

LA INFECCION ACCIDENTAL EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

Por **NESTOR MORALES VILLAZON, RICARDO A. MARGNI**
y **YOLANDA RIGHETTI**

Desde el comienzo de la era bacteriológica, los estudios se dieron cuenta de que las investigaciones para ser dignas de fe, debían como condición indispensable versar sobre cultivos puros, es decir, sobre los gérmenes específicos causa etiológica de la enfermedad, con exclusión de cualquier elemento extraño capaz de falsear la verdad de los resultados.

Pasteur, cuya intuición genial ha trazado normas en casi todos los capítulos de la ciencia de lo infinitamente pequeño, fué el primero en darse cuenta de que, sin cultivos de absoluta pureza, era inútil pensar en estudios que estuvieran a cubierto de la crítica, crisol por cuyo tamiz deben pasar los trabajos científicos.

Con la convicción, en aquella época dominante, de que el aire es el gran depósito donde pululan los seres microbianos, impuso como norma que ningún transplante se hiciera, sino después que el ambiente del laboratorio había permanecido quieto por varios minutos, para lo cual se evitaba las corrientes de aire y los motivados por el desplazamiento del personal. En su concepto la movilización de los gérmenes al esparcirlos por el medio ambiente, facilita la infección. Suponía con fundamento, que el reposo deja sedimentar los seres vivos y hace más difícil las contaminaciones.

Como en la infancia de la bacteriología, para los cultivos se usaban exclusivamente medios líquidos; caldo, orina, leche, infusión de heno y otros, era penoso y difícil mantener la pureza de los mismos, que estaban a merced del más pequeño descuido que permitía al germen extraño invadir la masa líquida y anular la especie útil, que luego

era difícil, sino imposible obtenerla nuevamente al estado de pureza.

Con el advenimiento de los medios sólidos, gelatina y particularmente agar, se dió un gran paso y a partir de ese momento, fué tarea relativamente simple contar con cepas irreprochables. Además las contaminaciones accidentales se podían notar con facilidad y aun en los casos en los que fuera muy grande, siempre era posible por siembras en placa, recuperar las cepas en estudio.

Dos pueden ser las consecuencias de la contaminación de los cultivos.

1º — Que se pierda un gérmen interesante que quizá sea imposible reemplazar.

2º — Que las experiencias den resultado falsos o dismetralmente opuestos a los que se esperaban.

ANTECEDENTES. — Conviene establecer como premisa, que no obstante las precauciones que se tomen y por grande que sea la habilidad de los técnicos, es casi imposible evitar que un cierto número de frascos o tubos de cultivo se infecten. Indudablemente la proporción es mayor o menor, de acuerdo a una serie de factores propios de la actividad de cada laboratorio, y por lo que a la mayoría de los nuestros se refiere, creemos que un promedio de 3 a 4 % se puede considerar como normal.

Durante los muchos años, más de veinte, que uno de nosotros desempeñó el cargo de bacteriologo de la Sección Peste, hubieron épocas, como las de las epidemias de Frias y Puchimahuida, en las que por orden del entonces Director del Instituto Dr. Alfredo Sordelli, hubo que sembrar hasta cien frascos de ginebra con agar inclinado cada cuarenta y ocho horas; y a pesar de labor tan intensiva, las contaminaciones fueron raras; quizás uno o dos por mil. Seguramente que un índice tan bajo, se debió a que el Pabellón Pasteur, fué reconstruído bajo la vigilancia de uno de los técnicos mejor informados sobre las exigencias de un laboratorio moderno: el Dr. Leopoldo Uriarte, y donde existe un local especial para las siembras, a cubierto de corrientes de aire y con ventanales tan herméticamente cerrados, que no dejan pasar el polvo exterior. Además, como este pabellón se encuentra lejos del tráfico urbano, le rodea un ambiente de singular reposo.

