LABORATORIO

DEL DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

Sobre la sensibilidad del método Ficker-Müller en la determinación del bacilo de Eberth en las aguas.

Por Enrique Eudoro Suer.

I

El rol que, como vector de la fiebre tifoidea juega el agua de bebida, es demasiado conocido para que no haya dado y siga aún dando motivo á un sinnúmero de trabajos, cuyo resultado es introducir alguna modificación en los métodos de que disponemos para el reconocimiento del germen que la produce, tan perjudicial á la salud pública.

Las dificultades de su investigación estriban en que, no sólo no se multiplica en las aguas subterráneas y de pozo, sino que perece al cabo de diez ó catorce días.

No se debe sin embargo olvidar la posibilidad de una propagación de la vida del Bacilo de Eberth en el agua, debida á una precipitación hacia el fondo del pozo, lo que permitiría infecciones sucesivas después de un tiempo, ocasionándose de este modo la reaparición de la enfermedad.

Así, el doctor Manuel V. Carbonell ha constatado la presencia del bacilo tífico, en un agua proveniente de un aljibe de una casa de Flores, 35 días después de producido un caso de fiebre tifoidea. Verdad es que no ha podido probar la falta de una infección constante, producida por filtraciones de la primera napa también infectada.

Por otra parte el bacilo tífico resiste la congelación; razón por la cual, se le ha encontrado en muestras de hielo, provenientes de aguas infectadas.

Estas causas son las que han inducido á los autores modernos á buscar métodos por los que someten al análisis cantidades considerables de agua, condensando los microbios por un artificio apropiado; aglutinación por un suero antitífico muy activo (*Windelbandt, Schepilewsky, Chantemesse, Altschüler, Mine, etc.*) ó precipitación por los agentes químicos (*Vallet, Schüder, Hagemann, Ficker, Hoffmann, Müller, etc.*)

En el presente trabajo he procurado cerciorarme personalmente de la sensibilidad de un método, el de Ficker-Müller, que ofrece ventajas, á mi juicio, por la facilidad de aplicarlo sin empleo de aparatos costosos (centrífuga) que no están siempre á mano en todos los laboratorios.

Hago preceder mis experiencias por una breve reseña de los procedimientos químicos de precipitación para la investigación del bacilo de Eberth en las aguas.

II

Sobre la comprobación del bacilo de Eberth, mediante los procedimientos químicos de precipitación.

A Vallet cabe el honor de haber sido el primero en combinar las precipitaciones mecánicas y químicas; publicando el resultado de sus investigaciones en una obra titulada: *Une nouvelle technique pour la recherche du bacille typhique dans les eaux de boissons.*

Emplea Vallet para la sedimentación soluciones saturadas de hiposulfito de sodio y de nitrato de plomo de cada una de las cuales agrega 4 gotas, para precipitar 20 cm³ de agua, que se centrifuga durante 4 ó 6 minutos. El sedimento formado, después de agotar el agua que contiene, es redisuelto por medio de la solución de hiposulfito de sodio, agregada gota á gota; y, por último, es sembrado en gelatina de Elsner.

Por buenos que sean los resultados que Vallet haya obtenido con su procedimiento, tiene la desventaja de utilizar pequeñas cantidades de agua y una máquina centrifugadora que sólo puede existir en grandes laboratorios.

El método de Vallet fué contraloreado y esencialmente perfeccionado por Schüder, quien emplea mayores cantidades de agua, obtiene un sedimento completamente utilizable y suprime la centrifugadora.

Su método es el siguiente:

A 2 litros de agua, agrega 20 cm³ de una solución de 7,75 gramos % de hiposulfito sódico; y 20 cm³ de otra solución al 10 % de nitrato de plomo. Después de agitar bien y dejar reposar por espacio de 20 á 24 horas, en altos cilindros de vidrio, el sedimento obtenido es redisuelto en 14 cm³ de una solución concentrada de hiposulfito sódico (10 %) sembrándose en seguida en placas.

Por este procedimiento Schüder llegó á constatar el Bacilo de Eberth, en dos litros de agua de canal infectada con $\frac{1}{1000}$ de ansa de cultura en agar-agar.

