El agar blando en la determinación de la movilidad de las bacterias

Su aplicación al estudio de los tipos entéricos

Por HECTOR SOSA

La introducción del agar en bacteriología, comunmente adjudicada a Roberto Koch, se debe a la señora de Hesse (Hitchens y Leikind, 1939). En sus trabajos sobre bacterias de la atmósfera, Walther Hesse empleaba tubos de gelatina por los que hacía pasar cantidades medidas de aire para calcular su contenido en gérmenes según el número de colonias desarrolladas. Pero muchas experiencias quedaban anuladas porque la acción proteolítica de las bacterias hacían imposible el recuento por licuación del medio. Sus deseos de obtener un gel, sin los inconvenientes de la gelatina, fueron satisfechos por su esposa Fannie, ayudante en su laboratorio, quien tuvo la idea de emplear el agar que ella utilizaba en la cocina para la preparación de jaleas. La receta provenía de su madre, que a su vez la conocía por un amigo que había vivido en Java donde, como en gran parte de las islas del Pacífico, las algas marinas constituyen una parte importante en las preparaciones culinarias. El descubrimiento fué comunicado por carta a Koch quien, en su nota preliminar sobre el bacilo de la tuberculosis (1882), hizo la primera referencia publicada sobre el uso del agar.

El hallazgo de la señora de Hesse ha significado la adquisición de uno de los elementos más útiles para el trabajo en bacteriología. En concentraciones de 1 a 3 % el agar presta a los medios de cultivo una consistencia adecuada para el aislamiento de bacterias, para el estudio morfológico de colonias, la obtención de desarrollo en superficie, etc.; manteniendo sus condiciones a las temperaturas de cultivo. En concentraciones menores del 1 % se obtienen los llamados medios semisólidos, o agar blando, con propiedades que han sido aprovechadas con distintos fines. Hitchens (1921) se ha ocupado especialmente de este tópico en una comunicación que durante mucho tiempo se nos había pasado inadvertida.

pero también podemos decir, con no menor razón, que los virus nuestros tienen la virulencia de los virus murinos, en cuyo caso resultará que los cobayos nuestros tienen una resistencia más alta.

Con el objeto de apreciar el comportamiento de nuestros cobayos con un virus murino conocido, obtuvimos de Santiago de Chile 2 cobayos inyectados con virus de origen mejicano que gentilmente nos fuera enviado por el Director del Instituto Bacteriológico, Doctor Mario Prado.

Los dos cobayos recibidos tuvieron una reacción térmica y el fenómeno de Mooser al 5º día de la inoculación. El pasaje de material de vaginal de estos animales, en ese momento, a 6 cobayos de nuestro criadero no dió fenómeno de Neill Mooser en ninguno y sólo en 2 dió reacción térmica. En 2 pasajes sucesivos a 14 cobayos la infección fué inaparente.

De los cobayos compañeros de los recibidos en Buenos Aires los pasajes sucesivos hechos en Chile dan una frecuencia de Neill Mooser de 10/15 y de 13/15 de reacciones térmicas.

La diferencia del comportamiento del virus en los dos laboratorios podría ser explicada por una pérdida de la virulencia, por una diferencia de sensibilidad de los cobayos y por una diferente técnica. Prácticamente puede ser descartada la última eventualidad y queda por decidir entre los dos primeros.

La conclusión más verosímil es que los cobayos utilizados por nosotros en Buenos Aires tienen una resistencia (inmunidad?) tal, que la infección con virus murino transcurre en forma atípica o inaparente.

Como se comprende, este asunto tiene una importancia e interés considerable pues plantea de manera muy precisa el problema de la etiopatología del tifus vinculado a las condiciones del animal sensible. Puede imaginarse que la raza de los cobayos usados es menos sensible; que existe una resistencia específica (inmunidad?), que existe una resistencia por alimentos protectores o por las condiciones de mantenimiento de los cobayos. De todas estas probabilidades, las relacionadas a la alimentación (influencia de vitaminas) y a la temperatura son ya conocidas y su investigación será realizada en un tiempo próximo.

