

"Estudio Comparativo de Diferentes Métodos
para
Determinación de Cuenta Bacteriana"

M. ANTONIETA MARTINEZ BRAVO



MEXICO, D. F.

1959



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

"Estudio Comparativo de Diferentes Métodos
para
Determinación de Cuenta Bacteriana"

TESIS

QUE PARA SU EXAMEN PROFESIONAL
DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA

M. Antonieta Martínez Bravo



MEXICO, D. F.

1959

*A mis padres con todo
cariño y gratitud.*

Quedo altamente agradecida por la ayuda e ideas
que me brindó el

Sr. Dr. Hubertus Fiege,

lo mismo al

Instituto Behring

por haber proporcionado todos los medios para
la realización de este trabajo.

A la Srta. Quím. Frieda Islas O.
y al Dr. Pablo Hurtado J.

Así como al

Sr. Q. F. B. Oscar Amor,

que bajo su dirección trabajé la presente tesis,
mi más sincero aprecio.

CAPITULOS

- I.—INTRODUCCION.
- II.—MATERIAL Y METODOS.
- III.—RESULTADOS.
- IV.—DISCUSION.
- V.—CONCLUSIONES.
- VI.—RESUMEN.
- VII.—BIBLIOGRAFIA.

I.—INTRODUCCION

INTRODUCCION

En los análisis de alimentos, especialmente de leche y agua las autoridades de Salubridad, dan una tolerancia determinada para el número de bacterias que se puedan encontrar en los mismos. Dicha tolerancia es permitida, porque se ha demostrado que el organismo es capaz de destruir determinados gérmenes, gracias a sus barreras de defensas naturales; cuando el número de gérmenes es mayor, tales defensas son insuficientes para contrarrestar una invasión bacteriana masiva, por lo que puede presentarse una infección por gérmenes de una patogenicidad no conocida.

En la preparación de sueros y vacunas, la determinación del número de gérmenes es importante, porque a concentraciones muy altas pueden presentarse reacciones anafilácticas o tóxicas, ya que las bacterias contienen diversas sustancias de naturaleza antigénica muchas de ellas tóxicas; pero deben llevar cantidad de gérmenes suficiente para inducir al organismo animal a la formación de anticuerpos.

Por consiguiente el número de gérmenes que debe llevar una vacuna, está condicionado entre un máximo y un mínimo o sea la cantidad máxima suficiente que no llegue a producir reacciones anafilácticas o tóxicas; y la mínima para obtener una óptima respuesta inmunológica.

Por lo general las vacunas destinadas a adultos humanos han de contener un total de 1,000 millones de gérmenes por ml. y para niños la mitad de esta cifra. (12). (Depende ésto de la virulencia de los microorganismos).

Dold (3) señaló, que todos los métodos actuales empleados para determinar la cantidad de gérmenes por ml. de una suspensión daban resultados muy inseguros, por sus mayores o menores errores en la técnica. En dicho trabajo Dold examinó con mucho criterio los diferentes métodos empleados para el cuanteo directo de gérmenes.

Wilson 1922 (23), Wilson et al. 1935 (24), hizo también un estudio crítico de diferentes métodos, señalando sus principales causas de error.

El valor antigénico y terapéutico de una vacuna, no reside únicamente en la cantidad de gérmenes, pero ésta debe tomarse en cuenta para su elaboración.

Los gérmenes no se pueden determinar exactamente, ya que esto es imposible de realizar, puede considerarse tan sólo un método de estandarización de vacunas, que permita hacer un sistema convencional de medida.

Numerosos investigadores, han propuesto diferentes métodos para cuenta bacteriana, de los cuales estudié los que parecen dar resultados más exactos.

Helber 1904 (7), Petroff Hauser (11), y otros, emplearon métodos en que se cuentan directamente las bacterias, mediante la observación al microscopio. Partiendo de la suspensión de gérmenes a una dilución conocida, se coloca una gota en una cámara cuenta-alóbulos o en una cámara especial para contar bacterias. Esta técnica fué introducida primeramente por Glynn y Cox 1911 (5), es una de las más laboriosas y requiere mucho cuidado pero se obtienen resultados muy satisfactorios.

Wright 1902 (25), para obtener un número de gérmenes de una suspensión dada, usó un método en el cual se relaciona el número de alóbulos rojos que hay en un ml., con el número de bacterias observadas, después de mezclar la suspensión con sangre y hacer extensiones finas en porta objetos.

Otros investigadores, practicaron el método de Cultivo en placas para cuenta bacteriana, original de Koch: (22), este método se lleva a cabo en cajas de Petri con diferentes medios de cultivo, según lo exijan los gérmenes de la suspensión a la que se va a hacer el conteo. Después de varias diluciones, se siembran e incuban los gérmenes y valiéndose del aparato cuenta-colonias, se obtiene un resultado relativo de bacterias, tomando en cuenta que cada germen forma una colonia.

Mc Farland (13), propuso hacer una comparación, entre la turbidez de una suspensión estandard de sulfato de Bario y una suspensión bacteriana. Esta determinación se llama Nefelométrica y debe ir acompañada de un cuanteo, que se hace siguiendo alguno de los otros métodos.

George Dichtl (2), basó su método en la centrifugación de cantidades determinadas de suspensión bacteriana, en vasos de centrifuga de Tommsdorff o Rosenthal, determinando el volumen de las bacterias sedimentadas.

