica histológica, también nosotros tratásemos de ensayar la tinción de las fibras elásticas en los esputos con los mismos métodos que habíamos logrado la coloración de las ya mentadas fibras elásticas en los tejidos.

Como el procedimiento de coloración con el carmín, la fuchina acética y el formol nítrico, nos había dado excelente resultado en nuestras investigaciones histológicas, sobre todo cuando parecía que fracasaban los tres métodos fundamentales, se nos ocurrió emplear este procedimiento, como el más sensible, para lograr la coloración de las fibras elásticas en los esputos, y en la seguridad de que, si lográbamos teñirlas, no nos pasarían inadvertidas por insignificantes que fuesen en número y dimensiones y por alteradas que se encontrasen, pues no en vano habíamos hecho cientos de preparaciones que nos permitieron ver, en los diferentes órganos del hombre y de los animales domésticos, fibras elásticas de todos los tipos y formas, y

ALGUNOS PROGRESOS REALIZADOS EN LA TÉCNICA

Comenzamos entonces a contemplar nuestra obra. Examinamos con detenimiento toda la preparación empleando una amplificación de unos 100 diámetros, ya que en estas condiciones podíamos ver con toda claridad fibras elásticas muy finas, que aparecían con mayor esbeltez a éstos aumentos y nos sorprendió en seguida observar que *tales fibras ocupaban precisamente los bordes de la preparación, la parte menos gruesa*. Advertimos también que en dichos bordes *la coloración con el carmín era más intensa*. Hacia el centro de la preparación no se veía ninguna fibra elástica y *la coloración con el carmín resultaba mucho más débil, en rosa pálido*. Observamos todavía otro detalle: examinando la preparación a 800 diámetros apreciamos también que *los bacilos de Koch parecían acumularse en los bordes. En el centro de la preparación no se veían ni fibras elásticas, ni bacilos de Koch, ni células*.

¿Cómo explicar estos hechos?

Teñimos otras preparaciones en las que la extensión era aún más gruesa y el resultado fué el mismo y aun quizá más acentuado. Pero ya al hacer nuevos ensayos con otra preparación, la de mayor espesor, nos apercibimos de que al tratar de secarla para proceder al montaje, mientras los bordes estaban ya completamente secos, *la parte central permanecía húmeda, y calentando intensamente por el centro se agrietó, se formaron ampollas y se desprendió*, quedando la preparación reducida a un anillo periférico. Esto obedeció quizá a que el esputo era francamente purulento, pues en otros muchos esputos mucopurulentos que hemos examinado no pudimos comprobar nada semejante. Sin embargo, nosotros supimos aprovecharnos del fracaso técnico, pues en seguida nos dimos

cuenta de lo que nos había sorprendido: *las preparaciones demasiado gruesas no se fijaban bien y la falta de fijación impedía la coloración de las fibras elásticas, de los bacilos y de las células.*

Se nos ocurrió sobrefijar otras preparaciones, llegando hasta tostarlas, y la tinción de todos los elementos — fibras elásticas, bacilos y células — mejoró.

Resuelto ya el segundo problema que nos habíamos propuesto — coloración sucesiva del bacilo de Koch y de las fibras elásticas — supusimos que habíamos resuelto el primero — coloración simple de las fibras elásticas — pues que, en último término, habíamos logrado un procedimiento que debía derivar necesariamente de un método.

No obstante, acostumbrados ya a las peripecias de los trabajos de investigación, decidimos ensayar el método que habíamos dado por resuelto: la coloración simple de las fibras elásticas en los esputos con el carmín, la fuchina acética y el formol férrico-acético.

A este objeto empleamos la técnica siguiente: 1.º, coloración con el carmín, 1 minuto; 2.º, lavado en agua; 3.º, tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100, y acetificada, 1 minuto; 4.º, lavado en agua; 5.º, formol férrico-acético, 10 minutos; 6.º, lavado, secado y montaje. Y en efecto, contra lo que presentíamos, *las fibras elásticas quedaron sin teñir...*

¿Por qué no se tenían las fibras elásticas?

No era lógico suponer que la coloración previa con la fuchina de Ziehl, en caliente, durante 10 minutos, influyese en la tinción ulterior de las fibras elásticas con la fuchina diluída y el formol férrico, previa acción del carmín. Pero podía influir quizá el ácido nítrico o el alcohol de 60º que usábamos como decolorantes.

Para salir de dudas intentamos tres ensayos, a saber: 1.º, hacer actuar el ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ durante dos minu-

tos, continuando después las restantes operaciones para teñir las fibras elásticas (carmín, fuchina diluída y formol férrico acético); 2.º, acción previa del alcohol de 60º, por 5 minutos, seguida del empleo de los colorantes ya citados; 3.º, tratamiento previo con el ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ y el alcohol de 60º, 2 y 5 minutos respectivamente y coloración consecutiva con el carmín, fuchina diluída y formol férrico acético. *Las fibras elásticas se tiñeron, aunque débilmente, en violeta muy pálido, en el 1.º y 3.º ensayo, sin que, comparando detenidamente las dos preparaciones logradas, se advirtiesen diferencias ostensibles. No había, pues, duda de que la acción previa del ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ influía en la coloración de las fibras elásticas con la fuchina y el formol férrico acético.*

Sin embargo, el problema no estaba completamente resuelto: la coloración de las fibras elásticas era muy débil, comparada con la que adquirirían cuando se operaba siguiendo la técnica ya citada para la coloración del bacilo de Koch y de las fibras elásticas.

Cierto que la acción previa del ácido nítrico mejoraba la tinción, pero no debía ser indiferente el calor (el calor húmedo podríamos decir) ya que la coloración de las fibras elásticas, después de haber actuado la fuchina en caliente, era infinitamente más intensa, y este efecto, como ya hemos dicho, no podía atribuirse al colorante, y sí a la forma en que se empleaba. El calor, actuando como fijador, o acentuando la fijación, debía influir seguramente en la coloración de las fibras elásticas, y así se explicaba el hecho de que, en las preparaciones gruesas, mal fijadas, la tinción de las fibras no se operase sino en los puntos en que el espesor era menor, y, por consiguiente, la fijación más completa. ¿No ejercería alguna influencia, también, el ácido fénico que entraba en la composición de la fuchina de Ziehl?

Se imponían tres ensayos: 1.º, tratamiento previo de la preparación por el agua caliente (hasta la emisión de vapores); 2.º, acción previa de la solución de ácido fénico al 5 por 100 calentada asimismo hasta la emisión de vapores; 3.º, influencia también previa de la solución de ácido fénico en frío y, en estos tres casos, coloración ulterior con carmín, fuchina diluída al 7'5 por 100 y formol férrico acético. *Las fibras elásticas se tiñeron bien en las preparaciones que estuvieron sometidas a la acción del agua y de la solución de ácido fénico en caliente.* Quedaba demostrada la acción favorable del calor y del ácido nítrico para la coloración consecutiva de las fibras elásticas con la fuchina y el formol férrico acético.

Se nos ocurrió entonces hacer una parodia de tinción del bacilo de Koch, y una coloración real de las fibras elásticas, empleando, en vez de fuchina de Ziehl, agua ordinaria calentada hasta la emisión de vapores y durante 10 minutos, continuando las demás operaciones (ácido nítrico al $\frac{1}{3}$, alcohol de 60º, carmín, fuchina diluída y formol férrico acético). Las fibras elásticas se tiñeron perfectamente en violeta.

Substituimos el agua y la solución de ácido fénico por el formol al 10 por 100 caliente y todavía mejoraron un poco los resultados.

Creyendo ya comprendido el efecto del calor y del ácido nítrico, esto es, suponiendo que uno y otro actuaban como fijadores, decidimos invertir los términos, empleando, primero, el ácido nítrico y, después, el formol, al 10 por 100 en caliente, con lo que conseguiríamos probablemente una fijación química (precipitación química de la albúmina con el ácido nítrico al $\frac{1}{3}$) y otra fijación físicoquímica (precipitación y coagulación de la albúmina con el formol al 10 por 100 y en caliente) continuando luego las demás operaciones para la coloración de las fibras elásticas. Este

ensayo fué coronado por el éxito más lisonjero: *las fibras elásticas se tiñeron intensamente en violeta. Era preferible la doble fijación con el ácido nítrico y el formol al 10 por 100 en caliente*, que la que se lograba con este último agente y el ácido nítrico.

Tratando de simplificar la técnica, quisimos ensayar la doble fijación simultánea utilizando el formol nítrico (agua 90 c. c.; formol 10 c. c.; ácido nítrico 7'5 c. c.) en caliente, y durante 5 minutos, y el resto de las operaciones en la forma indicada. La coloración de las fibras elásticas, aunque muy aceptable, fué peor que en el ensayo anterior.

Teníamos ya un método seguro para la coloración simple de las fibras elásticas en los esputos. He aquí su técnica:

- 1.º Extensión en capa delgada;
- 2.º Fijación por el calor (tres pases por la llama);
- 3.º Precipitación química de la albúmina con el ácido nítrico al $\frac{1}{3}$, 2 minutos;
- 4.º Lavado en agua;
- 5.º Precipitación y coagulación de la albúmina con el formol al 10 por 100 en caliente (hasta la emisión de vapores), 5 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Carmín alumínico de P. Mayer, 1 minuto.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Coloración con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada, 1 minuto.
10. Lavado en agua.
11. Formol férrico acético, 10 minutos.
12. Lavado, secado y montaje.

Fibras elásticas en violeta; núcleos y mucina en rojo.

* * *

El nuevo método de coloración de las fibras elásticas en los esputos, aunque seguro y más rápido que el de la coloración con la orceína y la fuchselina, no nos satisfacía completamente: resultaba demasiado lento y exigía el empleo del carmín, colorante poco empleado en los laboratorios en que suelen hacerse análisis de esputos.

Pensamos en substituir el carmín por otros colorantes rojos. Elegimos entre éstos la eosina y la safranina, por ser los de más frecuente aplicación. Ensayamos ambos, utilizándolos en solución acuosa al 1 por 100 y dejándolos actuar un minuto, no variando las demás fases de la técnica. La safranina se comportó mejor que la eosina. Esta última dificultaba la coloración de las fibras elásticas con la fuchina y el formol férrico acético, adquiriendo un color rosa-violáceo poco distinto del fondo rosa de la preparación. Ni la eosina ni la safranina podían substituir al carmín.

Pero estábamos decididos a suprimir la coloración con el carmín, que nos parecía una complicación inútil, ya que no desempeñaba más papel que el de colorante de fondo, impidiendo a la vez que la fuchina se fijase sobre otros elementos distintos de las fibras elásticas.

Para resolver este problema, optamos por realizar una serie de ensayos de tinción de las fibras elásticas, no en los esputos, asunto para nosotros demasiado nuevo, si no en los tejidos que nos era más familiar.

Empleando entonces la coloración: carmín — fuchina acética — formol nítrico, nos sorprendió que no se tiñesen las fibras elásticas. En seguida nos dimos cuenta de que estábamos usando un carmín de P. Mayer que habíamos modificado, doblando la cantidad de ácido carmínico, esto es, empleando 1 gramo para 100 c. c. de la solución colorante, en lugar de 0'50, y que no tuvimos la precaución de anotarlo en la etiqueta del frasco que contenía tal solución.

Repetimos el ensayo utilizando la solución de carmín, según la fórmula clásica de P. Mayer, y terminando la coloración con la fuchina acética y el formol nítrico: las fibras elásticas se tiñeron en violeta, resaltando sobre la coloración rojo violácea del fondo de la preparación.