A pesar de haber Schüder mejorado notablemente el procedimiento de Vallet, su método no permite relacionar cuantitativamente en manera alguna, los bacilos tíficos del agua, ni aun comparar los resultados obtenidos con los gérmenes sembrados, como lo han demostrado M. Ficker y O. Müller en numerosas experiencias de control del procedimiento de Schüder; considerando como causa de la pérdida sufrida en este procedimiento, el hecho de que no todos los bacilos son sedimentados, y la mortalidad ocasionada por el largo reposo requerido.

Más tarde M. Ficker, siguiendo sus investigaciones en el mismo sentido, encuentra una sal que, mucho más activa que la anterior sedimenta más rápidamente los gérmenes contenidos en el agua, previa alcalinización con una solución al 10 % de carbonato sódico. Es esta sal el sulfato de hierro, también al mismo título.

Se ha discutido largamente, si la solución de hierro empleada por M. Ficker debe ser de sulfato de hierro (*ferroso*) ó sulfato férrico; y á este respecto cabe decir que el título de la solución contesta por sí sólo á la pregunta; pues siendo el sulfato férrico mucho menos soluble, á este título reprecipitaría al cabo de algunos minutos.

M. Ficker emplea la misma cantidad de agua que Schüder, es decir, 2 litros, que alcaliniza mediante 8 cm^3 de la solución de sodio precitada; y, precipitada en seguida por 7 cm^3 de la solución ferrosa; se agita bien con una larga varilla de vidrio, y se coloca en la heladera.

Después de un reposo de 2 ó 3 horas, se decanta el líquido que sobrenada, y se agrega al sedimento la mitad de su volumen de una solución al 25 % de acetato neutro de potasio. En seguida se agrega á una parte del sedimento disuelto, dos partes de caldo esterilizado; y esta mezcla es sembrada por pequeñas porciones en placas de Drigalski-Conradi para lo cual es necesaria una varilla de vidrio encorvada.

Por este procedimiento, M. Ficker ha obtenido excelentes resultados; siendo aún mejores éstos cuando empleaba la centrifugación.

El término medio encontrado fué de 97 á 98 % de la cantidad de gérmenes sembrada.

Como se ve, este procedimiento es inmejorable, efectuando la centrifugación; pero, si se tiene en cuenta lo anteriormente dicho á próposito del procedimiento de Vallet, vemos que si bien se ha adelantado notablemente, venimos á incurrir en el mismo error respecto á la centrifugación.

Este método, uno de los últimos y que mejores resultados ha proporcionado á los bacteriólogos, ha sido modi-

ficado por O. Müller en la forma que á continuación voy á expresar:

3 litros de agua previa colocación en un alto cilindro de vidrio, son alcalinizados por 12 cm³ de una solución al 10 % de legía de soda; y en seguida, precipitados por 10 1/2 cm³, de la misma solución de sulfato ferroso que utiliza M. Ficker.

Después de agitar bien con una varilla de vidrio y dejar reposar por espacio de 1 hora, se decanta con precaución, echando el sedimento sobre un embudo con papel de filtro esterilizado.

Después de terminada la filtración, (3/4 de hora como máximo) por medio de una espátula es sembrado el sedimento en placas conteniendo el medio de Drigalski-Conradi, teniendo la precaución de no llevar demasiado precipitado; pues, si la cantidad de bacilos tíficos es mucha, puede tropezarse con el serio inconveniente de que el crecimiento demasiado denso, dificulta la identificación de las colonias tíficas.

Como se ve, O. Müller suprime con su modificación al procedimiento de M. Ficker, la máquina centrifugadora y la redisolución del sedimento en acetado neutro de potasio; ventaja la primera que pone el procedimiento al alcance de todo experto bacteriólogo.

Además, Müller, ha creado un procedimiento propio, basado, en el mayor poder sedimentario de otra sal de hierro: el percloruro.

La técnica de este nuevo procedimiento, es la siguiente:

3 litros de agua colocados en un alto cilindro de vidrio, son precipitados mediante 5 cm³ de una solución oficinal de percloruro de hierro.

Después de 1/2 hora de reposo, se filtra y siembra en placas de Drigalski-Conradi; en este caso, según el autor, no es necesario la alcalinización.

El doctor Carbonell en su trabajo: «*Profilaxia de la Fiebre Tifoidea*» manifiesta que sólo ha podido suprimir la alcalinización, en las aguas que contenían sales de cal; viéndose obligado siempre, á agregar 12 cm³ de legía de soda para obtener un buen sedimento.