Hopkins J. K. 1913 (8), presentó su método como medio conveniente para determinar aproximadamente la cantidad de substancia bacteriana usada como vacuna. Consiste en medir el volumen de bacterias sedimentadas después de la centrifugación, en un tubo capilar graduado; con estos gérmenes hacer una suspensión al 1% y comparar con una tabla de valores que este investigador determinó por otros métodos. Así se encuentra el número de gérmenes que hay en una suspensión al 1%, para cada especie bacteriana.

Hans Schmidt 1926 (19) y H. Schmidt 1930 (20) para sus determinaciones centrifugó cantidades dadas de una suspensión en tubos ca-

pilares, midiendo en un aparato especial la columna de bacterias sedimentadas y ésta misma más el líquido sobrenadante. Se relacionan finalmente estas medidas, con un factor constante para cada especie bacteriana.

Otro modo de controlar el número de gérmenes en una vacuna, sería relacionando el porcentaje de proteínas o el Nitrógeno total con el número de gérmenes. Es decir, el resultado obtenido sería constante para cada caso en particular, según la especie y la concentración de la suspensión, esto se determina por el método de Kjehdahal (9). A la Secretaría de Salubridad y Asistencia Pública se reporta este control en las vacunas lisadas total o parcialmente en las cuales no es aplicable ninguno de los métodos antes mencionados.

Otros investigadores aplicaron métodos fotoeléctricos, a la determinación del número de gérmenes en suspensiones bacterianas. El aparato a propósito puede ser un Nefelómetro Fotoeléctrico de Kleimman utilizado ya desde 1926 por W. Liese (15), en 1930 por W. Strauss (21); Pulvertaft y Lemon 1933 (18), aplicaron el método Fotoeléctrico en la determinación de curvas de crecimiento de distintos gérmenes.

Longsworth 1936 (16), hizo determinaciones bacterianas con un densitómetro fotoeléctrico. L. Csizmas y Joó 1957 (1), determinaron curvas comparativas entre los resultados obtenidos entre el método Nefelométrico y fotométrico. Por último el método en el que se emplea el Fotocolorímetro de Lange (4), para determinar la densidad óptica o porcentaje de transmisión de luz que deja pasar una suspensión bacteriana diluida. Se determinan gráficas para cada germen que resultan de relacionar el número de gérmenes calculado por cuenta directa, con la densidad óptica medida en el Fotocolorímetro.

Es importante determinar una gráfica para cada especie bacteriana por lo siguiente:

- 1o.—Porque todos los gérmenes tienen distinta morfología.
- 2o.—Porque son de distinto tamaño.
- 3o.—Porque tienen variable densidad óptica.

Atendiendo a todas estas investigaciones hice este trabajo, en el que estudié comparativamente varios métodos. Busqué también como aplicar los elegidos, a la determinación del número de gérmenes en vacunas mixtas, ya que debido a la composición de éstas, se encuentran en ellas gérmenes de distinto tamaño, forma y cantidad; esta diversidad de factores, complica la determinación porque todos los métodos se refieren a una sola clase de gérmenes.

La presente tesis tiene por objeto encontrar un método que propor-

cione mejores resultados, por sus pocos errores de técnica, menos laboriosidad y rapidez al efectuarse.

En el capítulo que sigue explico con amplitud algunos de los métodos descritos.

II.—MATERIAL

Y

METODOS

1.—METODOS DIRECTOS.

A.—Método de Wright (25). (11).

a).—Sobre una pipeta capilar se hace una señal a la distancia de 2.5 cm. de la punta y al otro extremo se fija una pera de goma.

b).—Se desinfecta un dedo y se pincha.

c).—Aspírese con la pipeta capilar, una solución de citrato sódico hasta la marca señalada. Absórbase una cantidad de aire y luego la sangre que salga del dedo, hasta alcanzar la señal marcada. Introducir nuevamente algo de aire, para separar la solución y recoger de la suspensión bacteriana hasta la señal.

d).—Expúlsese el contenido de la pipeta sobre un vidrio de reloj, mézclase bien expirando y expeliendo el líquido una docena de veces.

e).—Háganse dos o tres extensiones finas, como si se tratara de preparaciones sanguíneas.

f).—Se secan al aire y se fijan con solución saturada de cloruro mercúrico.

g).—Se lavan y se tiñen con fucsina fenicada diluída (1:10), de dos a cinco minutos.

h).—Se lavan con agua y se secan.

i).—Sólo se examinan las preparaciones satisfactorias, que presenten bacterias y glóbulos uniformemente repartidos y no tengan grumos bacterianos.

Con el objetivo de inmersión se cuentan las bacterias y los glóbulos en 500 campos, anótense separadamente las bacterias y los hematíes y al final obténase el total de unos y otros.

Ejemplo:

Se han contado 500 hematíes y 1.000 bacterias.

Un ml. de sangre contiene aproximadamente 5,000 000 de glóbulos rojos. Como se usó el mismo volumen de sangre y suspensión de gérmenes, tenemos que un milímetro cúbico de suspensión tendrá:

$$\frac{5\,000\,000 \times 1\,000}{500} = \frac{5\,000\,000\,000}{500} = 10\,000\,000 \text{ de gérmenes por mm}^3, \text{ o sea } 10\,000\,000\,000 \text{ de gérmenes por cm}^3.$$

B.—Método de la Cámara de Recuento (11), (7).

a).—Mediante pipetas estériles, se colocan en un pequeño tubo de

ensaye estéril, 0.1 ml. de la suspensión y 4.9 de solución salina fisiológica (lo cual dá una dilución al 1:50). Mézclase bien.

b).—Se aspira la suspensión hasta la marca 0.5 de una pipeta de recuento de leucocitos.

c).—Se aspira hasta la señal 11, el colorante siguiente (se consigue así una dilución 1:20):