III

Aunque no corresponde precisamente al asunto que tratamos, nos ocuparemos brevemente de las condiciones del ambiente en que se practicó la investigación y de algunos hechos vinculados a la epizootiología.

A lo largo de la ribera del Riachuelo existen depósitos de granos desde Puente Alsina y prácticamente hasta su desembocadura; en algunos de ellos y especialmente en los de la estación Ingeniero Brian han trabajado obreros que enfermaron de tifus benigno. De este lugar han provenido la mayor parte de las ratas examinadas desde el año 1937 en la Sección Peste, así como las investigadas por nosotros. Las ilustraciones dan idea del ambiente y el pequeño plano da la ubicación de los lugares donde fueron atrapadas las ratas. Los hallazgos de virus corresponden todos a Ingeniero Brian, que fué por otra parte el único lugar investigado de manera metódica e intensa; del galpón N° 4 — donde trabajó uno de los obreros que se infectó — se aisló el virus obteniéndose de las seis líneas, tres hallazgos positivos.

Un hecho bien interesante ya observado por otra parte en varias ocasiones en las mismas zonas es la variación grande de índice de cheopis (determinado correctamente) en lugares próximos. Es cierto que hay un error producido por la diferencia del número de las ratas y su pequeñez, pero las variaciones son tan grandes que inducen inmediatamente a investigar la causa de tal variación que va de 0 en 3 lugares a 10 y 9,3 en dos. Naturalmente lo que en seguida puede imaginarse sin dificultad es la posibilidad de crear en los lugares que son criaderos artificiales de ratas, y cuyo « rat proofing » es difícil y costoso, el « flea proofing » fundado en la biología de la pulga cuyo instinto seguramente no es un arma tan poderosa como el de la rata. No hay duda que ésta es sólo una posibilidad, la cual no está fundada en ningún experimento o en observación minuciosa y correcta y aún en el caso de ser efectivo el « flea proofing », subsiste el problema fundamental que es el de la rata.

CONCLUSIONES

1. — De seis lotes, entre doce, de pulgas de ratas (X cheopis), de graneros del puerto de Buenos Aires, fué aislado en animales de laboratorio, un virus constituído por Rickettsia. En otros dos lotes la infección puede considerarse cierta. El número de líneas positivas es de diez y el de negativas de trece.

2. — En la mitad de los cobayos la reacción térmica no ha sido significativa. No hay diferencia en la frecuencia e intensidad de la reacción térmica entre las líneas positivas y las negativas.

3. — El fenómeno de Neill Mooser fué observado en cuatro

En el Congreso Internacional de Biología de Montevideo se hizo un relato de dos métodos para el contralor de esterilidad de los productos inyectables (Sosa 1930). Uno de ellos se basaba en el empleo del agar blando al 0,25 %, y fué desarrollado teniendo en cuenta los estudios de Lignieres (1919), quien encontró que los medios con agar en esa concentración permitían tanto el desarrollo de las bacterias aerobias como el de las más estrictas anaerobias. Este medio, tal como fué presentado en Montevideo, con el volumen calculado para obtener la dilución necesaria de los antisépticos y con su dispositivo especial de cierre que facilita la manipulación aséptica, es el que aún se emplea para los ensayos de esterilidad en el laboratorio oficial de contralor de productos biológicos.

El agar blando ha sido utilizado también para la preparación de toxinas, el estudio morfológico diferencial del desarrollo de las bacterias anaerobias, y North (1909) encontró que se adapta para la conservación de los cultivos de colección por su cualidad de permitir la fácil difusión de los productos del desarrollo.

Pero, de las interesantes propiedades del agar blando sólo se hará especial referencia a su particularidad de permitir la migración de las bacterias móviles; observación que se debe a Hiss (1897) y Hesse (1908), que propuso el agar al 0,5 % para diferenciar al bacilo de Eberth de otros gérmenes intestinales.