Volviendo a la tinción de las fibras elásticas en los esputos, teñimos una preparación siguiendo esta técnica: ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ — formol en caliente — carmín aluminoso de P. Mayer (ácido carmínico 0'50 gramos por 100) — fuchina acética — formol nítrico (agua destilada 40 c. c.; formol, VIII gotas y ácido nítrico, VIII gotas). Las fibras elásticas se tiñeron perfectamente en violeta; las células y la mucina en rojo algo violáceo. Hasta este momento no logramos darnos cuenta de nuestro fracaso al realizar el primer ensayo de coloración sucesiva del bacilo de Koch y de las fibras elásticas (Ziehl en caliente — ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ — alcohol de 60° — carmín de Mayer (con doble cantidad de ácido carmínico) — fuchina acética — formol nítrico). El fracaso no tenía más que una explicación posible: la excesiva concentración en ácido carmínico de la solución de P. Mayer, impedía la coloración de las fibras elásticas con la fuchina acética y el formol nítrico.

También nos dimos entonces perfecta explicación de nuestro éxito al substituir el formol nítrico por el formol férrico acético: este último era un mordiente más enérgico de la fuchina en la coloración de las fibras elásticas.

Satisfechos de habernos dado explicación de un fracaso — porque *fracaso explicado éxito seguro* — y precisamente cuando volvimos a nuestro campo, al de la Técnica histológica, nos pareció prudente continuar nuestros ensayos de coloración de las fibras elásticas en los tejidos, porque los éxitos que aquí lográsemos, pronto o tarde habían de traducirse en facilidades para lograr la tinción de las fibras elásticas en los esputos.

Sabíamos ya por múltiples experiencias realizadas meses atrás, que, si hacíamos actuar sobre los cortes microtómicos obtenidos por congelación, una solución al 1 por 100 de cloruro de aluminio, la coloración ulterior con la fuchina acética y el formol aluminico, permitía un mayor resalte

de las fibras elásticas, porque éstas se teñían en violeta intenso y los núcleos de todas las células en violeta pálido. Ensayamos esta coloración: cloruro alumínico — carmín aluminoso de P. Mayer (fórmula clásica) — fuchina acética — formol alumínico acético. La coloración roja intensa de los núcleos y protoplasmas permitía una distinción más fácil de las fibras elásticas teñidas en violeta intenso.

Llevamos este ensayo a la tinción de las fibras elásticas en los esputos con las consiguientes modificaciones técnicas (extensión en capa delgada — fijación por el calor — ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ y formol en caliente — cloruro alumínico al 1 por 100 — carmín — fuchina acética — formol alumínico acético y el resultado fué el que esperábamos. *Las fibras elásticas se tiñeron en violeta intenso; las células y la mucina en rojo.*

Teníamos ya casi trasladados a la técnica de la coloración de las fibras elásticas en los esputos, aunque con las modificaciones consiguientes, los tres métodos fundamentales de tinción que corrientemente usábamos en la coloración de las mismas fibras en los tejidos. *Primer método:* fuchina acética — formol alumínico acético. *Segundo método:* fuchina acética — formol férrico acético. *Tercer método:* fuchina acética — formol nítrico.

Pero seguíamos preocupados con la idea de substituir el carmín por otro colorante, porque nos temíamos que si llegábamos a publicar los nuevos métodos de coloración de las fibras elásticas en los esputos, considerando como necesaria la coloración de fondo con el carmín, este solo detalle había de constituir un gran obstáculo para que se ensayasen en los laboratorios de análisis clínicos, donde indudablemente se ha declarado la guerra al carmín. Por lo demás, la substitución del carmín por la safranina o la eosina no era recomendable.

Un golpe de audacia nos llevó a ensayar la coloración de las fibras elásticas en los esputos sin tinción de contraste, esto es, suprimiendo el carmín y realizando todas las demás operaciones hasta terminar con la viro-fijación con el formol férrico acético. *Las fibras elásticas se tiñeron, como siempre, en violeta; las células y mucina también en violeta, pero muy débil.* La diferencia de tono de color era lo bastante acentuada para poder prescindir de la coloración de fondo.

El mismo ensayo substituyendo el formol férrico acético por el formol nítrico o por el formol alumínico, no nos dejó tan satisfechos: *la coloración de fondo era casi tan intensa como la de las fibras elásticas y, siendo muy finas, podían confundirse con las fibras de mucina o con fibras de cromatina resultantes de alteraciones nucleares.*

Aunque el problema de la coloración de las fibras elásticas en los esputos, sin tinción previa con el carmín, no estaba definitivamente resuelto, habíamos abierto una buena brecha en la técnica y estábamos seguros de conseguirlo. Este, como otros problemas, no podía ser resuelto por el procedimiento de la atención aguda: había que llegar a la atención crónica y hasta la preocupación.

ANÁLISIS DE CADA UNO DE LOS FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA COLORACIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS

Entretanto había que analizar cada uno de los factores que necesitábamos poner en juego para teñir las fibras elásticas en los esputos.

La emprendimos primero con el ácido nítrico al $\frac{1}{3}$. ¿Por qué había de ser necesario emplear el ácido nítrico a esta concentración? Si, como suponíamos, el ácido nítrico actuaba como fijador, no debía haber inconveniente

en emplear la solución al 7'5 por 100 ya que, a esta misma concentración y con el mismo fin, habíamos empleado dicho ácido en Técnica histológica. Ensayamos la solución de ácido nítrico al 7'5 por 100, o mejor al 8 por 100 por ser más fácil de preparar (X gotas de ácido nítrico por 5 c. c. de agua, en substitución del ácido nítrico al $\frac{1}{3}$, haciendo después todas las demás operaciones hasta la viro-fijación con formol férrico acético, y obtuvimos una coloración mucho más intensa de las fibras elásticas, sin que apenas se modificase la tinción de fondo (violeta pálido). Aun contando con el fracaso, rebajamos la concentración del ácido nítrico hasta al 1 por 100 y, sin embargo, el resultado fué tan bueno como en el caso anterior. Quisimos saber si convendría o no aumentar o disminuir el tiempo de acción del ácido nítrico al 1 por 100, llegando a convencernos de que, sin inconveniente, podía disminuirse hasta unos 10 segundos.

Tratamos de averiguar si era o no preciso emplear el formol al 10 por 100 o si convendría aumentar o disminuir su concentración. Iguales resultados obtuvimos con soluciones al 5 por 100 y al 20 por 100, pero como la solución al 10 por 100 la empleábamos corrientemente como fijador en Técnica histológica, seguimos empleándola también para la fijación de los esputos. Necesitábamos saber a qué temperatura obraría más favorablemente la solución de formol al 10 por 100. A este fin, vertimos la solución en una cápsula de porcelana, que calentamos con una lamparilla de alcohol y sumergimos en dicha solución un termómetro. Tras de muchos tanteos nos convencimos de que la acción del formol no variaba gran cosa a partir de la temperatura de 45° a 70°, pero notamos que, haciendo la fijación con formol al 10 por 100, a estas temperaturas y sumergiendo las preparaciones en el líquido que contenía la cápsula, había gran desigualdad de unas a otras prepara-

ciones en cuanto a la intensidad de coloración de las fibras elásticas. Esto obedecía a que, al evaporarse el formol, disminuía naturalmente su concentración hasta quedar muy debajo de 5 por 100.

Empleamos recipientes cerrados (cubetas de Borrel tapadas o frascos de boca ancha con tapón esmerilado) donde colocábamos la solución de formol y calentábamos en baño maría. Pero, aun procediendo así, al entrar y sacar las preparaciones se evaporaba el formol, por lo que volvimos al empleo de la platina de Malassez, colocando en ellas las preparaciones, cubriéndolas con solución de formol al 10 por 100 y calentando hasta la emisión de vapores, o mejor aún, hasta la aparición de las primeras burbujas, logrando de esta suerte resultados uniformes, pues para cada preparación usábamos nueva solución de formol. Lo que sí nos llamó la atención fué que, en los casos en que por descuido, calentábamos demasiado la solución de formol y llegaba a secarse la preparación, no conseguíamos teñir las fibras elásticas. Pudimos desde entonces formular esta regla absoluta: *después de la acción del formol no deben dejarse secar las preparaciones*. Tratando de averiguar el tiempo mínimo que podía actuar la solución del formol, llegamos a persuadirnos de que bastaba con 10 segundos, lo que unido al detalle análogo referente al tiempo de acción del ácido nítrico nos satisfizo grandemente, ya que nos permitía abreviar en algunos minutos la duración de la técnica. Intentamos substituir la solución de formol al 10 por 100 por la de sublimado al 3 por 100, pero el resultado fué desastroso. Luego, guiados por no sabemos qué idea, que nos es imposible recordar, sumergimos una preparación, ya tratada por el ácido nítrico al 1 por 100 y por el formol al 10 por 100 en caliente, otra vez en la solución de ácido nítrico durante un minuto, y terminadas todas las operaciones de tin-

ción nos sorprendió el detalle de que las fibras elásticas quedaron teñidas mucho más intensamente. Repetimos el ensayo y siempre con magníficos resultados. No podíamos explicarnos el por qué. La teoría, sin embargo, parecía ser ésta: el formol al 10 por 100 y en caliente actúa como fijador; el ácido nítrico al 1 por 100 como sensibilizador y la fuchina y el formol férrico acético como complemento.

Pasamos a estudiar las modificaciones posibles en el colorante, fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada (agua destilada 40 c. c.; fuchina de Ziehl, LX gotas; ácido acético VIII gotas), aunque con cierta desconfianza, ya que, después de muchos tanteos, habíamos optado por esta fórmula en nuestros trabajos de coloración de las fibras elásticas en los tejidos. Aumentamos la cantidad de fuchina y aunque logramos teñir más intensamente las fibras elásticas, la coloración de fondo se acentuó en el mismo grado.

Esto no nos convenía. Disminuimos la proporción de fuchina hasta el 5 por 100 y ya no logramos teñir las fibras elásticas. Suprimimos el ácido acético y obtuvimos el mismo efecto que aumentando la cantidad de fuchina. Decidimos, pues, no cambiar la fórmula de la solución colorante.

Le tocó el turno al formol férrico acético. Cambiamos la proporción del formol sin lograr sensibles ventajas. Desde el 1 por 100 al 10 por 100 se comportaba igual. Tampoco influyó la supresión del ácido acético y optamos por suprimirle. No nos atrevíamos a disminuir el tiempo de acción del formol férrico acético, porque parecía el tiempo mínimo absolutamente necesario para lograr la coloración de las fibras elásticas como ya habíamos observado operando en cortes histológicos. Sin embargo, nos decidimos a abreviar su acción y vimos con la natural sorpresa, que podía disminuirse hasta 10 segundos, lo que

significaba un gran avance para conseguir la coloración de las fibras elásticas con rapidez.

Del análisis que hicimos de cada uno de los factores que intervenían en la coloración de las fibras elásticas en los esputos resultó modificada la técnica en esta forma: 1.º Extensión en capa delgada. 2.º Fijación por el calor (tres pases con la llama). 3.º Precipitación de la albúmina con el ácido nítrico al 1 por 100, 10 segundos. 4.º Lavado en agua. 5.º Coagulación y precipitación de la albúmina con formol al 10 por 100 en caliente (hasta la aparición de las primeras burbujas) 10 segundos. 6.º Sin dejar secar, lavado en agua. 7.º Sensibilización de las fibras elásticas con el ácido nítrico al 1 por 100, 1 minuto. 8.º Lavado. 9.º Tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada, 1 minuto. 10. Lavado. 11. Viro-fijación en formol férrico, 10 segundos. 12. Secado y montaje. Fibras elásticas en violeta intenso; núcleos celulares y mucina en violeta pálido.