Cristal violeta (solución alcohólica saturada)	10 ml.
Agua (recientemente destilada)	100 ml

d).—Se pasa una banda elástica por las puntas de la pipeta y se agita durante dos minutos por lo menos. La dilución no debe dejarse en reposo.

e).—Se desprecian algunas gotas sobre un trozo de papel filtro (que se lleva a una solución desinfectante) y se coloca una gota en el centro de la cámara de recuento de Helber o el contador para bacterias de Petroff Hausser (procurando esté bien limpia para evitar partículas de polvo).

f).—Se le adapta con exactitud un cubre objetos de precisión.

g).—Déjese en reposo durante 15 minutos

h).—Con un objetivo del número 6 y un ocular del número 4 se cuentan las bacterias de 20 cuadrados por lo menos, enfocando a diferentes niveles para incluir las que no se hayan sedimentado.

i).—Si el número de gérmenes fuera demasiado grande para un recuento exacto (las diferencias de un cuadrado a otro no deben pasar de 10%), se repite la operación con diluciones al 1:100 y 1:200.

j).—El número total de bacterias en 20 cuadrados se divide por 20 para hallar la media de cada uno.

k).—Para obtener el número de gérmenes por ml. de la dilución se multiplica por 400 000 000. Es decir:

$$1/20 \text{ mm} \times 1/20 \text{ mm} \times 1/50 \text{ mm} = 1/20 \text{ 000 mm}^3 \text{ (contenido en 1 cuadrado)}$$

$$1/20 \text{ 000} \times 1/20 \text{ (dilución de la pipeta)} = 1/400 \text{ 000 m}^3 \text{ o sea } 1/400 \text{ 000 000 ml}$$

l).—Si se usó una dilución original de 1:50, se multiplica además por 50 para hallar el número de gérmenes de la suspensión sin diluir.

m).—Si se utiliza la pipeta de hematíes se prepara suspensión sin diluir hasta la señal 0.5 y colorante hasta la señal 10 (para el) obten-

niéndose así una dilución 1:200. Se agita cuidadosamente, se desechan las primeras gotas y se pone una en la cámara cuenta glóbulos. Se ajusta el cubre objeto y se deja reposar por 15 minutos para que sedimenten las bacterias. Se cuentan los gérmenes contenidos en 10 a 20 cuadrados y se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de bacterias contadas} \times 20 \times 20\ 000\ 000}{\text{Número de cuadros pequeños contados}} =$$

bacterias por ml.

n).—Tanto la cámara de recuento como los cubre objetos se sumergen en una solución de cresol al 2% cuando menos 5 minutos antes de secarse, haciendo lo mismo con las pipetas.

2.—METODO DE CULTIVO EN PLACAS PARA CUENTA BACTERIANA (14).

a).—Se prepara una suspensión de gérmenes.

b).—En matraces estériles se colocan 99 ml. de solución salina fisiológica en cada uno de ellos.

c).—Agitar vigorosamente la suspensión y transferir un ml. al matraz de dilución No. 1 (dilución 1:100).

d).—Agitar y pasar un ml. al matraz de dilución No. 2 (dilución 1:10 000).

e).—Del primer matraz tomar un ml. y 0.1 ml. Llevarlos a dos tubos con medio de cultivo sin solidificar (a una temperatura de 40° a 45° C.). Agitar fuertemente para revolver los gérmenes con el medio y pasar rápido a dos cajas de petri estériles, las que se rotulan con 1:100 y 1:1 000 respectivamente. Después de agitar la dilución No. 2, se pasa también un ml. y 0.1 ml. a dos cajas (siguiendo los mismos pasos) y se rotulan con 1:10 000 y 1:100 000.

f).—Seguir haciendo diluciones tomando en cuenta la concentración de la suspensión de modo que las colonias que van a crecer sean en número tal, que se puedan contar fácilmente.

g).—Incubar las cajas en posición invertida durante 48 horas o el tiempo que sea necesario para su desarrollo.

h).—En un aparato cuenta-colonias se observa el crecimiento de los gérmenes tanto en la superficie como en el interior del medio cultivo.

i).—El número de colonias contadas, por la dilución marcada en la

caja nos dá la cantidad de bacterias por ml. de la suspensión, partiendo de que cada bacteria forma una colonia.

También se pueden contar los gérmenes que haya en un centímetro cuadrado en varios campos, sacando después un promedio y multiplicando por la superficie de la caja.

Hay una modificación a este método, efectuada por Miles y Misra 1938 (17), preparando primero el medio de cultivo colocándolo en las cajas de petri en forma estéril, una vez solidificado, añadir 0.5 ml. de cada dilución extendiéndolo uniformemente por toda la superficie del medio. Seguir después la misma técnica.

3).—METODO NEFELOMETRICO DE MC FARLAND (13).

Preparación del Standard McFarland para nefelómetro.

a).—Se toman 10 tubos de ensaye o ampolletas de la misma medida. Marcarlos del 1 al 10.

b).—Hacer una solución acuosa de 1% de cloruro de Bario Q. P. y poner en el tubo No. 1, 0.1 ml.; en el No. 2, 0.2 ml.; etc. Aumentando en cada tubo 0.1 ml.

c).—Añadir suficiente solución de ácido sulfúrico Q. P. al 1% hasta que el volumen total de cada tubo sea de 10 ml.

d).—Cerrar los tubos con flama.

e).—Cuando se agita fuertemente el precipitado de sulfato de Bario, que se formó en los tubos (blanco y fino), cada tubo tendrá una densidad diferente, aumentando de 1 hasta 10. La densidad de cada tubo corresponde **aproximadamente** a las suspensiones de bacterias como sigue:

No. I.—	300 000 000	No. VI.—	1 800 000 000
No. II.—	600 000 000	No. VII.—	2 100 000 000
No. III.—	900 000 000	No. VIII.—	2 400 000 000
No. IV.—	1 200 000 000	No. IX.—	2 700 000 000
No. V.—	1 500 000 000	No. X.—	3 000 000 000

Cuando las vacunas son preparadas en cultivos a base de caldo, según el método del Kolmer, el nefelómetro tendrá que ser preparado con ácido sulfúrico de 1% en caldo para comparar mejor el color del último.