Müller, comparando ambos métodos, llega á demostrar por medio de experiencias sucesivas, la superioridad del segundo; pues en el primero, constata un término medio de 75 1/10 % de la siembra; mientras que en el segundo llega á 88 4/5 %.

C. Feitsmantil ha creado últimamente, un nuevo procedimiento en el que se opera con menor cantidad de agua. La técnica es la siguiente:

A 1 litro de agua, se agregan 10 cm³ de una solución de soda; y, después removiendo enérgicamente el líquido, 5 cm³ de una solución de alumbre al 10 %.

Después de 2 á 3 horas de reposo, se decanta el líquido que sobrenada, y se coloca en otro cilindro con objeto de aumentar la sedimentación. Pasadas otras 2 horas, nuevamente se decanta y se siembra en placas. Sin embargo, este procedimiento no ha conseguido sobrepasar al de Müller; pues el poder sedimentario del alumbre, es mucho menor; el sedimento más difícil de manejar.

Enriqueciendo el sedimento obtenido por el procedimiento de Müller, mediante las *bili bovina*, se ha conseguido aumentar notablemente en sensibilidad.

III

Experiencias realizadas

La investigación de la pureza de un agua de bebida, es solicitada con bastante frecuencia, por las autoridades y por el público; y, no menos frecuente es, que sean practicados los análisis con criterios basados en determinaciones diferentes; en los numerosos laboratorios oficiales y privados, químicos ó bacteriológicos.

Creemos pues, en la necesidad de uniformar los procedimientos de análisis en la República; prefiriendo aquellos que por experiencia propia, les hayamos adquirido nuestra mayor confianza.

Inspirado en estas ideas, durante mi estudio de la Higiene y á proposición del Doctor Juan Carlos Delfino, quien ha tenido la gentileza de dirigirme durante mis investigaciones, es que decidí elegir como tema para mi trabajo inaugural, el ensayo de uno de los métodos que señalaban verdaderas ventajas en la determinación del bacilo de Eberth en las aguas; á saber: *el método de precipitación por las sales de hierro.*

Este procedimiento es un método combinado que podría denominarse *Método de Ficker-Müller;* pues es el procedimiento de Müller, previa alcalinización con carbonato sódico, sal empleada por Ficker.

La técnica es la siguiente: 3 litros de agua alcalinizados con 12 cm³ de una solución de carbonato sódico al 10 %, después de colocados en un alto cilindro de vidrio y agitados activamente, se precipitan por 10 1/2 cm³ de una solución de percloruro de hierro al mismo título.

El precipitado de carbonato férrico formado, arrastra mecánicamente hacia el fondo del recipiente, todos los gér-

menes que encuentra á su paso; es decir, tanto los bacilos tíficos, como todas las otras especies microbianas existentes en el agua; que es necesario separar más tarde, valiéndonos para ello de los medios de cultura especiales, y temperaturas apropiadas.

Después de 1/2 hora de reposo, previa decantación del líquido, se filtra; y el sedimento, mediante una pequeña espátula, es transportado á placas conteniendo el medio de Endo.

Ahora bien, generalmente cuando se está sedimentando, se observa una película de precipitado en la superficie que baja paulatinamente; esto es debido á la impureza del carbonato sódico empleado, que contiene una cierta cantidad de hidrato. Por consiguiente al mismo tiempo que se forma carbonato, se obtiene hidrato férrico que en virtud de su poco peso, se encuentra en la forma citada. Pero, como el anhídrido carbónico del aire actúa sobre el hidrato, lo transforma lentamente en carbonato; y, recién entonces es que se nota la sedimentación completa.

La reación química, que caracteriza este fenómeno podría descomponerse en tres faces; á saber:

PRIMERA FAZ

$$\underset{\textit{Cloruro férrico}}{Fe_2Cl_6} + \underset{\textit{Carbonato sódico}}{3CO_3Na_2} = \underset{\textit{Carbonato férrico}}{Fe_2(CO_3)_3} + \underset{\textit{Cloruro sódico}}{6\ Na\ Cl}$$

SEGUNDA FAZ

$$\underset{\textit{Cloruro férrico}}{2Fe_2Cl_6} + \underset{\textit{Hidrato sódico}}{12\ Na(OH)} = \underset{\textit{Hidrato férrico}}{_2Fe_2(OH)_6} + \underset{\textit{Cloruro sódico}}{12\ Na\ Cl}$$

TERCERA FAZ

$$\underset{\textit{Hidrato férrico}}{Fe_2(OH)_6} + \underset{\textit{Anhídrido carbónico}}{3CO_2} = \underset{\textit{Carbonato férrico}}{Fe_2(CO_3)_3} + \underset{\textit{Agua}}{3\ H_2O}$$

Partiendo de carbonato puro, la reacción estaría caracterizada, por la primera faz de la precedente.