NUEVAS VENTAJAS CONSEGUIDAS EN LA TÉCNICA

Habíamos terminado nuestros ensayos utilizando esputos de tuberculoso expulsados hacía cuatro días. Quisimos ensayar la nueva técnica, en esputos procedentes de otro enfermo también tuberculoso y nuestra sorpresa no tuvo límites al ver que no lográbamos, ni mucho menos, el buen resultado que habíamos considerado absolutamente seguro. Las fibras elásticas se tenían débilmente y en cambio aumentaba la intensidad de la coloración de fondo (células y mucina). Para lograr buenas coloraciones de fibras elásticas nos vimos en la precisión de recurrir otra vez a la coloración previa con el carmín. Esto era ya para perder la paciencia.

Sospechando que el ácido nítrico al 1 por 100, al menos cuando le hacíamos actuar después del formol en caliente, actuaba como sensibilizador de las fibras elásticas, creímos que sería posible substituirle por otros sensibilizadores más enérgicos y ensayamos el cloruro de aluminio al 1 por 100 y el percloruro de hierro también al 1 por 100. El primero no nos dejó satisfechos. El segundo, aunque no colmó nuestros deseos, nos pareció preferible, pues con el conseguimos una coloración de fondo tan débil, que, a pesar de quedar poco teñidas las fibras elásticas, se percibían con gran facilidad.

Este resultado nos hizo pensar en que quizá obtuviésemos buenos resultados agregando percloruro de hierro al formol nítrico y aun al formol alumínico, pues si con estos últimos habíamos conseguido una intensa coloración de las fibras elásticas, aunque con el inconveniente de resultar demasiado fuerte la coloración de fondo, era casi seguro que este inconveniente desapareciese, porque, por lo visto, el percloruro de hierro se comportaba como una especie de correctivo en cuanto a la coloración de fondo. Hicimos el ensayo utilizando como sensibilizador el ácido nítrico al 1 por 100 y como viro-fijador el formol nítrico férrico así preparado:

Agua destilada	40 c. c.
Formol	VIII gotas
Acido nítrico	VIII »
Percloruro de hierro.....	II »

La coloración de las fibras elásticas resultó tan intensa como en las preparaciones en que habíamos empleado el formol nítrico, pero en cambio, la coloración de fondo apareció tan débil como en las en que hicimos la sensibilización con el percloruro de hierro. La mejora era

indiscutible. Repetidos ensayos nos convencieron de que el formol nítrico férrico era preferible al formol nítrico y al formol férrico.

Al realizar estos últimos ensayos y al reparar en que disponíamos de muy pocos cubre-objetos, se nos ocurrió un medio de prescindir de ellos. Seca ya la preparación, después del último lavado, y estando todavía caliente el porta-objetos, extendimos sobre la preparación una gota de bálsamo del Canadá disuelto en xilol, utilizando al efecto una varilla de vidrio, y al evaporarse el xilol quedó el bálsamo con la dureza y transparencia, suficientes para poder examinar la preparación con toda comodidad y hasta con objetivo de inmersión.

Visto el buen resultado conseguido con el formol nítrico férrico, ensayamos el formol aluminico férrico:

Solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100 en agua. 40 c. c.

Formol VIII gotas

Percloruro de hierro II »

y también logramos resultados muy aceptables.

Teníamos ya tres viro-fijadores que parecían excelentes: el formol férrico, el formol nítrico férrico y el formol aluminico férrico.

Pero al querer hacer nuevas preparaciones con esputos recientes (de pocas horas) surgieron las mismas dificultades que la vez anterior.

ESPUTOS RECIENTES Y ESPUTOS ANTIGUOS. DIFICULTADES PARA LOGRAR LA COLORACIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS EN LOS PRIMEROS Y FACILIDADES PARA CONSEGUIRLA EN LOS ÚLTIMOS.

Había motivos para desesperarse. Estuvimos a punto de abandonar la labor convencidos de nuestra incapacidad para los trabajos de laboratorio. No obstante, reflexionando con toda calma, llegamos a persuadirnos de que las dificultades técnicas con que tropezábamos eran en realidad una gran enseñanza.

Por de pronto habíamos conseguido conocer ciertas particularidades de los esputos que ni siquiera podíamos sospechar. En efecto; sabíamos ahora que los esputos tuberculosos, casi siempre muco-purulentos, experimentaban en pocos días modificaciones en extremo sorprendentes. Recién expulsados, a las pocas horas, y aun en el mismo día, son espesos, casi sólidos, se extienden mal, sobre todo los muy mucosos, porque se secan pronto y las preparaciones no son uniformes, sino como arañadas y con brillo; las células epiteliales y los leucocitos se tiñen intensamente por los colorantes, pero como al hacer la extensión con agujas se han desgarrado unas y otros, la cromatina aparece con un aspecto marcadamente fibrilar; las fibras elásticas se tiñen mal, aparecen más pálidas, y como se hallan entremezcladas con las fibrillas resultantes de rasgaduras y estiramientos de los núcleos, es difícil distinguirlas. Los esputos antiguos (de 4, 5 o más días) experimentan una verdadera fusión, transformándose en una masa líquida, muy fluída, opaca, con pequeños grumos que hasta llegan a desaparecer, operándose, por decirlo así, una homogenización espontánea; su extensión es fácil, porque el esputo tarda en secarse y las preparaciones resultan uniformes y

sin brillo; las células epiteliales y los leucocitos sufren el proceso de histolisis, disminuye poco a poco su apetencia por los colorantes hasta desaparecer, y como no se desgarran durante las maniobras de la extensión, la imagen microscópica pierde su aspecto fibrilar, dando la engañosa apariencia de hallarse mejor conservados, hasta que llega el momento de la completa cariolisis; las fibras elásticas resisten al proceso histolítico muchísimo mejor que los elementos celulares citados, y lejos de perder su afinidad por los colorantes, se acentúa cada vez más, se tiñen más intensamente (1), lo que, unido a la desaparición del aspecto fibrilar de la cromatina nuclear, permite distinguirlos con toda facilidad. Tales cambios de los esputos sólo se observan cuando se dejan abandonados en recipientes tapados (Cajas de Petri, etc.), pero no cuando se exponen al aire, pues en este caso se secan pronto y no son manejables.

Quedaban explicados nuestros éxitos y fracasos. En los primeros ensayos teníamos siempre necesidad de hacer la coloración de fondo con carmín: era que operábamos con esputos recientes, pues nos mandaban al laboratorio las preparaciones ya extendidas y fijadas. En ensayos posteriores pudimos suprimir la tinción con carmín: recaían nuestras investigaciones sobre esputos antiguos, que habíamos llevado al laboratorio para tener materia sobre que operar siempre que se nos antojase.

En una palabra: dominábamos la técnica de la coloración de las fibras elásticas en los esputos antiguos (de 3 a 5 días) y nos restaba llegar al mismo resultado en los recientes, aunque, utilizando el carmín como colorante de fondo, conseguimos siempre admirables preparaciones.

(1) La tinción de las fibras elásticas puede aun lograrse en esputos que daten de tres meses.

El problema se complicaba y se simplificaba a un mismo tiempo. Parecía que había necesidad de emplear varios métodos, según se tratase de esputos recientes o antiguos y aun quizá uno para cada día.

Necesitábamos a todo trance una explicación perfectamente razonada del mecanismo de la coloración de las fibras elásticas. La teoría que nos habíamos formulado hasta entonces no nos satisfacía. ¿Por qué había de ser necesaria la triple fijación con el calor, el ácido nítrico al 1 por 100 y el formol al 10 por 100 en caliente? Esto era sencillamente absurdo. En cambio nos pareció muy lógica la hipótesis con que explicábamos las restantes operaciones: sensibilización con el ácido nítrico al 1 por 100, tinción con la fuchina diluida al 7'5 por 100 y viro-fijación con el formol nítrico, férrico o aluminico.

Había que suprimir la triple fijación. ¿Pero cuál de ellas debíamos preferir? Indudablemente la clásica; la fijación por el calor seco (tres pases con la llama). A esta fijación debía seguir una sensibilización enérgica de las fibras elásticas, que, a la vez dificultase la coloración del fondo, para lograr, por decirlo así, una diferenciación de la coloración con la fuchina, haciendo de ésta un colorante específico para las citadas fibras.

Buscar un nuevo sensibilizador, nos pareció un problema demasiado difícil, al menos, por el momento. Sospechamos que quizá nos sirviesen los sensibilizadores que manejábamos a diario, pero empleándolos en ciertas condiciones, quizá usándolos en caliente.

Ensayamos el formol nítrico férrico, siguiendo esta técnica: fijación con el calor; sensibilización con el formol nítrico férrico en caliente; tinción con la fuchina acética; viro-fijación con formol nítrico férrico. El resultado fué sencillamente estupendo: fibras elásticas en violeta intenso, núcleos y mucina en violeta pálido. Substituimos el formol

nítrico férrico por el formol nítrico y, aunque la coloración de las fibras elásticas fué igualmente intensa, la coloración de fondo no nos agradó por ser excesiva.

Repetimos el ensayo, utilizando el formol nítrico férrico, pero calentado hasta la ebullición y la coloración de fondo palideció hasta el extremo de hacer difícil el enfoque de la preparación. Volvimos a ensayar el formol nítrico férrico en caliente, pero no más que hasta la emisión de vapores y logramos restablecer la coloración de fondo en violeta pálido.

En estos tanteos pasamos el día. Al siguiente seguimos operando en los mismos esputos, porque, aunque no ignorábamos que nos sería fácil lograr buen resultado con cualquier técnica, podíamos seguir buscando nuevos sensibilizadores y prepararnos mejor para lograr buenas preparaciones de esputos recientes.

Los esputos estaban ya muy alterados (no hemos observado otro caso de alteración tan rápida, en 40 horas) y era difícil su extensión, precisamente por ser demasiado flúidos. Aun así, hicimos una preparación, que tuvimos que secar con el calor, cansados de esperar un cuarto de hora que se seicara espontáneamente. Pero al intentar el primer lavado con el chorro de la fuente se destrozó la preparación por desprendimiento de una parte del esputo.

Achacando este fracaso a una fijación deficiente, agregamos al formol nítrico férrico mayor cantidad de formol hasta obtener una solución al 10 por 100. Sensibilizamos con este nuevo formol nítrico y, no sólo no se destrozó la preparación al lavar a chorro, sino que la coloración, tanto de las fibras elásticas como de los núcleos y mucina, mejoró notablemente.

Los hechos parecían someterse a la teoría: la fijación única seguida de sensibilización substituía a la fijación triple y sin ninguna desventaja, antes al contrario, mejo-

rando notablemente la tinción con la fuchina diluída y la viro-fijación con el formol nítrico férrico.

Sin embargo, no nos hicimos ilusiones, pues, seguramente estos últimos éxitos logrados en preparaciones de esputos ya muy alterados no se repetirían operando en esputos frescos.

En efecto; al día siguiente aplicamos a los esputos recientes los mismos métodos empleados para los esputos antiguos y fracasaron: las fibras elásticas se teñían en violeta muy poco más intenso que los núcleos y mucina. Hubo necesidad de modificar la técnica. Aumentamos la cantidad de percloruro de hierro en el formol nítrico férrico y disminuimos la de ácido nítrico, a fin de conseguir una coloración de fondo mucho menos intensa. La coloración de las fibras elásticas pareció mejorar y la tinción de fondo fué más débil.