La migración de las bacterias, en los medios semisólidos, hace que su cultivo adquiera aspectos que difieren según su grado de movilidad y la cantidad de agar contenido en el medio.

Cuando el desarrollo se efectúa en superficie, la colonia tiende a extenderse de acuerdo a la capacidad de traslación. Sobre el agar al 2 % son muy pocas las especies capaces de cubrir la superficie en película como el Proteus vulgaris, pero si se disminuye su concentración, se llega a conseguir la formación de « Hauch » con todas las bacterias móviles.

Los tipos ciliados del género Salmonella se extienden sobre el agar nutritivo al 0,5-0,7 %. Si la siembra se efectúa en el centro de la superficie de este medio contenido en una placa de Petri, y la cepa es poco móvil, el cultivo se inicia en forma de colonia aislada, pero llega el momento en que del borde de la colonia se desprende un velo tenue que puede cubrir toda la superficie. Si se toma material de este velo y se vuelve a repetir la siembra, en las mismas condiciones, el cultivo se extiende desde el comienzo rápidamente en película. La migración de las células más móviles ha favorecido el desarrollo de las bacterias mejor ciliadas, obte-

niéndose por selección un cultivo que es especialmente apto para preparar suspensiones para le determinación de anticuerpos ciliares, con notable resistencia a la aglutinación O.

En los medios inoculados en profundidad, cuando la cantidad de agar no es superior a 0,5 %, todas las bacterias móviles difunden más o ménos su cultivo produciendo aspectos distintos de desarrollo según su grado de movilidad. Y si la siembra se repite tomando material de los puntos extremos, el nuevo cultivo invade el medio enturbiándolo uniformemente. Es ésta una forma simple de excitar la movilidad y de mantener los cultivos perfectamente ciliados en forma que, sembrados en superficie de agar blando, permitan obtener de inmediato cultivos que darán óptimas suspensiones para la aglutinación ciliar. Para aumentar el efecto del agar blando en la selección de formas con extrema movilidad, puede guiarse el desarrollo por medio de un tubo de vidrio, abierto en sus dos extremos, que se sumerge en el medio. La siembra se efectúa en el interior del tubito y el material se toma de la porción exterior, después de haber sido forzado a recorrer dos veces la altura del agar.

De los métodos propuestos para obtener la inducción de variación de fase por la acción de sueros aglutinantes, también aquellos que se basan en el empleo del agar blando son los que dan mejores resultados: ya sea que se obtenga la dispersión de la fase inducida en el seno del agar, como ocurre en las técnicas derivadas del métodos de Vassen (1930), o su extensión en superficie al modo de Sven Gard (1938). Todas las veces que se empleó este último procedimiento se ha podido comprobar la afirmación de Herrmann (1939), obteniéndose cultivos en fase absolutamente pura.

Pero es en la determinación de la movilidad de las bacterias donde, en el curso de estas investigaciones, se ha encontrado que con la aplicación del agar blando se obtienen resultados de verdadero alcance práctico; habiéndose mostrado como un método indirecto más simple y sensible que el examen microscópico del cultivo en caldo en gota suspendida.

Para ello se empleó el agar al 5 ‰ en caldo de carne peptonizado al 2 %. El agar en rama era previamente lavado 12 horas en agua destilada renovada. Su incorporación se hacía en baño a 100°C y la filtración por papilla de papel en filtro de Buchner, con poca diferencia de presión y después de enfriar a 50°C. El medio repartido en tubos era esterilizado en autoclave a 115-120°C. Puede conseguirse mayor transparencia por clarificación con albú-

mina de huevo, pero esto no es absolutamente necesario, siendo suficiente filtrar en las condiciones indicadas.

La siembra se efectuaba por punción en el centro, observando el desarrollo a las 24 horas de cultivo a 27°C, volviendo a repetir el examen después de permanecer 24 y 48 horas a temperatura ambiente.