Como consecuencia de lo anteriormente dicho, se explica nuestra inquietud al comprobar que en la Sección

Vacunas Bacterianas, las contaminaciones observadas fueran considerablemente mayores, lo cual nos hizo pensar que había alguna falla técnica, cuyo origen no sabíamos explicarnos. Preguntando a los ayudantes que hace tiempo pertenecen a la Sección, nos informamos que el hecho no era nuevo y que con frecuencia en épocas anteriores, se inutilizaban partidas íntegras de vacunas, por encontrarse infectadas. Es posible que los investigadores que nos precedieron, no desconocieran el desagradable accidente, pero por razones que ignoramos, no les dieron mayor significación.

Dos cosas fué fácil demostrar: un índice de contaminación cuatro o cinco veces mayor sobre el promedio normal en las siembras corrientes en frascos de ginebra con agar inclinado, que sólo se destapan una vez (cultivos de Eberth, coli, piociánico, estafilo) y enormemente mayor, hasta el 25 y 50 % en los que previamente deben recibir alguna sustancia fertilizadora: líquido Fildes, suero, ascitis y en los que el frasco debe ser tapado dos o más veces; en estas circunstancias el índice de contaminación es sumamente elevado. El segundo hecho, es que los cultivos en medio líquido se infectan en una proporción aún mayor, con el grave inconveniente de que como es prácticamente imposible, garantizar en el primer momento sus buenas o malas condiciones, hay que esperar el control de los preparados, para saber si se los puede o no utilizar.

Buscando las causas que expliquen lo anteriormente dicho, se hicieron las siguientes experiencias: cajas de Petri con agar, se dejaron destapadas por cinco y diez minutos sobre una de las mesas del laboratorio y luego, unas se llevaron a la estufa a 37° y otras se dejaron en el medio ambiente. Después de 48 horas se pudo comprobar, que en unas y en otras, se habían desarrollado en cantidad casi igual, numerosas colonias, ocho o nueve por cm. cuadrado y algunos hongos de los géneros mucor y penicillun. Si se comparan estas cifras, con las encontradas por Miguel, en distintos ambientes de París, se nota que son bastante más elevadas.

Segunda experiencia: Diez frascos de cuatro litros, conteniendo medio Wheeler para bacilo pertussis, se sembraron en el laboratorio con las precauciones habituales y otros diez, en una cabina previamente sometida a la acción de los rayos ultravioletas. Los primeros resultaron infec-

tados en su totalidad, mientras que de los segundos, sólo uno corrió igual suerte.

La experiencia anterior demostró sin lugar a duda, que en el ambiente del laboratorio había que buscar el origen de las infecciones, las que seguramente procedían del aire cargado de polvo, que filtra a través de las ventanas, cuyo cierre es defectuoso. Merecen destacarse los hechos que a continuación se exponen: la Sección Vacunas Bacterianas del Instituto, ocupa un sótano, al que rara vez penetran los rayos solares, cuya acción depuradora y antimicrobiana es perfectamente conocida; el ambiente es húmedo y como el nivel se encuentra por debajo del de la Avda. Vélez Sársfield, por donde para un tráfico intenso de rodados de todos los tipos, que levantan nubes de polvo cargadas de detritus animales y vegetales, que pasan libremente por los requicios de puertas y ventanas llevando cantidades enormes de croorganismos y esporas, se explica el elevado tenor en gérmenes de la atmósfera de los laboratorios mencionados.

Conocida la causa principal de las contaminaciones, se imponía determinar los gérmenes que las causaban. Con este propósito durante tres meses, se aislaron todas las colonias de naturaleza exógena: en total 207 que fueron clasificadas con el siguiente resultado:

| | <i>Número de cepas</i> | <i>Por ciento</i> |
|-------------------------|------------------------|-------------------|
| Bacillus Subtilis | 89 cepas | 42,9 |
| „ Mesentericus | 12 „ | 5,8 |
| „ Vulgatus | 39 „ | 18,8 |
| „ Cereus | 4 „ | 1,9 |
| „ Adherens | 19 „ | 9,1 |
| „ Mutabilis | 14 „ | 6,7 |
| „ Aterrimus | 7 „ | 3,3 |
| „ Pseudotetánicus | 1 „ | 0,5 |
| „ Micrococcus Candicans | 13 „ | 6,2 |
| „ Sarcina Lutea | 9 „ | 4,4 |
| Total | 207 | |

Para la clasificación de estos gérmenes, hemos seguido las normas trazadas por la excelente monografía de la Dra. A. M. de Soriano (1). Los caracteres morfológicos y culturales de los gérmenes encontrados, corresponden fielmente a los descriptos por los autores.