Al repetir los ensayos observamos que las fibras elásticas quedaban cada vez más pálidas, sin que, al parecer, modificásemos la técnica. Por fin, dimos con la explicación de este hecho: la fuchina se alteraba, adquiriendo color violeta y disminuyendo su poder colorante, indudablemente porque la proporción de formol (al 10 por 100) en el nuevo sensibilizador (formol férrico nítrico) era tal que, las preparaciones, aun después de lavadas, le contenían en cantidad suficiente para inutilizar la fuchina. Disminuimos la cantidad de formol, hasta el 5 por 100 y desde entonces mejoraron los resultados.

Aun con el nuevo sensibilizador (agua destilada 40 c. c.; formol, 2 c. c.; percloruro de hierro, IV gotas y ácido nítrico, IV gotas), todavía era algo intensa la coloración de fondo, lo que exigía que la extensión del esputo fuese en capa sumamente fina.

Pero era ya indudable que la palidez de la coloración de fondo obedecía a la acción del percloruro de hierro.

Este dato tenía un valor de primer orden, pues marcaba el camino para resolver definitivamente el problema.

Había necesidad de utilizar el percloruro de hierro asociado a los otros sensibilizadores. Preparamos el formol alumínico férrico (solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100, 40 c. c.; formol, 2 c. c.; percloruro de hierro, IV gotas) y, recordando que en la coloración de las fibras elásticas en los tejidos habíamos obtenido resultados no despreciables empleando el formol clorhídrico, preparamos asimismo el formol clorhídrico férrico (agua, 40 c. c.; formol, 2 c. c.; ácido clorhídrico, VIII gotas y percloruro de hierro, IV gotas). Tanto el formol alumínico férrico como el formol clorhídrico férrico nos dieron resultados muy estimables.

Y visto el buen efecto del percloruro de hierro como correctivo del formol nítrico, alumínico y clorhídrico, nos decidimos a usar el formol férrico simplemente (agua destilada, 40 c. c.; formol, 2 c. c.; percloruro de hierro, VIII gotas) consiguiendo admirables preparaciones, pues si bien las fibras elásticas se teñían menos intensamente, en cambio la extremada palidez de la coloración de fondo las hacía resaltar como ningún otro sensibilizador.

Con el formol férrico, utilizado como sensibilizador y viro-fijador, habíamos logrado, por fin, un método seguro para la tinción de las fibras elásticas en los esputos recientes.

La técnica del nuevo método era la siguiente: 1.º Extensión en capa delgada; 2.º Fijación con el calor; 3.º Sensibilización con el formol férrico en caliente (hasta la emisión de vapores, 10 segundos); 4.º Lavado; 5.º Tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada, 1 minuto; 6.º Lavado; 7.º Viro-fijación con formol férrico; 8.º Lavado; 9.º Secado en la llama y extensión de una gota de bálsamo por toda la preparación. Examen microscópico a 100 diámetros. Fibras elásticas en violeta no muy

intenso; núcleos y mucina en violeta muy pálido, algo rojizo.

El método era, además de muy seguro, tan rápido que permitía una buena coloración de las fibras elásticas en los esputos en dos minutos.

Logrado este método y pareciéndonos demasiado pálida la coloración de fondo, no vimos inconveniente en acentuarla ligeramente, sin más que suprimir el ácido acético de la solución de fuchina.

Todavía nos atrevimos a aumentar la intensidad de la coloración de fondo, diluyendo la fuchina, no en agua destilada sino en agua ordinaria. Dicha coloración se acentuó notablemente, pero, en cambio, la de las fibras elásticas alcanzó una intensidad extraordinaria.

No vimos ya inconveniente en emplear también el agua ordinaria para preparar la solución de formol férrico, con lo que conseguimos mejorar todavía la tinción de las fibras elásticas.

Era indudable que habíamos logrado democratizar el método de tinción de las fibras elásticas en los esputos, utilizando el formol férrico como sensibilizador y viro-fijador y la fuchina diluída como colorante, suprimiendo en una y otra el agua destilada y substituyéndola por el agua ordinaria.

Al día siguiente, y operando con el mismo esputo, la sensibilización y viro-fijación con el formol férrico no nos dió tan buenas preparaciones: la coloración de fondo disminuyó grandemente, pero también las fibras elásticas se tiñeron en violeta pálido.

Pero si fracasó el formol férrico, no ocurrió lo mismo con el formol nítrico férrico, el clorhídrico férrico y el aluminico férrico.

Teníamos, pues, resuelto el problema de obtener buenas preparaciones de fibras elásticas, tanto en los esputos re-

cientes como en los antiguos. Podíamos decir que disponíamos de un método para cada día.

Al hacer nuevas preparaciones del mismo esputo (del tercer día) comprobamos, como en otras ocasiones, que todos los métodos, menos el del formol férrico, daban admirables resultados. No hubo ya inconveniente en suprimir el percloruro de hierro y utilizar el formol nítrico, el clorhídrico y el alumínico, sin que la coloración de fondo, sumamente pálida, dificultase la observación de las fibras elásticas, intensamente teñidas en violeta oscuro.

LOS ÚLTIMOS ENSAYOS

Bien preparados ya para intentar nuevamente la coloración de las fibras elásticas en los esputos recientes, reanudamos nuestra tarea, sirviéndonos de esputos tuberculosos, de muy pocas horas, que parecían reunir las peores condiciones para lograr buenas preparaciones. Tales esputos eran muco-purulentos, pero muy mucosos, de gran consistencia, casi sólidos, en una palabra, distintos a todos los que hasta entonces habíamos observado.

Al pretender extender un grumo de estos esputos, notamos en seguida que se secaba con gran rapidez, y por tal motivo, no había medio de conseguir una capa uniforme, sino que quedaban pequeñas partículas sin deshacer y entre ellas estrechas fajas sin substancia alguna, por lo que las preparaciones parecían como si estuvieran arañadas y con mucho brillo, lo que nos hizo dudar de la perfecta adhesión del esputo al porta-objetos. Fijamos las preparaciones así obtenidas mediante tres pases por la llama y procedimos a teñirlas utilizando la técnica que considerábamos más a propósito para la coloración de las fibras elásticas en los esputos recientes: sensibilización

con el formol férrico en caliente (agua, 40 c. c.; formol, 2 c. c.; percloruro de hierro, IV gotas) durante 10 segundos; lavado en agua; fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 en agua ordinaria, 1 minuto; lavado; viro-fijación en formol férrico, etc. En algunas de estas preparaciones se desprendió parte del esputo al lavar en el chorro de la fuente. La adhesión del esputo era poco intensa, como habíamos sospechado. Remediamos este inconveniente suprimiendo el lavado a chorro y ejecutándole en un gran cristizador lleno de agua, comunicando al porta-objetos movimientos de vaivén.

Conseguida la primera preparación, la examinamos con microscopio a 100 diámetros y nos sorprendió, desde luego, el aspecto fibrilar, mucho más acentuado de lo que estábamos acostumbrados a observar, y, además, la escasez de las fibras elásticas. La coloración de fondo, violeta rojo, no era muy intensa, pero las escasísimas fibras elásticas, aunque bien teñidas en violeta más intenso, hacía difícil su reconocimiento.

El aspecto fibrilar de la preparación no podía obedecer, según hemos dicho, nada más que a las desgarraduras y estiramientos de la cromatina nuclear, como consecuencia, seguramente, de las tracciones que habíamos tenido que realizar con la aguja para extender rápidamente el esputo que se secaba en seguida.

Se nos ocurrió un medio de hacer desaparecer el aspecto fibrilar, si, en efecto, reconocía por causa la dificultad para extender el esputo. A este fin, mezclamos un grumo de esputo con una pequeña gota de agua e hicimos una especie de homogeneización previa que nos permitió una extensión fácil, cómoda, sin que quedasen partículas sin deshacer, ni rayas, adquiriendo la preparación, una vez seca, un aspecto uniforme y mate que nos agradó.

Esta preparación así extendida, fué sometida a las

mismas operaciones que las anteriormente hechas. El examen microscópico nos confirmó en nuestra creencia respecto a la verdadera causa del aspecto fibrilar, pues había desaparecido completamente, conservando las células su forma redondeada habitual y no quedando zonas demasiado gruesas intercaladas con otras vacías de substancia. Además, la coloración de fondo era mucho más débil y la de las fibras elásticas mucho más intensa.

Utilizando la nueva técnica de extensión, hicimos nuevas preparaciones empleando todos los sensibilizadores que reputábamos excelentes, no ya solo para los esputos frescos, sino hasta para los antiguos y nos convencimos de que daban muy buenos resultados. No obstante, nos persuadimos una vez más de que el formol férrico era el preferible.

Esta conclusión nos condujo a modificar los demás sensibilizadores en el sentido de aumentar en ellos la cantidad de percloruro de hierro, buscando una tinción de fondo débil, pero electiva, y una coloración de las fibras elásticas casi específica.

Obtuvimos así: 1.º el *formol férrico nítrico*:

Agua ordinaria	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Percloruro de hierro.....	VIII gotas
Acido nítrico	II »

2.º El *formol férrico clorhídrico*:

Agua ordinaria	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Percloruro de hierro.....	VIII gotas
Acido clorhídrico.....	II »

3.º El *formol alumínico férrico*:

Solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100.	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Percloruro de hierro.....	VIII gotas

Con estos sensibilizadores logramos de una vez, y creemos que para siempre, el resultado que buscábamos: una coloración de fondo muy débil, pero suficiente para un análisis citológico, y una tinción de las fibras elásticas tan intensa que permite distinguirlas al menos habituado a verlas. La circunstancia de estar operando sobre unos esputos muy pobres en fibras elásticas, nos decidió a proceder a la homogenización de tales esputos, operación que jamás habíamos realizado, pues, sin saber por qué, huimos siempre de ella, en la idea absurda de exigir una técnica complicada y engorrosa.

Para homogenizar los esputos procedimos así: en un tubo de ensayo y de bastante diámetro, vertimos unos 5 c. c. de esputos; agregamos igual cantidad de solución acuosa de potasa al 10 por 100; agitamos la mezcla hasta obtener una homogenización grosera; calentamos hasta la ebullición; añadimos agua hasta llenar el tubo (unas tres o cuatro veces el volumen de la mezcla de esputo y lejía) y centrifugamos durante 5 minutos.

El depósito, muy escaso, por cierto, le extendimos en un porta-objetos por el procedimiento habitual; fijamos la preparación con el calor; sensibilizamos con formol férrico; teñimos con fuchina diluída y terminamos con la viro-fijación en formol férrico. Ocurrió que en la serie de lavados a chorro, se arrastró parte de la preparación, pero aun así, pudimos encontrar muchas fibras elásticas bastante bien teñidas.

Para evitar el arrastre de una gran parte del depósito por la acción mecánica del chorro de agua, mezclamos una pequeña porción del depósito resultante de la centrifugación con una partícula insignificante del esputo no homogenizado y conseguimos así extender cómodamente y lograr una adherencia capaz de resistir a todos los lavados a chorro.

Sobre las preparaciones así obtenidas y después de la fijación con el calor, ensayamos todos los métodos de coloración de las fibras elásticas que ya teníamos perfectamente conocidos: 1.º Formol férrico — Fuchina — Formol férrico; 2.º Formol férrico nítrico — Fuchina — Formol férrico nítrico; 3.º Formol férrico clorhídrico — Fuchina — Formol férrico clorhídrico; 4.º Formol alumínico férrico — Fuchina — Formol alumínico férrico; 5.º Formol nítrico — Fuchina — Formol nítrico; 6.º Formol clorhídrico — Fuchina — Formol clorhídrico; 7.º Formol alumínico — Fuchina — Formol alumínico.