METODO.

a).—Se coloca un ml. de la suspensión bacteriana en un tubo de ensaye del tamaño de los del nefelómetro.

b).—Dilúyase con 4 ml. de solución salina fisiológica.

c).—Agítese bien y hágase la comparación con los tubos del nefelómetro.

d).—Cálculo. El número de bacterias representado por el tubo del nefelómetro a que corresponda la densidad de la suspensión bacteriana, se multiplica por el valor de la dilución de ésta.

4.—METODO DE HANS SCHMIDT. 1926 (19).

a).—Preparar la suspensión de gérmenes.

b).—Aspirar 1 ml. de Mercurio en un tubo capilar adaptándole una perita de goma.

c).—Agitar bien la suspensión y aspirarla después del mercurio.

d).—Tapar con lacre el lado del mercurio.

e).—Después de tarar los tubos, centrifugar una hora de 6 000 a 8 000 revoluciones por minuto.

f).—Colocar el tubo en el aparato de Schmidt (quedando el lacre a la izquierda).

g).—Poner el aparato en cero.

h).—Con el tornillo izquierdo, poner la raya negra entre el mercurio y los gérmenes.

i).—Dar la vuelta al tornillo derecho, hasta donde termine la columna de gérmenes (1g), tomar la lectura y regresar con el tornillo a cero.

j).—Poner la raya negra entre el mercurio y la columna de gérmenes.

k).—La tuerca negra se lleva hacia la derecha, hasta donde termine la columna de la suspensión (1s).

l).—Tomar la lectura, haciendo lo mismo con los cuatro tubos para sacar un promedio.

m).—La determinación de la cantidad de gérmenes por ml. se hace empleando la siguiente fórmula:

$$F_1 = \frac{\lg \times Fk}{ls}$$

F_1 = Concentración de la suspensión.

\lg = Lectura de la columna de gérmenes.

ls = Lectura de la columna de suero.

Fk = Factor específico para cada germen.

Esta fórmula se deduce sabiendo que, a una concentración determinada, la relación de la columna de gérmenes y la columna total del líquido después de la centrifugación, es constante; ya que si varía la concentración de gérmenes variará también la relación entre las dos columnas.

Se hicieron muchas determinaciones a suspensiones de gérmenes cuya concentración ya se conocía por otros métodos.

Ejemplo 1.

a).—Estreptococos.

Concentración de la suspensión 26.6381×10^9

Lectura A = \lg 0.70 y ls 80

Lectura B = \lg 0.72 y ls 73

$$A = \frac{\lg}{ls} = \frac{0.70}{80} = 0.00875$$

$$B = \frac{\lg}{ls} = \frac{0.72}{73} = 0.0093$$

Sacando promedio de A y B tenemos: 0.009025.

Ejemplo 2

b).—Estreptococos.

Concentración de la suspensión 5.015×10^9 .

Lectura A = \lg 0.115 y ls 68

$$A = \frac{\lg}{ls} = \frac{0.115}{68} = 0.00169$$

En el ejemplo 1 a la concentración de 26.6380×10^9 , la relación

entre las dos columnas será 0.009025. Buscando la relación que hay entre la concentración de la suspensión de gérmenes y el resultado de relacionar las dos columnas tenemos:

$$\frac{26.6380}{0.00902} = \frac{2950}{1}$$

En el ejemplo 2 a la concentración de 5.015×10^9 la relación relación resultante entre las dos columnas será:

$$\frac{5.015}{0.00169} = \frac{2950}{1}$$

Este número 2950 es igual al del ejemplo 1 y es igual al Factor para los Estreptococos según la tabla de Schmidt.

Ejemplo 3.

a).--H. Pertussis.

Concentración de la suspensión 44.5771×10^9 .

Lectura A = lg 5.4 y ls 77

Lectura B = lg 5.3 y ls 74

$$A = \frac{\text{lg}}{\text{ls}} = 0.070$$

$$B = \frac{\text{lg}}{\text{ls}} = 0.071$$

Promedio: = 0.0705.

Relación de la concentración de la suspensión de gérmenes y el resultado de relacionar las dos columnas tenemos:

$$\frac{44.5771}{0.0705} = \frac{6323}{1}$$

Ejemplo 4

b).--H. Pertussis.

Concentración de la suspensión 51.21×10^9

Lectura A = lg 0.59 y ls 73

$$A = \frac{lg}{ls} = \frac{0.59}{73} = 0.00808$$

Relación de la concentración de la suspensión de gérmenes, a la relación entre las dos columnas:

$$\frac{51.21}{0.00808} = \dots\dots\dots 6323$$

El número 6323 es igual en los dos ejemplos y es el Factor para *Hemóphilus pertussis* según la tabla de factores de Schmidt.

Así vemos que la relación que hay entre la concentración de la suspensión de gérmenes y la relación que resulta de relacionar las dos columnas a distintas concentraciones, es **la misma y constante** y equivale al Factor específico de cada germen.