MOVILIDAD Y CILIAS. — Todos los gérmenes estudiados,

con excepción de uno, son móviles y la forma de desplazamiento muy variable, si bien siempre el mismo para cada especie. Algunos atraviesan el campo microscópico con gran rapidez. Otros semejan pececillos en un acuario y algunos se mueven lentamente, reptando como serpientes. En lo que se refiere a la persistencia del movimiento, hay grandes diferencias, unos le pierden rápidamente y tan pronto como se presenta la esporulación, mientras que en otros se prolongan hasta quince días.

Algunos autores han pretendido clasificar los bacilos, sobre la base de las ciliias vibrátiles. No creemos que esta propiedad pueda servir de fundamento para distinguirlas, pues en una misma especie y en el mismo preparado, presentan tan pronto cinco como siete y más flagelos.

En el notable estudio de la doctora Soriano, ya citado, no se menciona nada de lo referente a las ciliias. Por nuestra parte, hemos querido dilucidar este punto, aunque sin llegar a ninguna conclusión definitiva.

Para la tinción de los flagelos, seguimos la técnica de Leifson modificada, que nos ha dado los mejores resultados y se recomienda tanto por su simplicidad, como por la regularidad de los resultados, siempre que se siga rigurosamente las recomendaciones del autor.

MATERIAL - *Porta objetos*. — Deben ser de la mejor calidad, sin rayas ni raspaduras. Nosotros los mantenemos en el líquido sulfocrómico hasta el momento de usarlos, luego se los enjuaga con agua destilada y se los seca con un lienzo fino que no deje pelusa, y se los pasa por la llama, hasta que no quede vestigios de grasa. Este punto es delicado y requiere ciertas prácticas. En la cara que debe llevar la preparación, se hará con un lápiz demográfico dos rayas, que lo dividan en tres espacios, poco más o menos iguales. Se les deja bajo una campana de vidrio hasta el momento de utilizarlos.

CULTIVOS. — Deben tener cuando más de quince a veinte horas y mejor en agar estria, recientemente preparado, acostumbramos poner en el fondo de los tubos, dos o tres gotas de caldo. Los gérmenes mejor previstos de ciliias, se les encuentra habitualmente en puntos próximo a la superficie del caldo.

COLORANTE. — La fórmula es la siguiente:

Alumbre de potasio al 5 % en solución acuosa 10 cm.³

Acido tánico al 2 % en solución acuosa 10 „

Fuchsimá básica en solución de alcohol de 95°

al 10 % 10 „

Los reactivos se mezclan en el orden indicado. El colorante no se conserva más de unos cuatro días, pasado dicho término disminuye su poder tintorial.

TECNICA. — En tubos conteniendo poco más o menos 10 cm.³ de agua bidestilada estéril, se vierte con pipeta capilar una emulsión densa del gérmen en estudio, la que se prepara poniendo en el tubo de cultivo uno o dos centímetros cúbicos de agua destilada estéril, la pátina bacteriana, se suspende mediante suaves movimientos de vaivén.

La opacidad debe ser más o menos de 500 millones por cm.³. Con lo misma pipeta que sirvió para preparar la dilución, se deposita una pequeña gota en la extremidad superior de la división media del porta objeto, e inclinándolo suavemente, de derecha a izquierda, se procura distribuir la por todo el espacio limitado por las dos líneas medias. Si el líquido forma gotas pequeñas, separadas unas de otras, quiere decir que el porta no fué bien flameado, y se debe utilizar otro. Se dejará secar espontáneamente a la temperatura ambiente.