Todos ellos nos dieron resultados admirables, aunque la tinción de las fibras elásticas fué más débil con el formol férrico — fuchina — formol férrico y la tinción de fondo demasiado intensa con el formol alumínico — fuchina — formol alumínico.

Nos chocó mucho que en las preparaciones obtenidas con todos los métodos, exceptuando quizá el primero, la coloración de las fibras elásticas fuese mucho más intensa que la que estábamos acostumbrados a obtener, sin que la coloración de fondo creciese en igual proporción.

Sospechamos que este efecto debía obedecer a que la potasa actuaba como sensibilizador de las fibras elásticas. Para convencernos, hicimos varias preparaciones de esputos todavía recientes (del mismo día) ensayando la siguiente técnica: extensión en capa delgada; fijación con el calor; probable sensibilización con la potasa al

10 por 100, en caliente, 10 segundos; lavado; fuchina diluída al 7'5 por 100, 1 minuto; lavado; viro-fijación en formol férrico, en formol férrico-nítrico, clorhídrico, etc. Y en efecto; procediendo así, las fibras se tiñeron más intensamente y el fondo en color más pálido que de ordinario. No había duda; la potasa actuaba como sensibilizador de las fibras elásticas.

¡Otro sensibilizador! *Pero ¿qué puede haber de común entre el percloruro de hierro, el ácido nítrico, el ácido clorhídrico, el cloruro aluminico y la potasa, que explique el porqué substancias, al parecer, tan distintas se comporten de igual manera, esto es, como sensibilizadores de las fibras elásticas para su coloración con la fuchina básica?* De veras que agradeceríamos muy mucho una explicación satisfactoria.

Aprovechando la circunstancia de disponer de esputos recientes, que reunían las peores condiciones para nuestras investigaciones (esposos, difíciles de extender, de imagen microscópica marcadamente fibrilar y pobres en fibras elásticas), todavía intentamos dos ensayos que parecían justificados, a saber: 1.º Diferenciación de la coloración de las fibras elásticas, ya teñidas, empleando el alcohol de 95º o absoluto. 2.º Diferenciación con el viro-fijador en caliente.

El primer ensayo fué de un resultado desastroso; el segundo nos pareció más aceptable, pues que conseguimos hacer más débil la coloración de fondo y no disminuir gran cosa la intensidad de la tinción de las fibras elásticas. Sin embargo, tal diferenciación exigía gran vigilancia y no daba resultados constantes, por lo que decidimos abandonarla. Decididamente, en nuestros métodos de coloración de las fibras elásticas en los esputos, la diferenciación debe preceder y no seguir a la coloración de tales fibras con la fuchina.

Excusado es decir que, al día siguiente, volvimos a hacer nuevas preparaciones con el mismo esputo y no encontramos dificultades de ningún género ni en la extensión ni en la coloración. Todavía al tercer día, todas las operaciones eran más fáciles. En fin, al cuarto día, el esputo se fundió, formando un líquido turbio, blanco amarillento, que no se dejaba extender en filamentos al agitarle con la aguja, que se extendía bien y se teñía mejor utilizando cualquier método. Los núcleos celulares, aun bien conservados en su forma, aparecían muy pálidos, las fibras elásticas intensamente teñidas en violeta obscuro: había desaparecido completamente la imagen microscópica fibrilar. Por último, en el transcurso de una hora, al tratar de hacer nuevas preparaciones, observamos que los esputos, después de extendidos, se secaban muy lentamente, al extremo que, pasados 15 minutos, tuvimos que concluir por secar las preparaciones calentándolas ligeramente con la llama de un Bunsen, y la adhesión al portaobjetos fué tan débil, que, después de la fijación, al primer lavado a chorro, se desprendió parte de la preparación, teniendo que recurrir, como otras veces, al lavado en un cristizador lleno de agua. La preparación ya terminada tenía a simple vista un aspecto granugiento y el examen microscópico nos reveló la carencia absoluta de núcleos celulares, la tinción intensísima de las fibras elásticas en violeta obscuro, casi negro, y una especie de círculos, como si se hubiesen roto burbujas, por toda la preparación. No podemos explicar esta histolisis casi momentánea, esto es, en el transcurso de una hora, que deja al esputo sin una célula siquiera.

En resumen: de los ensayos últimamente realizados resulta:

1.º Que los esputos recientes (de pocas horas o del mismo día), mucopurulentos, y que proceden de enfermos

tuberculosos, son muy espesos, difíciles de extender, porque se secan en seguida, dan preparaciones no uniformes, sino como arañadas y con brillo, aun después de fijadas, lo que coincide casi siempre con la poca adhesión del esputo al porta-objetos y con la facilidad con que la preparación es arrastrada en parte o en totalidad al lavar a chorro.

2.º Que tales preparaciones, una vez teñidas, dan una imagen microscópica marcadamente fibrilar, aspecto que obedece a los desgarros y estiramientos de la cromatina nuclear durante las manipulaciones mecánicas realizadas con la aguja, al pretender una extensión rápida, porque el esputo se seca pronto, como lo prueba el hecho de que, si se mezcla el grumo de esputo con una pequeña gota de agua, la extensión es mucho más fácil, pues el esputo no se seca y desaparece la imagen microscópica fibrilar.

3.º Que en los esputos recientes la coloración de las fibras elásticas es siempre menos intensa, mientras que los núcleos celulares y la mucina se tiñen más enérgicamente.

4.º Que los esputos antiguos (de 3 a 5 días) conservados en recipientes tapados (Cajas de Petri, etc.), se funden convirtiéndose en una masa líquida, opaca, con pequeños grumos, siendo fáciles de extender, porque se secan muy lentamente, dando preparaciones uniformes y sin brillo después de fijadas.

5.º Que en ocasiones, al quinto día, la extensión se hace difícil y precisamente porque los esputos se secan con extremada lentitud y, en tales casos, la adherencia al porta-objetos es tan débil que parte de la preparación se desprende al primer lavado a chorro, a pesar de su fijación con el calor.

6.º Que en las preparaciones de esputos antiguos la imagen microscópica no es nunca de aspecto fibrilar, apareciendo los núcleos con su forma habitual y escasamente

teñidos, mientras que las fibras elásticas adquieren una coloración mucho más intensa que en los esputos recientes.

7.º Que para la coloración de las fibras elásticas en los esputos recientes son preferibles los métodos que siguen:

a) Formol férrico — Fuchina — Formol férrico.

b) Formol férrico clorhídrico — Fuchina — Formol férrico clorhídrico.

c) Formol férrico nítrico — Fuchina — Formol férrico nítrico.

d) Formol alumínico férrico — Fuchina — Formol alumínico férrico.

8.º Que la tinción de las fibras elásticas en los esputos antiguos se logra con toda facilidad utilizando, además de los dos últimos métodos citados, los que a continuación se expresan:

e) Formol clorhídrico — Fuchina — Formol clorhídrico.

f) Formol nítrico — Fuchina — Formol nítrico.

g) Formol alumínico — Fuchina — Formol alumínico.

9.º Que cuando se homogenizan los esputos, se centrifuga y se extiende el depósito, mezclándolo con una pequeña partícula de esputo no homogenizado, dan admirables resultados todos los métodos de coloración indicados, aunque son menos recomendables el 1.º (Formol férrico — Fuchina — Formol férrico) y el último (Formol alumínico — Fuchina — Formol alumínico).

LOS NUEVOS MÉTODOS DE COLORACIÓN DE LAS FIBRAS
ELÁSTICAS EN LOS ESPUTOS

TÉCNICA

Elección de partículas de los esputos. — Depositados los esputos en una caja de Petri y colocada ésta sobre un fondo negro (papel, pizarra, caja de preparaciones, etc.) se buscarán las porciones opacas, blancas o blanco-amarillentas, esto es, las de aspecto más marcadamente purulento, y mejor todavía, los granos raciformes, si los hay, pero cuidando de no confundirlos con migas de pan. Elegida ya la partícula que ha de ser objeto de examen, se separa del resto de la masa de esputos, utilizando dos pinzas pequeñas de puntas agudas o una pinza y una tijera de las que se usan para disecciones finas. Con la misma pinza se traslada la partícula al porta-objetos.

Extensión de las partículas de esputos. — El grumo de esputo sobre que se ha de operar, no será mayor que un cañamón y, aun así, servirá para hacer dos preparaciones, cuya anchura corresponderá aproximadamente al tamaño de una moneda de cinco céntimos. Colocado ya el grumo en el porta-objetos y apoyando las ramas de la pinza o una aguja fuerte — el hilo de platino no es recomendable por su excesiva flexibilidad — se ejecutarán, al principio, movimientos de presión y frote, de tal suerte que las pinzas o la aguja actúen en dirección paralela a la superficie del porta-objetos, hasta conseguir que la partícula de esputo se convierta en una especie de papilla a propósito para extender. Entonces, inclinando las pinzas o la aguja de manera que apoyen las puntas sobre el porta, se practicarán movimientos rápidos, trazando espirales o círculos y procurando deshacer completamente los más

finos gránulos que van apareciendo, hasta conseguir una preparaci3n en capa muy delgada y uniforme, sin relieves ni surcos. *Es regla absoluta extender pronto y bien, es decir, r3pidamente y en capa uniforme.*

Si la partícula elegida es muy consistente (esto ocurre en algunos esputos mucopurulentos, muy mucosos) y se seca pronto, la extensi3n es difícil, aunque se proceda con rapidez y las preparaciones adquieren un aspecto brillante y como arañadas. En estos casos convendr3 mezclar el grumo de esputos con una pequeña gota de agua (humedeciendo ligeramente las puntas de la pinza o de la aguja), y procediendo así, el grumo se extender3 con toda comodidad, la preparaci3n no tendr3 brillo, ser3 mate, y no se observar3n relieves ni surcos, sino que quedar3 una capa uniforme. No es, pues, recomendable para nuestra t3cnica, la extensi3n en capa gruesa como aconseja Dargallo. Si los esputos son francamente purulentos o muy poco mucosos, no habr3 ninguna dificultad para la extensi3n y se lograr3n preparaciones en capa delgada y uniforme.

Secado y fijaci3n. — Conseguida una preparaci3n en capa delgada y uniforme, se dejar3 secar espont3neamente o, en todo caso, se abreviar3 este tiempo calentando ligeramente el porta-objetos con la llama de una lamparilla de alcohol o un mechero Bunsen, cuidando de no calentar demasiado hasta tostarla.

Despu3s se proceder3 a la fijaci3n, esto es, a la coagulaci3n de la alb3mina del esputo y a su perfecta adhesi3n al porta-objetos. La fijaci3n se logra f3cilmente pasando el porta tres veces por la llama y, claro est3, con la cara untada hacia arriba. Si despu3s de la fijaci3n la preparaci3n queda a3n con brillo, debemos desconfiar de haber logrado una adhesi3n perfecta del esputo al porta. Probablemente, al primer lavado a chorro, se desprender3 parte del esputo extendido.

Sensibilización de las fibras elásticas. — Enfriado el porta-objetos, o caliente aún, que esto es indiferente, se procede a sensibilizar las fibras elásticas o, lo que es igual, a prepararlas para que se fije en ellas y de un modo casi específico el colorante que ha de teñirlas: la fuchina.