Las bacterias inmóviles desarrollan en la línea de inoculación en forma de trazo nítido sin tendencia a penetrar en el medio. En cambio, las bacterias ciliadas, al difundir en el agar, cultivan en forma característica según su capacidad de traslación: desde la formación difusa, que puede ser precursora de un enturbiamiento general, hasta el desarrollo uniforme en que no se distingue la zona de siembra.

Después de efectuar los ensayos preliminares, en el verano de 1938-39 se resolvió adoptar este método de determinación de movilidad en el estudio bacteriológico de las enfermedades entéricas. Desde un comienzo se hizo simultáneamente con el examen microscópico en gota suspendida de un cultivo en caldo, con el objeto de hacer determinaciones comparativas. Y siempre que se observó movilidad en caldo se obtuvo en agar blando un cultivo característico de cepa móvil. En cambio, en los casos en que el cultivo en caldo daba resultado negativo y el aspecto del desarrollo, con el método indirecto, era de bacteria ciliada, siempre se pudo comprobar la movilidad por el examen microscópico del cultivo en el medio semisólido.

Hay bacterias que no desarrollan sus formas móviles a 37°, lo que ocurre con cierta frecuencia con el P. morgani, p. ej., por lo que es conveniente mantener los cultivos 48 horas más a temperatura ambiente antes de hacer la lectura definitiva.

En el agar blando puede además comprobarse la formación de indol, agregando unas gotas (4-5) de reactivo de Ehrlich (*) sobre el cultivo. Y si el método no es tan sensible como cuando se efectúa la reacción después de una extracción previa de un cultivo en caldo con éter, es suficiente para el trabajo de eliminación de colonias de un mismo material en que ya se ha determinado una especie seguramente patógena. Sobre todo si es empleado después

*Paradimetilaminobenzaldehido	1 g.
Acido clorhídrico	20 ml
Alcohol 95°	95 »

del medio para la selección de colonias (Sosa 1939), al que complementa agregando dos datos más de importancia para la clasificación: la movilidad y la producción de indol.

CONCLUSIONES

El agar blando es de gran aplicación en el estudio de la movilidad de las bactērias.

Permite la selección de formas perfectamente ciliadas particularmente aptas para la investigación de aglutininas H.

Se ha comprobado que utilizado con el método de Sven Gard se obtienen cultivos en fase absolutamente pura como indica Herrmann.

En la determinación de la movilidad de las bacterias, la siembra en agar blando es un procedimiento más práctico y sensible que la observación microscópica de cultivos en caldo en gota suspendida.

Sobre el mismo medio en que se ha ensayado la movilidad se puede investigar la producción de indol, lo que aumenta las ventajas del método que se ha adaptado al estudio bacteriológico de las enfermedades entéricas.

BIBLIOGRAFIA

GARD, S. — 1937. *Ztschr. f. Hyg.* 120: 59.
GARD, S. — 1938. *Ztschr. f. Hyg.* 120: 615.
HERRMANN, W. — 1939. *Zentralbl. f. Bakt.* Abt. 1. 143: 207.
HESSE, W. — 1908. *Centralbl. f. Bakt.* I, 46: 89.
HISS. — 1897. *J. Exper. Med.* 2: 677, cit. p. HITCHENS.
HITCHENS, A. P. — 1921. *J. Infect. Dis.* 29: 390.
HITCHENS, A. P., y LEIKIND, M. C. — 1939. *J. Bact.* 37: 485.
KOCH, R. — 1882. *Berl. klin. Woch.* 19: 221.
LEVENSON, S. — 1938. *Mobilité et cils des bactéries.* Imp. des 2 Artisans. Paris.
LIGNIERES, J. — 1919. *C. Rend. Soc. Biol.* 82: 1091.
NORTH. — 1909. *J. Med. Research* 20: 359.
SOSA, H. — 1930. Congr. Intern. Biol. Montevideo. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 6: 40.
SOSA, H. — 1939. *Rev. Inst. Bact. D. N. H.* 9: 478.
WASSÉN, A. — 1930. *C. Rend. Soc. Biol.* 104: 523.
WASSÉN, A. — 1935. *Off. Intern. d'Hyg. Publ.* 27: 1121.