Así es como se pueden determinar los factores de la tabla de Schmidt. Todo esto puede expresarse en la siguiente fórmula:

$$F_k = \frac{F_1}{\frac{lg}{ls}} = F_k = \frac{F_1 \times ls}{lg}$$

- F_k = Factor específico para cada germen.
- F₁ = Concentración de la suspensión de gérmenes.
- lg = Lectura de la columna de gérmenes.
- ls = Lectura de la columna de suero fisiológico.

Como lo que se desea conocer es la concentración de la suspensión, centrifugamos la suspensión problema para conocer la longitud de las columnas. Despejamos F₁ que es la concentración:

$$F_1 = \frac{lg \times F_k}{ls}$$

Aplicación del Método de Hans Schmidt para determinación de cuenta bacteriana en Vacunas Mixtas.

a). Se determina el porcentaje de sedimentación, centrifugando la vacuna mixta y relacionando el sedimento con el líquido total.

b).—Teóricamente se puede determinar el porcentaje de sedimentación y después se compara con el porcentaje encontrado prácticamente

para saber si la vacuna mixta preparada está correcta.

Ejemplo.

Determinación del porcentaje de sedimentación teórico tomando en cuenta el número de bacterias por ml de una vacuna mixta.

Vacuna Gonocócica Mixta

Fórmula	Concentración
Neisseria gonorrhoeae	0.4×10^9
Escherichia coli	0.4×10^9
Streptococcus hemoliticus	0.1×10^9
Staphylococcus aureus	0.1×10^9

Neisseria gonorrhoeae.

Factor = 1662

$F_1 = 0.4 \times 10^9$

$ls = 80$

$lg = ?$

Fórmula:

$$F_1 = \frac{lg \times Fk}{ls}$$

$$\text{Despejando } lg = \frac{F_1 \times ls}{Fk}$$

$$\text{o sea } lg = \frac{0.4 \times 80}{1662} = 0.0192$$

Escherichia coli

$Fk = 1380$

$F_1 = 0.4 \times 10^9$

$ls = 80$

$lg = ?$

Fórmula:

$$lg = \frac{F_i \times l_s}{F_k}$$

o sea $\frac{0.4 \times 80}{1380} = \frac{0.231}{1380}$

Streptococcus hemolíticus.

$$F_i = 0.1 \times 10^9$$

$$F_k = 2950$$

$$l_s = 80$$

$$lg = ?$$

Fórmula:

$$lg = \frac{F_i \times l_s}{F_k} = \frac{0.1 \times 80}{2950} = 0.0027$$

Staphylococcus aureus.

$$F_k = 3500$$

$$F_i = 0.1 \times 10^9$$

$$l_s = 80$$

$$lg = ?$$

Fórmula:

$$lg = \frac{F_i \times l_s}{F_k} = \frac{0.1 \times 80}{3500} = 0.00228$$

Como ya se vió anteriormente lg es el sedimento; ya mezclada la vacuna y centrifugada, su sedimento sería la suma de todas las lg , así tenemos:

$$N. gonorrhoeae \quad 0.0192$$

$$E. coli \quad 0.0231$$

$$Streptococcus \quad 0.0027$$

$$S. aureus \quad 0.0028$$

$$0.04781$$

Sacando el porcentaje de sedimentación:

$$\begin{array}{r} 80 \\ 100 \end{array} \quad \begin{array}{r} 0.04781 \\ x \end{array}$$

$x = 0.0597\%$ de sedimentación para la vacuna gonocócica Mixta.

Determinación de Factores especiales para cada Vacuna Mixta.

Puede determinarse un Factor constante especial para cada vacuna mixta aplicando la siguiente fórmula:

$$F_k = \frac{F_i \times l_s}{l_g} = \frac{1.0 \times 80}{0.047} = 1702.12$$

F_i = Concentración total de todos los gérmenes en la vacuna mixta.

l_s = Líquido total de la columna de suero en la vacuna mixta.

l_g = Total de la columna de todos los gérmenes en la vacuna mixta.

El Factor para la vacuna Gonocócica Mixta es $\frac{1702.12}{\text{-----}}$

Para sacar la concentración usamos la fórmula:

$$F_i = \frac{l_g \times F_k}{l_s}$$

Datos obtenidos de la centrifugación:

$$l_g = 0.050$$

$$l_s = 80$$

$$F_k = 1702.12$$

Substituyendo

$$F_i = \frac{0.050 \times 1702.12}{80} = 1.063$$

Esta vacuna tendrá una concentración de 1.063×10^8 de gérmenes por ml

Cuando las vacunas están muy diluidas se necesita centrifugar, porque la columna de gérmenes sería demasiado pequeña y dificultaría la lectura, conduciendo a un error mayor.

Así se determinaron para cada vacuna mixta sus porcentajes de sedimentación y un factor específico para cada una en particular, según su fórmula y concentración. Se puede determinar la concentración de cada una de las vacunas mixtas ya envasadas y controlar el número de gérmenes que llevan las ampollitas antes de salir a la venta.

5. DETERMINACION DE NITROGENO PROTEICO Y TOTAL POR METODO DE KJELDAHL COMO CONTROL EN CUENTA BACTERIANA (9)

Por Kjeldahl se puede determinar el nitrógeno total, protéico y no protéico. Precipitando la proteína mediante una solución de ácido tricloro acético al 2.5%, determinamos el nitrógeno protéico, el método es el siguiente:

a).— Tomar un ml. de la muestra y colocarlo en un matraz Earlenmayer de 300 ml. agregar 20 ml. de la solución de ácido tricloro acético, para prevenir la evaporación excesiva durante el calentamiento, colocarle al matraz un tapón horadado provisto de un tubo de vidrio de 60 cm. de largo (refrigerante de aire).

b).— Calentar a baño maria a 100° C durante 5 minutos, enfriarlo rápidamente.

c).— Filtrar y lavar el precipitado con agua libre de amoníaco. Recojer las aguas del filtrado y el filtrado y llevarlas a un volumen conocido (100 ml.). Mezclar bien y tomar de aquí una cantidad alícuota a la cual se le determina el nitrógeno por el método de Kjeldahl.