El sensibilizador ha de actuar en caliente, hasta la emisión de vapores, y a este fin conviene proceder en la forma siguiente: Se sujeta el porta-objetos con una pinza de Debrand (las de Cornet no convienen porque el porta no queda horizontal) y se coloca ésta sobre la superficie del fondo de una copa invertida, según técnica aconsejada por Dargallo, que tiene la ventaja de ahorrar la platina de Malassez y permitir operar más rápidamente, pues la acción del calor sobre el porta-objetos es inmediata. Si no se dispone de una pinza de Debrand, puede colocarse el porta-objetos sobre la copa invertida o un soporte cualquiera de madera o de metal, logrando la posición horizontal del porta, poniendo en el extremo que apoya sobre la copa, un objeto de cierto peso (un trozo de plomo, una moneda, etc). En fin, aun pueden suprimirse tales artefactos, sosteniendo el porta-objetos con los dedos, pues el sensibilizador ha de actuar solamente 10 segundos.

Procédase de una o de otra suerte, una vez puesto el porta-objetos horizontal, y claro es, con la cara untada hacia arriba, se vierte sobre la preparación unos cuantos centímetros cúbicos del líquido sensibilizador, utilizando una pipeta o una copa de pico, y de tal modo *que cubra completamente la preparación*. Bastará pasar tres veces la llama de un Bunsen por la cara inferior del porta-objetos y se logrará la temperatura suficiente (emisión de vapores), dejando actuar el sensibilizador durante 10 segundos.

El sensibilizador que ha de utilizarse será distinto, según se trate de teñir las fibras elásticas en esputos re-

cientes (de pocas horas o del mismo día) o antiguos (de 3 a 5 días o más).

Para los esputos recientes, los sensibilizadores más recomendables, por orden de importancia y seguridad, son: el formol férrico, el formol clorhídrico y el formol nítrico.

Formol férrico:

Agua ordinaria	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Percloruro de hierro.....	VIII gotas

Formol férrico clorhídrico:

Agua ordinaria	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Percloruro de hierro.....	VIII gotas
Acido clorhídrico.....	II »

Formol férrico nítrico:

Agua ordinaria	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Percloruro de hierro.....	VIII gotas
Acido nítrico	II »

Aunque no con tan buenos resultados, también es aplicable a los esputos recientes el formol aluminico férrico:

Formol aluminico férrico:

Solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Percloruro de hierro.....	IV gotas

El formol férrico permite una coloración de las fibras elásticas (con la fuchina y el formol férrico) en violeta no muy intenso, pero tiene la ventaja de dar una coloración de fondo en violeta muy pálido algo rojizo.

El formol férrico clorhídrico consiente una coloración de las fibras elásticas en violeta intenso, aunque acen- tuando también la coloración de fondo.

El formol férrico nítrico se comporta de modo análogo al formol férrico clorhídrico, aunque exagera algo la co- loración de fondo.

En fin, el formol alumínico férrico, aunque de efectos parecidos al anterior, da todavía una tinción de fondo más intensa.

Si el esputo es antiguo (de 3 a 5 días o más) no hay ya inconveniente en utilizar, además de los sensibilizadores ya citados, con excepción quizá del primero, los que a continuación se citan:

Formol clorhídrico:

Agua ordinaria	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Acido clorhídrico.....	VIII gotas

Formol nítrico:

Agua ordinaria	40 c. c.
Formol	2 c. c.
Acido nítrico	VIII gotas

Formol alumínico:

Solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100	40 c. c.
Formol	2 c. c.

Cualquiera de estos sensibilizadores, pero sobre todo el último, permitirían una coloración de fondo demasiado intensa si actuaran sobre esputos recientes, pero este inconveniente no es ya de temer en los esputos antiguos, pues la histólisis ha disminuído o suprimido la colorabilidad de los núcleos celulares. Por lo demás, todos ellos consienten una tinción intensísima de las fibras elásticas.

Una vez que tales sensibilizadores han actuado sobre la preparación durante 10 segundos (es el tiempo mínimo, que puede prolongarse cuanto se quiera) y en caliente (hasta la emisión de vapores), *antes de que se seque*, se lava a chorro o, si se teme que la preparación se deteriore (mucho cuidado con las preparaciones que después de fijadas poseen todavía brillo), en un recipiente cualquiera con agua abundante.

Coloración de las fibras elásticas. — Después de la acción del sensibilizador y del lavado en agua, se procede a la coloración de las fibras elásticas.

Para lograr dicha coloración con toda comodidad es muy recomendable proceder en la forma siguiente:

En una cubeta de Borrel o en una de porcelana a propósito para tinciones, o en todo caso, en un vaso pequeño de cristal de los llamados costadillos, se prepara en el acto la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100.

Fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100:

Agua ordinaria	40 c. c.
Fuchina de Ziehl	LX gotas

En esta solución, que se conserva por poco tiempo (5 a 8 días), se sumergen las preparaciones durante un minuto (tiempo mínimo que puede prolongarse sin inconveniente). Después se lavan en agua.

Viro-fijación de la coloración de la fuchina. — Lavada ya la preparación, es necesario fijar la coloración de las fibras elásticas, teñidas en rojo por la fuchina. Esto se logra haciendo actuar sobre la preparación cualquiera de los líquidos sensibilizadores citados, aunque conviene para mayor sencillez y comodidad que sea el mismo sensibilizador que actuó antes de la coloración con la fuchina. El sensibilizador usado después de la tinción con la fuchina, no sólo fija la coloración, sino que la hace cambiar del color rojo al violeta. En una palabra; *el mismo agente es sensibilizador antes de la coloración con la fuchina y viro-fijador después de dicha coloración.*

La viro-fijación se logra en el plazo mínimo de 10 segundos, plazo que puede prolongarse cuanto se desee sin ningún inconveniente, pero sin ventaja, según creemos.

Es práctica muy cómoda preparar el viro-fijador en una cubeta de Borrel, de donde se puede tomar con una pipeta para usarle como sensibilizador y en la que pueden sumergirse las preparaciones que han sido ya lavadas después de la coloración con la fuchina. Los sensibilizadores o viro-fijadores se conservan durante mucho tiempo, quizá indefinidamente.

Terminada la viro-fijación se procede al último lavado en agua.

Secado y montaje. — No hay necesidad de esperar a que la preparación se seque espontáneamente. Es preferible secar con rapidez, pasando el porta-objetos directamente por la llama de una lámpara de alcohol o de un mechero Bunsen.

Seca ya la preparación, y para evitar el gasto de cubre-objetos (las fibras elásticas se perciben muy mal en preparaciones sin montar y empleando objetivos a seco), estando aún el porta-objetos bien caliente, se extiende sobre la preparación una gota de bálsamo del Ca-

nadá disuelto en xilol, en toluol o en su esencia, haciendo resbalar sobre ella una varilla de vidrio. El bálsamo se seca en pocos segundos y la preparación puede ser examinada, desde luego, con objetivos a seco y hasta con los de inmersión.

Si la preparación merece ser conservada se monta definitivamente, calentando nuevamente el bálsamo que la cubre, o depositando sobre éste otra gota de bálsamo del Canadá disuelto en xilol o toluol y encima un cubre-objetos.

En el caso de que la preparación no merezca ser conservada, se puede aprovechar el porta-objetos sumergiéndole por algunas horas o días simplemente en el alcohol desnaturalizado o, si se quiere, y se puede, en xilol.

Examen microscópico de las preparaciones. — El examen microscópico de las preparaciones de esputos con fibras elásticas debe hacerse de la misma manera que cualquier preparación histológica.

El objetivo de inmersión, y aun los a seco de gran poder amplificante, deben ser proscritos. Basta casi siempre un aumento de 100 diámetros para distinguir las fibras elásticas más finas. Algunas agrupaciones de fibras elásticas son ya perceptibles con un cuentahilos.

Peró si es suficiente el empleo de objetivos débiles, el examen microscópico debe ser muy minucioso. No se crea que en una preparación de esputos, hecha directamente, sin homogenización, van a encontrarse cientos o miles de fibras elásticas. Estas son, en general, poco numerosas.

Las fibras elásticas, que han sido teñidas con los métodos que dejamos descritos, aparecen siempre en color violeta más o menos intenso, más intenso, sin embargo, que el de los núcleos celulares y que la mucina. No obstante, en los esputos recientes muco-purulentos, pero muy mucosos, en los que, como ya hemos dicho, la extensión es difícil,

porque se secan rápidamente y la preparación ya fijada tiene mucho brillo, los núcleos celulares desgarrados y estirados, así como la mucina, en virtud de las manipulaciones mecánicas con las pinzas o la aguja, dan una imagen microscópica francamente fibrilar. La busca de las fibras elásticas es entonces particularmente difícil, no obstante poseer una coloración violeta más intensa que los núcleos de las células y la mucina, porque el problema que se plantea es éste: *distinguir fibras elásticas de fibras de cromatina y de mucina.*

Cuando el esputo es antiguo (de 3 a 5 días) o aun siendo reciente se ha extendido en capa uniforme, mezclando previamente el grumo con una pequeña gota de agua, desaparece el aspecto microscópico fibrilar de los núcleos celulares y de la mucina y las fibras elásticas se perciben con toda claridad y corrección.

Caracteres de las fibras elásticas en los esputos. — Utilizando nuestros métodos de tinción, puede afirmarse que las fibras elásticas no se confunden con nada; pero, eso sí, precisa haberlas visto por lo menos una vez. Su color violeta intenso, más que su forma, debe siempre servir de guía. (Figs. 1, 2, 3, 4, y 5.)

Tan sólo a un principiante puede inducir a error las líneas violeta obscuro, semicirculares, que aparecen en preparaciones de esputos muy antiguos y que son debidas a una especie de arrugamiento de la preparación, porque al calentar se han formado pequeñas burbujas que han estallado; pero tales líneas, además de ser más pálidas que las fibras elásticas y semicirculares, rodean siempre un espacio claro. Más fácil es confundir las fibras elásticas con micelios, como a nosotros nos ocurrió una vez que se nos contaminaron unos esputos por un hongo del aire, pero la coloración de los micelios es de un violeta más pálido y algo rojizo y su forma es también muy distinta (Fig. 2).

Quizá haya posibilidad de confundir las fibras elásticas con los filamentos micelianos aislados o en madejas, en la oosporosis pulmonar, a juzgar, al menos, por las figuras que hemos visto en la obra ya citada de Dargallo.

Por lo demás, las fibras elásticas, son de formas tan variadas que, por muchas que se hayan visto, difícilmente se encontrarán dos iguales. Es verdad que, de ordinario, aparecen como retorcidas, de límites correctos, con divisiones en ángulo agudo (probablemente fibras del saco alveolar), otras son gruesas, en forma de madejas enredadas y como rúbricas elegantes (fibras del orificio alveolar y fibras comunes, casi seguramente). Precisamente por la infinita variedad de formas de las fibras elásticas, es por lo que hemos creído necesario dibujar gran número de ellas y, aun así, no tenemos la pretensión, ni mucho menos, de haber logrado representar sino un número escaso de tipos, si así pueden llamarse (Figs. 3 y 4). Es inadmisibile la afirmación de muchos autores de que las fibras elásticas en los esputos tienen siempre aspecto alveolar. Precisamente, el tipo alveolar es rarísimo, dígase cuanto se quiera en contrario.

En una palabra; aparte de la forma y de la coloración, las fibras elásticas tienen un no sabemos qué, un sello especial que, visto una vez, no se olvida jamás.

Modificaciones de la técnica cuando los esputos son pobres en fibras elásticas. Homogenización y centrifugación.— Si un detenido examen microscópico de un par de preparaciones ejecutadas siguiendo la técnica ya descrita, no nos revela la existencia de una sola fibra elástica, no se pierda el tiempo haciendo preparaciones gruesas (especie de tortillas sobre el porta) pues, como hemos dicho, con los métodos citados, no se consigue teñir las fibras elásticas en tales preparaciones.