En este caso la sedimentación es inmediata; y después de un cuarto de hora de reposo, se puede filtrar perfectamente.

IV

Manera de operar las infecciones

Con *una ansa* de platino encorvada en aro cuya continencia debe ser de 0. gr. 002 de substancia, se raspa suavemente la superficie de una cultura de bacilo de Eberth; mezclando íntimamente esto, al agua en experiencia. En este caso se dice que el agua ha sido infectada con *un ansa* de cultura de bacilo tífico.

Una ansa es mezclada á los 10 cm³ de agua esterilizada con uno de los cuales se infecta el agua á sedimentar.

Se repite la operación con 100 y 1000 cm³ de agua esterilizada, y se sigue el mismo procedimiento de infección. Tenemos en este caso, diluiciones al 1/10, 1/100 y 1/1000 respectivamente.

Tomamos nuevamente *una ansa* de cultura, que mezclamos á 10 cm³ de agua esterelizada; 1 cm³ de estos es llevado á 1000 cm³ de la misma agua; y, recién entonces, operamos la infección con un nuevo cm³ de estos últimos.

Se obtiene en este caso una diluición al 1/10.000; que, repetida con 100 y 1000 cm³ nos da diluiciones al 1/100.000 y 1/1.000,000.

Si no disponemos de suficiente agua esterilizada, operamos de la manera siguiente:

En el primer caso, es decir, tratándose de la diluición al 1/10, seguimos el mismo tratamiento que anteriormente.

Si deseamos hacer una diluición al 1/100, tomamos *un ansa* que mezclamos íntimamente á 10 cm³ de agua esterilizada; uno de los cuales es mezclado con 9 cm³ de la misma agua; y entonces efectuamos la infección en el agua á sedimentar con un nuevo cm³ de estos últimos.

De la misma manera seguimos operando; de suerte que, si queremos hacer una diluición al 1/100.000 de ansa, nos serán suficientes 46 cm³ de agua esterilizada.

Resultados obtenidos

Cuadro explicativo

1	2	3	4	5	6	7	8
3 litros	—	12 cm.^{3}	10 y 1/2 cm.^{3}	Endo	37°	24 horas	Positivo
10 cm.^{3}	3 litros	12 cm.^{3}	10 y 1/2 cm.^{3}	Endo	37°	24 horas	Positivo
100 cm.^{3}	3 litros	12 cm.^{3}	10 y 1/2 cm.^{3}	Endo	37°	24 horas	Positivo
1000 cm.^{3}	3 litros	12 cm.^{3}	10 y 1/2 cm.^{3}	Endo	37°	24 horas	Positivo
10.000 cm.^{3}	3 litros	12 cm.^{3}	10 y 1/2 cm.^{3}	Endo	37°	24 horas	Positivo
100.000 cm.^{3}	3 litros	13 cm.^{3}	10 y 1/2 cm.^{3}	Endo	37°	24 horas	*Negativo*

1) Significa cantidad de agua infectada con ansa de cultura.
2) » » » » » » 1 cm.^{3} de la anterior
3) » » » carbonato sódico necesario para alcalinizar.
4) » » » percloruro de hierro » » precipitar.
5) » medio de cultura especial utilizado.
6) » temperatura de la estufa.
7) » tiempo permanecido en la estufa.
8) » resultado { *Positivo* - se han encontrado colonias. / *Negativo* - no se han encontrado colonias.

Conclusiones

Como se desprende del cuadro que antecede, *la sensibilidad del método de Ficker-Müller, está comprendida entre 1/10.000 y 1/100.000 de ansa, de la infección practicada.*

APÉNDICE

Sobre la preparación de los medios especiales de cultura utilizados.