COLORACION

Se vierten 4 ó 5 gotas del reactivo sobre la preparación, teniendo cuidado de que no desborde el espacio medio.

El colorante debe obrar durante diez a quince minutos. En varios ensayos, hemos visto que el tiempo óptimo, es de doce. Se lava con agua destilada y se deja secar; se observa con inmersión homogénea.

Si se quiere obtener un resultado más artístico, se puede después de lavar el preparado, hacer una doble coloración, para lo cual basta colorear, con azul metileno alcalino dos o tres minutos. Podemos afirmar después de larga y reptida experiencia, que con el método de Leifson se obtienen regularmente buenos resultados.

CONCLUSIONES

1) La infección frecuente de los medios de cultivo, constituye un accidente molesto, que provoca aumento innecesario de trabajo y económicamente resulta una pérdida, que a nadie beneficia.

2) Sería fácil evitar los inconvenientes apuntados,

construyendo como anexo a la Sección, una o dos cabinas provistas de luz ultra-violeta, en las que se haría las siembras y recolección de los cultivos.

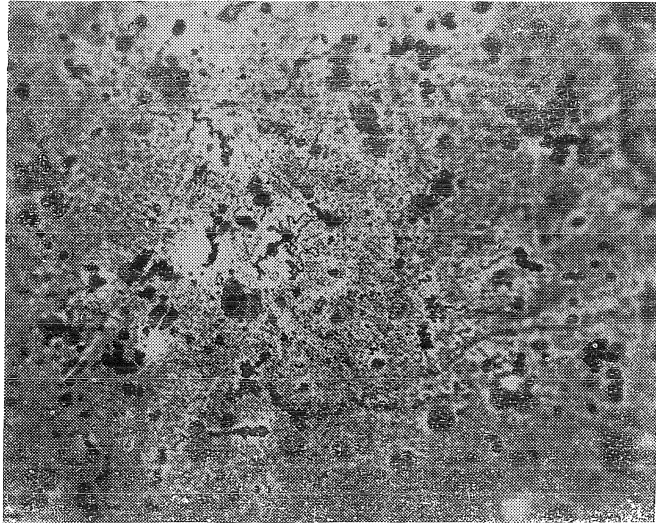
CONCLUSIONS

7) The frequent infection of culture media is a very heavy accident, that causes an unnecessary increase of work, with an economic loss, with no benefit for anybody.

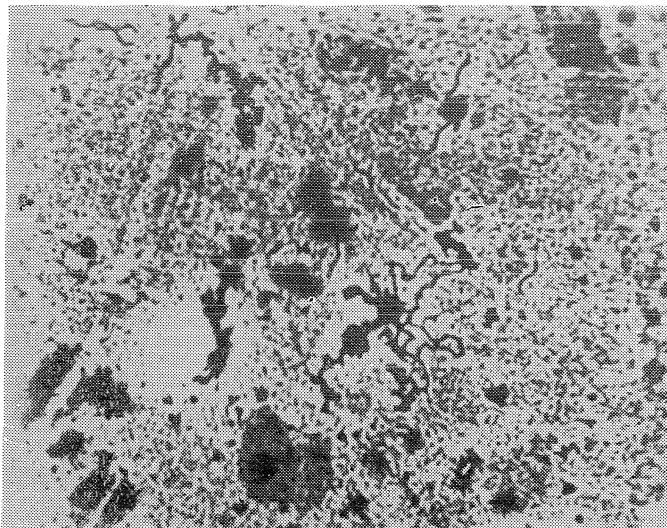
It should be easy to avoid said troubles, building close to the laboratory, one or two cabins furnished with ultra-violet light, where the seeding and collection of cultures can be made.