Procédase, y esto es lo más seguro, a la homogenización

de los esputos. ¡¡Homogenización!! Palabra mágica que hace poner mal gesto a los hombres de laboratorio que sólo les interesa los diagnósticos remunerados. Pues sí; procédase a la homogenización, operación fácil, rápida y de una importancia de primer orden para buscar fibras elásticas en los esputos.

He aquí la técnica clásica, que no hemos intentado modificar por creer que es muy práctica:

Viértase en un tubo de ensayo o de cultivo 5 ó 10 c. c. de esputos; agréguese igual volumen de solución acuosa de potasa al 10 por 100; agítase la mezcla unos minutos hasta lograr una homogenización grosera; caliéntese dicha mezcla (hasta la ebullición) y agréguese en el mismo tubo tres o cuatro veces su volumen de agua. En seguida, centrifúguese durante unos cinco minutos.

Si no se dispone de aparato para centrifugar — ¡entonces sí que hay que armarse de paciencia! — viértase el contenido del tubo en una copa de fondo estrecho y abandónese durante 24 horas.

El depósito, producto de la centrifugación o de la sedimentación, se extenderá en un porta-objetos mezclando una partícula de él con otra de esputo objeto del examen. Así se consigue que se adhiera perfectamente al porta y no se desprenda al lavar. No es recomendable mezclar una partícula del depósito con solución de albúmina o de albúmina y glicerina.

Obtenida ya una preparación y fijada como de costumbre, puede teñirse por cualquiera de los siete métodos descritos. Todos, absolutamente todos, dan resultados sencillamente admirables.

Las fibras elásticas se tiñen intensamente en violeta mucho más intensamente que cuando se hacen preparaciones extendiendo directamente los esputos: es que la potasa actúa como mordiente de la fuchina.

Como se ve, la busca de las fibras elásticas en los esputos, previa homogenización, centrifugación y tinción, además de ser muy segura, se hace en ¡¡10 ó 15 minutos!! Quienes han padecido el método de coloración con la orceína o con la fuchselina, no tienen derecho a quejarse.

RESUMEN TÉCNICO

1.º Extensión en capa delgada. 2.º Fijación con el calor. 3.º Sensibilización de las fibras elásticas con formol férrico, formol férrico clorhídrico, formol férrico nítrico o formol alumínico férrico, si se trata de esputos recientes, y con los tres últimos, o con formol clorhídrico, formol nítrico o formol alumínico, si de esputos antiguos, durante 10 segundos y en caliente (hasta la emisión de vapores). 4.º Lavado en agua. 5.º Tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 en agua ordinaria, 1 minuto. 6.º Lavado. 7.º Viro-fijación con cualquiera de los líquidos sensibilizadores, 10 segundos. 8.º Lavado. 9.º Secad con la llama y, estando aún el porta-objetos caliente, extended una gota de bálsamo por toda la preparación. 10. Examen microscópico a 100 diámetros.

En síntesis: ateniéndonos solamente a las operaciones fundamentales, los nuevos métodos de coloración de las fibras elásticas en los esputos pueden exponerse así:

1.º método: Formol férrico — Fuchina — Formol férrico. (Ff. F. Ff.)

2.º método: Formol férrico clorhídrico — Fuchina — Formol férrico clorhídrico. (Ff. cl. F. Ff. cl.)

3.º método: Formol férrico nítrico — Fuchina — Formol férrico nítrico. (Ff. n. F. Ff. n.)

4.º método: Formol alumínico férrico — Fuchina — Formol alumínico férrico. (F. al. f. F. F. al. f.)

5.º método: Formol clorhídrico — Fuchina — Formol clorhídrico. (Fcl. F. Fcl.)

6.º método: Formol nítrico — Fuchina — Formol nítrico. (Fn. F. Fn.)

7.º método: Formol alumínico — Fuchina — Formol alumínico. (Fal. F. Fal.)

En realidad no son sino tres métodos: 1.º Formol férrico — Fuchina — Formol férrico; 2.º Formol nítrico — Fuchina — Formol nítrico, y 3.º Formol alumínico — Fuchina — Formol alumínico, pues los otros cuatro constituyen más bien procedimientos.

PROCEDIMIENTO DE COLORACIÓN SUCESIVA DEL BACILO DE KOCH Y DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS

La coloración del bacilo de Koch y de las fibras elásticas en la misma preparación, fué el segundo problema que nos propusimos y, sin embargo, como ya dejamos dicho, quedó resuelto antes que el primero: el de la coloración simple de las fibras elásticas. No es, pues, extraño que nos haya preocupado mucho menos. Estábamos seguros de que todo perfeccionamiento en la técnica de la coloración simple de las fibras elásticas había de traducirse necesariamente por una mejora en el procedimiento de tinción sucesiva del bacilo de Koch y de las citadas fibras. Y así ocurrió en efecto.,

Seremos breves en la exposición de los ensayos que hemos realizado hasta dar por terminada nuestra tarea.

Ya hemos dicho que, cuando conseguimos teñir por vez primera las fibras elásticas, lo logramos en preparaciones de esputos en que previamente hicimos la coloración del bacilo de Koch. La técnica que empleamos fué la siguiente: extensión y fijación por el procedimiento habitual; coloración

ción con la fuchina de Ziehl en caliente (hasta la emisión de vapores) 10 minutos; lavado en agua; decoloración, primero, con ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ durante 2 minutos y, después, con alcohol de 60°, 3 a 5 minutos; lavado; formol férrico acético, 1 minuto; lavado; carmín aluminico de P. Mayer, 1 minuto; lavado; fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada, 1 minuto; lavado; formol férrico acético, 10 minutos; lavado, etc.

El procedimiento de coloración del bacilo de Koch no era otro que el de Biot modificado por nosotros, substituyendo el formol puro por el formol férrico acético (agua, 5 c. c.; formol, I gota; percloruro de hierro, III gotas; ácido acético, I gota), convencidos de que era absolutamente innecesario el empleo del formol oficial, ya que el mismo resultado se logra con soluciones muy diluídas, al 1 por 100 y aun hasta al 1 por 750. Con esta modificación del método de Biot estábamos seguros de teñir el bacilo de Koch en violeta negro, pero nos temíamos que al tratar de colorear las fibras elásticas con la fuchina diluída al 7'5 por 100 y acetificada, se tiñesen otros microbios que no fueran ácido y alcohol-resistentes y, por tal motivo, antes de intentar esta coloración, teñíamos con carmín, a fin de que este colorante sirviese de obstáculo para que la fuchina se fijase en no importa qué microbios, y a la vez, para lograr una coloración roja de fondo, que hiciese resaltar mejor las fibras elásticas que habían de aparecer teñidas en violeta azulado.

Pronto nos convencimos de que podíamos suprimir la primera solución de formol férrico acético, pues el bacilo de Koch teñido en rojo por el Ziehl adquiriría definitivamente el color violeta-negro al actuar la solución de formol férrico que utilizábamos al final.

Pero dispuestos a suprimir la coloración con el carmín, por ser colorante poco usado en los laboratorios de Bacte-

riología, y no sin cierto temor de obtener preparaciones en que apareciesen teñidos otros microbios distintos del de Koch, intentamos una modificación que nos dió admirables resultados. Reduciase tal modificación a teñir el bacilo de Koch según el procedimiento descrito (Ziehl en caliente, ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ y alcohol de 60°) y las fibras elásticas con la fuchina diluída al 7'5 por 100 y acetificada, durante un minuto, y el formol férrico acético por 10 minutos. El bacilo de Koch adquirió un color violeta-negro, los núcleos celulares se tiñeron en violeta pálido y las fibras elásticas en violeta azulado intenso. Un atento examen de las preparaciones así obtenidas nos demostró que no se teñían más microbios que el bacilo de Koch, lo que nos produjo la natural sorpresa.

Quisimos entonces convencernos de si el esputo sobre que operábamos estaba o no exento de otros microbios e hicimos una tinción con tionina. En tal preparación se veían infinidad de cocos y bacilos. Todavía teñimos otra preparación del mismo esputo con fuchina diluída al 7'5 por 100 y formol férrico acético y conseguimos el mismo resultado. Era indudable que el ácido nítrico que actuaba antes de la fuchina diluída impedía a ésta fijarse sobre tales microbios.

Cuando en nuestros ensayos de coloración simple de las fibras elásticas logramos convencernos de que no hacía falta que el formol férrico acético actuase durante 10 minutos, de que bastaban 10 segundos, intentamos, claro está, averiguar si eran suficientes también para transformar el color rojo del bacilo de Koch en violeta-negro y, en efecto, nos convencimos de la analogía, de la identidad, del bacilo de Koch y de las fibras elásticas respecto a este fenómeno: cambio de coloración del rojo al violeta.

Habíamos conseguido simplificar la técnica de la coloración sucesiva del bacilo de Koch y de las fibras elásticas

en tal grado, que lográbamos esta doble tinción con igual rapidez que para teñir el bacilo de Koch, por el método clásico, puesto que, el mismo tiempo que se tarda en la coloración de fondo con el azul de metileno, era el que nosotros necesitábamos para teñir las fibras elásticas.

Ni siquiera necesitamos decir que, a medida que fuimos encontrando los diferentes métodos de coloración simple de las fibras elásticas en los esputos, los fuimos ensayando en las preparaciones en que habíamos teñido previamente el bacilo de Koch. Así, después de la coloración del bacilo de Koch con la técnica antes descrita (Ziehl — ácido nítrico — alcohol) intentamos la de las fibras elásticas con los siete métodos ya detalladamente expuestos.

Hasta al realizar el ensayo de tinción de las fibras elásticas previa homogenización y centrifugación de los esputos, hicimos también la coloración del bacilo de Koch y de las fibras elásticas aunque con mediocres resultados. No es recomendable la homogenización con la solución de potasa al 10 por 100 para la investigación del bacilo de Koch, pero sí creemos que usando cualquiera de los procedimientos de homogenización que tanto se aconsejan (el de la antiformina, el del jugo gástrico florurado, etc.), puede investigarse en el producto de la centrifugación o de la sedimentación el bacilo de Koch y las fibras elásticas sin ninguna complicación técnica.

También hemos hecho la doble tinción del bacilo de Koch y de las fibras elásticas substituyendo la decoloración sucesiva con el ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ y el alcohol de 60°, por la simultánea con el alcohol clorhídrico, dejándole actuar de 5 a 10 minutos, y claro es que con admirables resultados. Pero para que no se nos tachase de innovadores de la técnica clásica de coloración del bacilo de Koch

(clásica en los libros, pues ya es sabido que en muchos laboratorios la técnica de la coloración del bacilo de Koch deja mucho que desear — supresión de la decoloración con el alcohol, disminución del tiempo que debe actuar el ácido nítrico, etc. etc.), hemos preferido someternos en absoluto a los preceptos más rigurosos (Ziehl en caliente 10 minutos, ácido nítrico al $\frac{1}{3}$, 2 minutos, alcohol de 60° 5 minutos.)

Lo que no hemos hecho ha sido intentar la coloración de los microbios no ácido y alcohol-resistentes, para que las preparaciones de esputos tuberculosos fueran completas. No sería recomendable seguramente la coloración con azul de metileno, pues, como el bacilo de Koch se tiñe en violeta, sería difícil diferenciarle, pero ¿no podría usarse el verde malaquita? No nos atrevemos a asegurarlo. En cuestiones de técnica histo-bacteriológica no se puede ser profeta. No ha mucho, en una comunicación a la SOCIETAT DE BIOLOGIA de Barcelona, relativa a la coloración del bacilo de Koch por el método de Biot modificado por nosotros, proponíamos que la tinción de los demás microbios se hiciese con la safranina, y, después, al ensayarla, nos convencimos de que no da resultados.