(Elsner—Drigalski—Conradi—Endo)

Medio de Elsner.—Se toman 500 gramos de papas, se mondan cuidadosamente, se hacen macerar en 1 litro de agua durante 3 ó 4 horas, se tamiza, y se deja reposar durante una noche. Se decanta entonces el líquido, se filtra y se adiciona de 15 á 20 % de gelatina disuelta á fuego suave. Se agrega una solución de soda, hasta que la reacción no sea sino muy débilmente ácida. Se clarifica con clara de huevo, se filtra y se esteriliza. Este medio se conserva muy bien en balones de una continencia aproximada de 100 gramos cada uno. Cuando se quiere hacer uso de esta gelatina nutritiva, basta agregar á cada balón de 100 grs., 1 gramo de yoduro de potasio; distribuyéndose después en tubos de cultura ordinarios ó en placas de Petri. Este medio nunca debe ser utilizado solo, pues podría inducir á errores.

En los casos típicos el bacilo de Eberth se presenta en este medio, bajo formas de gotas de agua claras y brillantes, con granulaciones extremadamente finas: mientras que el *bacillus Coli-Communis,* afecta la forma de gruesas granulaciones coloreadas en pardo.

Medio de Drigalski-Conradi.—(*OC*) Se toman 1500 gramos de carne de vaca desprovista de grasa, y se hace macerar por espacio de 24 horas, en 2 litros de agua. Después de expresión, el líquido se mantiene á la ebullición durante 1 hora; se filtra, y agrega 20 gramos de peptona químicamente pura, 20 gramos de nutrosa (mezcla de albumosas y caseína) y 10 de cloruro de sodio.

El todo se mantiene nuevamente 1 hora á la ebullición y después se filtra.

Se agregan entonces 60 gramos de gelosa, y se cuece durante tres horas; después de lo cual, se alcaliniza ligeramente, filtra y opera un nuevo cocimiento por espacio de 1/2 hora.

(β) Durante este tiempo, se preparan 260 gramos de solución de tornasol sensible, á los que se agregan 30 gramos de lactosa químicamente pura, y se mantiene á la ebullición durante 15 ó 20 minutos. Esta solución caliente, se mezcla á la primera por agitación.

(α) Habiéndose asegurado de la alcalinidad, se agregan 4 gramos de solución caliente, de soda anhidra al 10 %; y

20 cm³ de una solución fresca de 0. gramo 1 de cristal-violeta β de Hochst en 100 cm³ de agua destilada caliente.

El medio es repartido en placas de Petri; y, el excedente, se conserva en un balón propio.

Las colonias de bacilo Eberth sembradas sobre este medio, son azules virando algo al violeta, finas como gotas de rocío; mientras que las de colibacilo, son rojas y ovales.

Es este el medio más utilizado, á pesar del tiempo necesario para su preparación, porque es completamente seguro.

Hoy por lo general se emplea el extracto de Liebig, en lugar de la carne; y se varía en algo, su modo de preparación.

La técnica es la siguiente:

Para obtener 2 litros de medio, tomar 20 gramos de extracto de Liebig, 20 de nutrosa, 20 de peptona seca de Witte y 80 de agar-agar en bastones (*Stangen-Agar*); *no agregar cloruro de sodio.*

Agregar 2 litros de agua, y cocer el todo por espacio de 2 horas; filtrar á través de algodón hidrófilo, operación que no dura más de 15 minutos, á pesar del tenor elevado de gelosa.

Alcalinizar ligeramente, con una solución normal de soda cáustica.

Se agrega entonces la solución de tornasol y lactosa; y el cristal Violeta; *suprimiendo los 4 gramos de soda, empleados en el procedimiento primitivo.*

Medio de Endo.—La preparación de este medio, es mucho más simple que la de los precedentes; y también menos costosa; dando sin embargo muy buenos resultados.

Ha sido favorablemente apreciado por varios experimentadores (Clauditz, Marschall, etc.).

La técnica de su preparación, es la siguiente:

1.000 cm³ de gelosa al 3 %.
10 gramos de lactosa.
25 cm³ de una solución al 10 % de sulfito de soda.
10 cm³ de una solución al 10 % de soda cáustica.
4 cm³ de una solución alcohólica de fuchsina.

Las colonias de bacilo tífico sembradas sobre este medio, quedan transparentes, incoloras; mientras que las colonias de colibacilo, son opacas y toman un tinte rojo vivo.