BIBLIOGRAFÍA

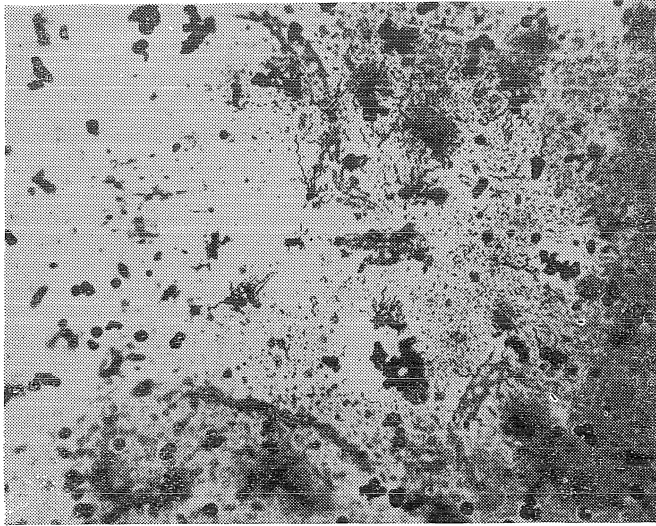
- 1) A. M. DE SORIANO. — *Estudio sistemático de algunas bacterias esporuladas. Revista del Inst. Bacteriológico*. Volumen VI. Nº 5. Marzo 1935.



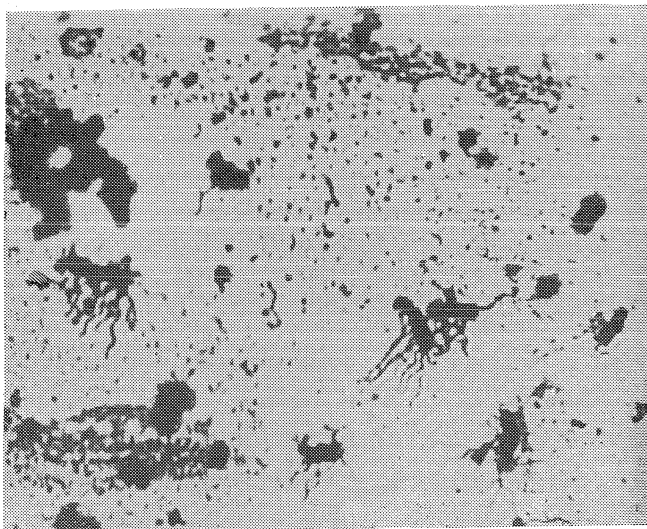
B. cereus. Coloración de cilia por el método de Leifson modificado.
Aumentado 625 veces.



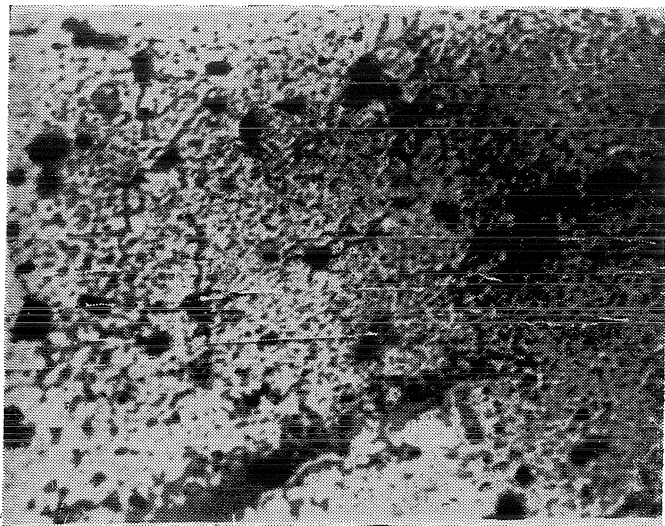
B. cereus. Coloración de cilia por el método de Leifson modificado.
Aumentado 1430 veces



B. subtilis. Coloración de cilias por el método de Leifson modificado.
Aumentado 625 veces.



B. subtilis. Coloración de cilias por el método de Leifson modificado.
Aumentado 1430 veces.



B. mutabilis. Coloración de cilias por el método de Leifson modificado.
Aumentado 1430 veces.