METODO

En un balón para Kjeldahl, se coloca la muestra exactamente medida, agregar sulfato de Sodio (anhidro Q. P.), sulfato de Cobre Q. P. y 10 ml. de ácido sulfúrico concentrado, unas perlas de vidrio para regular la ebullición. Este matraz se calienta directamente, colocándolo inclinado y con un embudo pequeño en la boca el calentamiento debe durar más o menos una hora con ebullición lenta que termina cuando la solución del matraz se aclara y toma un color azul pálido, se deja enfriar y se le agregan 200 ml. de agua destilada. Se añaden 30 ml. de hidróxido de Sodio concentrado y se destila, recogiendo el destilado en un matrazito, que contenga 10 ml. de ácido bórico al 4% con dos gotas de indicador.

Cuando termina la destilación, del agua se titula con ácido Clorhídrico de normalidad conocida.

Ejemplo:

Cantidad de la muestra 0.5 ml

Normalidad del HCl 0.11.

$$cc \times N \times Me \times 100$$

M

$$= \text{gr}/100 \text{ ml.}$$

cc = Cantidad de HCl que se usó en titular el destilado

N = Normalidad del HCl.

M = Cantidad de muestra.

Me = Miliequivalente del Nitrógeno.

Substituyendo:

Si usamos 5 ml. de HCl tendremos que:

$$5 \text{ ml.} \times 0.11 \times 0.014 \times 100$$

0.5

$$= \text{Nitrógeno no protéico}$$

Restando el Nitrógeno no protéico del Nitrógeno total, obtendremos el Nitrógeno protéico.

Este método se puede aplicar en vacunas lisadas parcial o totalmente ya que debe darnos para esa vacuna a esa concentración, un valor constante y si no lo dá, es índice de que hay más o menos gérmenes.

6.- METODO FOTOCOLORIMETRICO PARA CUANTEO BACTERIANO POR MEDIO DE GRAFICAS (4).

Este método es mixto ya que se necesita que intervengan en él dos métodos:

a).--Después de preparar la suspensión hacemos las diluciones siguientes: 1:200, 1:250, 1:300 (con solución salina fisiológica).

b).--Procedemos a contar al microscopio por método directo, 32 cuadros pequeños en distintos campos, usando la cámara de Helber, repitiendo el conteo cuatro veces en cada dilución, con objeto de sacar una media aritmética.

c).--El número de gérmenes que se encuentran en la suspensión lo sabemos usando la siguiente fórmula:

$$\text{No. de gérmenes} \times \text{dilución} \times 20 \ 000 \ 000$$

No. de cuadros contados

$$= \text{No. de gémenes/ml}$$

Normalidad del HCl 0.11.

$$\frac{cc \times N \times Me \times 100}{M} = \text{gr}/100 \text{ ml.}$$

cc = Cantidad de HCl que se gastó en titular el destilado

N = Normalidad del HCl.

M = Cantidad de muestra

Me = Miliequivalente del Nitrógeno.

Substituyendo:

Si usamos 5 ml. de HCl tendremos que:

$$\frac{5 \text{ ml.} \times 0.11 \times 0.014 \times 100}{0.5} = \text{Nitrógeno no protéico}$$

Restando el Nitrógeno no protéico del Nitrógeno total, obtendremos el Nitrógeno protéico.

Este método se puede aplicar en vacunas lisadas parcial o totalmente ya que debe darnos para esa vacuna a esa concentración, un valor constante y si no lo dá, es índice de que hay más o menos gérmenes.

6.- METODO FOTOCOLORIMETRICO PARA CUANTEO BACTERIANO POR MEDIO DE GRAFICAS (4).

Este método es mixto ya que se necesita que intervengan en él dos métodos:

a).—Después de preparar la suspensión hacemos las diluciones siguientes: 1:200, 1:250, 1:300 (con solución salina fisiológica).

b).—Procedemos a contar al microscopio por método directo, 32 cuadros pequeños en distintos campos, usando la cámara de Helber, repitiendo el contar cuatro veces en cada dilución, con objeto de sacar una media aritmética.

c).—El número de gérmenes que se encuentran en la suspensión lo sabremos usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No. de gérmenes} \times \text{dilución} \times 20\,000\,000}{\text{No. de cuadros contados}} = \text{No. de gérmenes/ml}$$

Deducción de la fórmula.

El volumen de la cámara de Helber es de 0.02 mm³ o sea cada cuadrado pequeño tiene un mm² de superficie por 0.02 de profundidad, dá por resultado 0.02 mm³ y éste equivale a 1/50 de mm³.