Vamos, pues, para terminar, a exponer concisamente la técnica de la doble coloración del bacilo de Koch y de las fibras elásticas, que nos ha dado resultados satisfactorios y constantes.

TÉCNICA DE LA COLORACIÓN SUCESIVA DEL BACILO DE KOCH Y DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS EN LOS ESPUTOS

- 1.º Extensión y fijación por el procedimiento habitual.
- 2.º Coloración con la fuchina de Ziehl en caliente (hasta la emisión de vapores), 10 minutos.

- 3.º Lavado en agua. (Puede suprimirse este tiempo.)
- 4.º Acido nítrico al $\frac{1}{3}$, 2 minutos.
- 5.º Alcohol de 60º, 3 a 5 minutos. (Puede substituirse esta doble decoloración sucesiva por la simultánea con alcohol clorhídrico de 5 a 10 minutos.)
- 6.º Lavado.
- 7.º Sensibilización de las fibras elásticas con cualquiera de los líquidos ya señalados, en caliente, 10 segundos.
- 8.º Coloración con fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 en agua ordinaria, 1 minuto.
- 9.º Lavado.
10. Cualquiera de los sensibilizadores que en este caso actúan como viro-fijadores, 10 segundos.
11. Lavado.
12. Secado y montaje en bálamo.

El bacilo de Koch, único microbio teñido, adquiere un color violeta negro; los núcleos celulares y la mucina se tiñen en violeta pálido; las fibras elásticas en violeta azulado intenso.

La circunstancia de no teñirse más microbio que el bacilo de Koch permite distinguirlo con toda facilidad y sin empleo del objetivo de inmersión. Basta una ampliación de 400 a 500 diámetros, que puede lograrse con objetivos a seco.

* * *

No queremos ni debemos terminar sin testimoniar nuestro sincero agradecimiento a los Dres. Varela Radio y Baltar Cortés, ya que, gracias a ellos, podemos hoy publicar este trabajo. Estos buenos amigos al enterarse de que el Director accidental de la Escuela de Veterinaria nos negaba todo recurso para continuar nuestra labor en

el Laboratorio de Histología y Anatomía Patológica de dicho Centro, nos ofrecieron su Laboratorio de Análisis clínicos, en éstas o parecidas palabras:

«Disponga usted de este Laboratorio como se le antoje; haga la distribución que más le convenga; gaste cuanto necesite y no se preocupe de su cuantía.»

Asimismo queremos demostrar nuestro sincero agradecimiento a los Dres. Novoa Santos y Gil Casares, pues no sólo nos animaron a continuar nuestras tareas, sino que pusieron a nuestra disposición los enfermos de aparato respiratorio de sus Clínicas de Patología general y Patología médica respectivamente, del Hospital de Santiago, facilitándonos también todos los datos clínicos que nos eran absolutamente necesarios.

CONCLUSIONES

1.^a Los métodos clásicos de coloración de las fibras elásticas en los esputos son dos: el de la orceína, propuesto por Barth y May y el de la fuchselina preconizado por Sahli.

2.^a El primero tiene el inconveniente de ser muy lento (24 horas), y el segundo, aunque más rápido (30 minutos a una hora), exige el empleo de un colorante difícil de preparar y conservar. Así se explica que por rara excepción sean utilizados en los laboratorios de análisis clínicos.

3.^a Los métodos de coloración de las fibras elásticas que nosotros aconsejamos están fundados en la tinción de dichas fibras con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100, precedida y seguida de la acción de determinados agentes que obran, en el primer caso, como sensibilizadores y en el segundo, como viro-fijadores de la coloración.

Una y otra no necesitan prolongarse más de 10 segundos. La coloración con la fuchina no es preciso que dure más de un minuto, por lo que, la coloración de las fibras elásticas en los esputos, comprendidas todas las operaciones que la conciernen, se logra en dos minutos.

4.^a No todos los métodos que preconizamos son igualmente aplicables a los esputos recientes (de pocas horas o del mismo día), y a los antiguos (de 3 a 5 días o más). Cuando los esputos son recientes se preferirán por orden de seguridad e importancia los métodos siguientes:

Primer método: Formol férrico — Fuchina — Formol férrico.

Segundo método: Formol férrico clorhídrico — Fuchina — Formol férrico clorhídrico.

Tercer método: Formol férrico nítrico — Fuchina — Formol férrico nítrico.

Cuarto método: Formol alumínico férrico — Fuchina — Formol alumínico férrico.

Para los esputos antiguos, además de los tres últimos métodos, podrán emplearse los que siguen:

Quinto método: Formol clorhídrico — Fuchina — Formol clorhídrico.

Sexto método: Formol nítrico — Fuchina — Formol nítrico.

Séptimo método: Formol alumínico — Fuchina — Formol alumínico. Con cualquiera de estos métodos las fibras elásticas se tiñen en violeta intenso y los núcleos celulares y la mucina en violeta pálido.

5.^a Los nuevos métodos de coloración de las fibras elásticas en los esputos superan a los métodos clásicos por su rapidez, facilidad y economía, ventajas que permiten ser utilizados a diario y en cualquier laboratorio de análisis clínico medianamente dotado.

A. Gallego

(Dibujos por R. Dieste)

Fig. 1.^a — Esputo tuberculoso.
Fibras elásticas. — Formol fé-
rrico—fuchina—formol férrico.
A : 100 diámetros

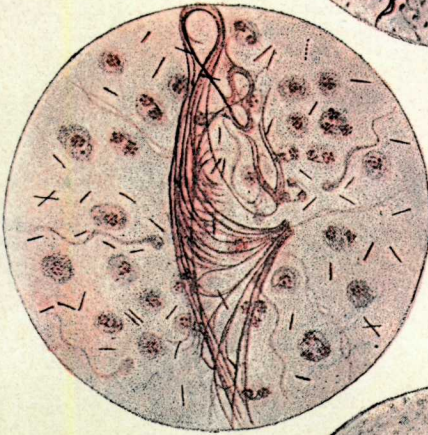
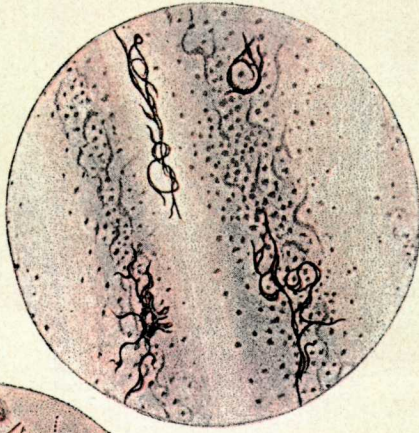
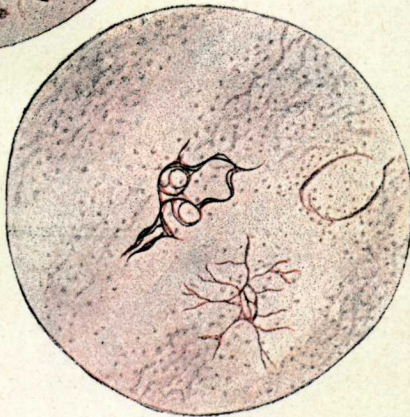


Fig. 5.^a — Esputo tuberculoso.
Fibras elásticas. Bacilos de
Koch. Leucocitos y células al-
veolares. — Fuchina de Ziehl—
ácido nítrico al $\frac{1}{3}$ — alcohol
de 60° — carmín de Mayer—formol
clorhídrico—fuchina—formol
clorhídrico. — A : 800 diá-
metros

Fig. 2.^a — Esputo tuberculoso.
Fibras elásticas. Micelio. Plie-
gues de la preparación, por fi-
jación defectuosa, que semejan
fibras elásticas. — Formol nítri-
co — fuchina — formol nítrico.
A : 100 diámetros



A. Gallego

(Dibujo por R. Dieste)

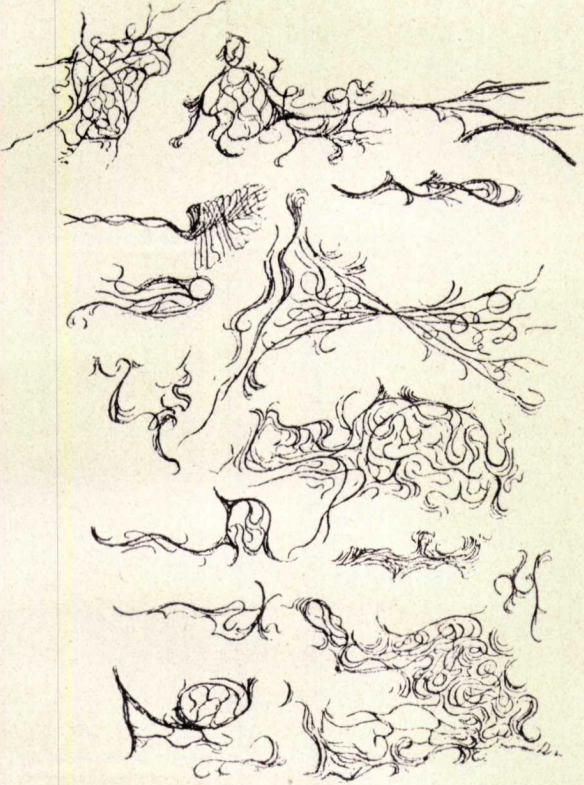


Fig. 3.ª—Diversos tipos de fibras elásticas
frecuentes en los esputos tuberculosos.
A : 100 diámetros

A. Gallego
(Dibujo por R. Dieste)

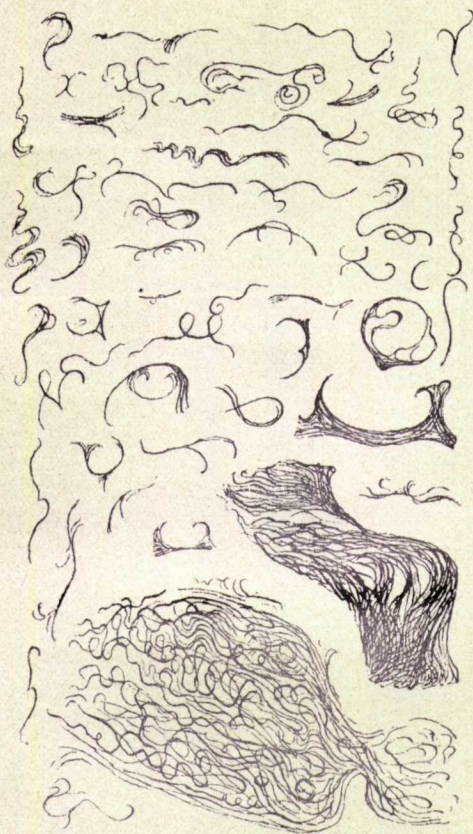


Fig. 4.^a—Diversos tipos de fibras elásticas
frecuentes en los esputos tuberculosos.
A : 100 diámetros

6.^a Todos los métodos de coloración que proponemos pueden emplearse después de la tinción del bacilo de Koch según la técnica clásica, una vez que se ha hecho la decoloración y suprimiendo, claro está, la tinción con el azul de metileno. El bacilo de Koch, único microbio que se tiñe, aparece en violeta negro; los núcleos de todas las células en violeta pálido; las fibras elásticas en violeta azulado intenso. Las fibras elásticas se distinguen perfectamente a 100 diámetros: los bacilos de Koch a 400 ó 500, y como son los únicos microbios teñidos, no hay necesidad de examinarlos con objetivo de inmersión.