Cuéntese el número de gérmenes en 32 cuadros, y calcúlese cuantos hay en cada uno de ellos. Multiplíquese por 400, que es el número de cuadros que hay en toda la cuadrícula y como ésta mide 1/50 de mm³, se multiplica por 50, para dar el número de gérmenes por mm³ así tenemos:

$$\frac{\text{No. de gérmenes} \times 50 \times 400}{32}$$

Como se usó una dilución, se multiplica además por ese número, para saber el número de gérmenes por mm³ de la suspensión sin diluir:

$$\frac{\text{No. de gérm.} \times 50 \times 400 \times \text{dilución}}{32} = \text{No. de gérm./mm}^3$$

Simplificando y transformando a cm³:

$$\frac{\text{No. de gérm.} \times 20\,000\,000 \times \text{dilución}}{32} = \text{No. de gérm./cm}^3$$

Ejemplo:

Cuenta bacteriana de una suspensión de Brucella:

Dilución	No. de Gérms. en 32 cuadros.				Promedio	Germ./10 ⁹	Promedio Final
	I	II	III	IV			
1.--1:200	156	168	199	149	168	21.0	
2.--1:200	165	144	123	170	151	18.8	
3.- 1:250	115	148	132	120	129	20.0	19.8
4.--1:250	127	122	129	114	123	19.2	
5.--1:300	98	94	106	130	107	20.0	
6.- 1:300	113	121	87	106	107	20.0	

Ahora sabiendo que la suspensión base tiene 19.8 por 10^9 o sea 19 800 000 000 de gérmenes por ml., hacemos diluciones desde 1:5.5, 1:6 etc. aumentando 0.5 hasta llegar a 1:15.0; de este número aumentamos 2.5, cuando tenemos ya una dilución 1:20, aumentamos 5.0, y terminamos en 1:80.

Calculamos teóricamente la cantidad de gérmenes que hay en cada una de las diluciones, es decir en un 1 ml. hay 19.8 por 10^9 gérmenes, hacer una dilución 1:5.5 equivale a colocar 1 ml. de suspensión en un volumen de 5.5 ml o sea que el mismo número de gérmenes se encontrará. Calcular cuantos gérmenes habrá por ml. dividiendo:

$$\frac{19.8}{5.5} = 3.6$$

Lo que quiere decir que en una dilución 1:5.5 habrá 3.6 por 10^9 gérmenes.

Así se hace con todas las diluciones. En el Fotocolorímetro, determinamos el porcentaje de transmisión de luz que dejan pasar cada una de estas diluciones, repitiendo la operación cuatro veces y sacando promedio para obtener un resultado más exacto.

Calibración del Fotocolorímetro.

Antes de usar el Fotocolorímetro para cualquier determinación es necesario calibrarlo del modo siguiente:

a) —Introducir un vaso con solución salina fisiológica, ajustar los tornillos a 100, al sacar el vaso la aguja bajará, anotar el número que marque, repitiendo la operación 4 veces por lo menos para obtener un promedio.

b) —Ajustar los tornillos al número del promedio.

c) —Colocar la suspensión problema en el Fotocolorímetro después de diluirla más o menos 1:100 (según concentración). Anotar el número que marca la aguja.

Las gráficas que se dan a continuación fueron determinadas por medio de un sistema de coordenadas en el que las abscisas son el número de gérmenes por ml. de cada dilución y las ordenadas el resultado que nos da el Fotocolorímetro al medir estas diluciones.

Así pues, con una gráfica para cada especie bacteriana, sólo se necesita colocar la suspensión problema en el Fotocolorímetro, observar cuantos gérmenes le corresponden en la gráfica al número que marcó

y ésta será la cantidad de bacterias por ml. que contiene esa suspensión.

Determinación de cuenta Bacteriana en Vacunas Mixtas por el Método Fotocolorimétrico.

Después de usar el método de Hans Schmidt para cuenta de gérmenes en Vacunas Mixtas, se estudió como aplicar el método Fotocolorimétrico en las mismas.

Sabiendo la concentración de la vacuna por el método de H. Schmidt se hacen varias diluciones teóricamente se calcula el número de gérmenes que habrá en cada dilución. Medimos en el Fotocolorímetro el porcentaje de transmisión de luz que dejan pasar cada una de éstas diluciones y anotamos. Por un sistema de coordenadas, en el que las abscisas serán el número de gérmenes por 10^8 (calculado por el método de Schmidt), y las ordenadas el resultado obtenido en el Fotocolorímetro, hacemos una gráfica especial para cada Vacuna Mixta. Midiendo los valores que da una ampollita de la vacuna y haciendo diluciones de ésta para ver los valores que da en el Fotocolorímetro una suspensión con 10%, 20%, 30%, 40%, y 50% menos del porcentaje normal de cada una, prolongando la curva aumentando estos porcentajes al número normal. Con el objeto de saber cuando una vacuna tiene más o menos gérmenes de los que deba llevar.

PREPARACION DE UNA SUSPENSION BACTERIANA (10).

Para llevar a cabo todos los métodos antes mencionados se prepararon las suspensiones por el siguiente método:

Se toman cepas recién aisladas que pertenezcan a la fase "S", es decir que estén en las mejores condiciones de patogenicidad, toxicidad y que sean capaces de producir una óptima respuesta inmunológica, así como que su forma y tamaño sean normales.

a).--Sembrar en botellas especiales con medio de cultivo (colocando las botellas si el medio es sólido en posición horizontal).

b).- Si el medio es sólido, al desarrollo de gérmenes se le agrega suficiente solución salina fisiológica. Agitando para desprender el cultivo.

c). Si se emplea caldo éste se centrifuga a 3000 revoluciones por minuto, durante una hora decantando el líquido que sobrenada y aprovechando el sedimento que contienen las bacterias para hacer una nueva suspensión en solución salina fisiológica.

d).—La suspensión se pasa a un matraz que contenga perlas de cristal para deshacer los acúmulos bacterianos.

e).—Se filtra a través de una gasa estéril.

f).—Para lavar los gérmenes se centrifugan a 3 000 revoluciones por minuto durante una hora y tirando el sobrenadante se resuspenden en solución salina fisiológica.

g).—Se lleva la suspensión a baño maría para evitar la autólisis, que en algunos gérmenes comienza rápidamente (19), es además como precaución porque a una temperatura de 65° a 68°C se mueren los gérmenes y no hay peligro de contaminarse al hacer la cuenta (aunque hay algunos como los esporulados que necesitan tres calentamientos), por lo tanto en el método de cultivo en placas no se hace este último paso.

III.—RESULTADOS

1.—Resultados del estudio comparativo con una suspensión de *Staphylococcus aureus* por los siguientes métodos:

a).—Método de Wright

Se contaron: 500 hematíes y 1 496 bacterias, usando la fórmula tenemos:

$$\frac{5\ 000\ 000 \times 1\ 496}{500} = 14\ 960\ 000\ \text{gérms./mm}^3$$

$$\text{Resultado} = \frac{14\ 960\ 000\ 000\ \text{gérms./ml.}}{}$$

b).—Método de la Cámara de Recuento

Usando la cámara de Helber:

Número de bacterias contadas 43

Multiplicando por 400 000 000 según la técnica del Kolmer tenemos que:

$$\text{Concentración de la suspensión:} = \frac{17\ 200\ 000\ 000\ \text{gérms./ml.}}{}$$

c).—Método de Cultivo en Placas

Colonias contadas 101

Dilución marcada en la caja 1:10 000 000

$$\text{Concentración de la suspensión:} = \frac{10\ 100\ 000\ 000\ \text{gérms./ml.}}{}$$

d).—Método Nefelométrico de Mc Farland

Número de bacterias representadas por el Nefelómetro =
3 000 000 000

Valor de la dilución 1:5

$$\text{Concentración de la suspensión:} = \frac{15\ 000\ 000\ 000\ \text{gérms./ml.}}{}$$

e).—Método de Hans Schmidt

Lectura de la columna de gérmenes	(lg)	0.381
Lectura de la columna de suero	(ls)	76
Factor constante para <i>Staphylococcus</i>	(Fk)	3 500
Concentración de la suspensión	(F ₁)	?

$$\text{Fórmula: } F_1 = \frac{\lg \times Fk}{ls}$$

$$\text{Substituyendo } F_1 = \frac{0.381 \times 3\,500}{76}$$

$$\text{Resultado} = \frac{17.54 \times 10^9}{}$$

f).—Método Fotocolorimétrico para cuenteo bacteriano por medio de gráficas (esta suspensión se usó como base para la formación de la gráfica de *Staphylococcus albus* y *aureus*).

Resultado de la observación directa al microscopio:

Dilución	No. de gérms. en 32 cuadros				Promedio
	I	II	III	IV	
1:200	140	159	130	122	137.7
1:200	118	116	143	123	125.5
1:250	97	111	111	98	104.2
1:250	96	115	105	96	103.0
1:300	101	99	108	97	101.0
1:300	100	97	107	83	97.0

Usando la fórmula:

$$\frac{\text{No. de gérm.} \times 20\,000\,000 \times \text{dilución}}{32} = \text{Gérms./ml.}$$

Substituyendo con 137.7:

$$\frac{137.7 \times 20\,000\,000 \times 200}{32} = 17\,200\,000\,000 \text{ o sea } 17.2 \times 10^9$$

$$\text{Substituyendo con } 125.5 = 15.6 \times 10^9$$

$$\text{Substituyendo con } 104.2 = 16.2 \times 10^9$$

$$\text{Substituyendo con } 103.0 = 16.0 \times 10^9$$

Substituyendo con 101.1 = 18.6×10^9

Substituyendo con 97.0 = 18.1×10^9

Promedio = 17.1×10^9 Gérms./ml.

2.—Resultados del estudio comparativo de una suspensión de *Brucella abortus* por los siguientes métodos:

a).—Resultado de una cuenta Nefelométrica (Nefelómetro especial para *Brucellas*).

20 000 000 000 de Gérms./ml.

b).—Método de la Cámara de Recuento. Resultado:
Número de bacterias contadas 62 (técnica del Kolmer).

$62 \times 400\,000\,000 = 24\,800,000,000$ de Gérms./ml.

c).—Método de Cultivo en Placas

Resultado = $\frac{12\,000\,000\,000 \text{ de Gérms./ml.}}{\quad}$

d).—Método Fotocolorimétrico

Resultado = $\frac{24\,000\,000\,000 \text{ de Gérms./ml.}}{\quad}$

3.—Resultados del estudio comparativo en una suspensión de *Hemophylus pertussis*:

a).—Método de la Cámara de Recuento

Resultado: = $\frac{123\,000\,000\,000 \text{ de Gérms./ml.}}{\quad}$

b).—Método de Hens Schmidt

$F_s = \frac{1.6 \times 6323}{77} = \frac{131\,000\,000\,000 \text{ de Gérms./ml.}}{\quad}$

c).—Método Fotocolorimétrico

Resultado = $\frac{126\,000\,000\,000 \text{ de Gérms./ml.}}{\quad}$

4.—Se determinaron arábricas para cuanteo bacteriano de las siguientes especies de gérmenes:

Shigella gollinarum

Salmonella

Hemophilus pertussis
Staphylococcus aureus
Brucella abortus

5.—Resultados obtenidos de la cuenta de gérmenes en una Vacuna Mixta comparada por los siguientes métodos:

a).—Método de Hans Schmidt

$$\text{Resultado} = \frac{1.172 \times 10^9}{\text{-----}}$$

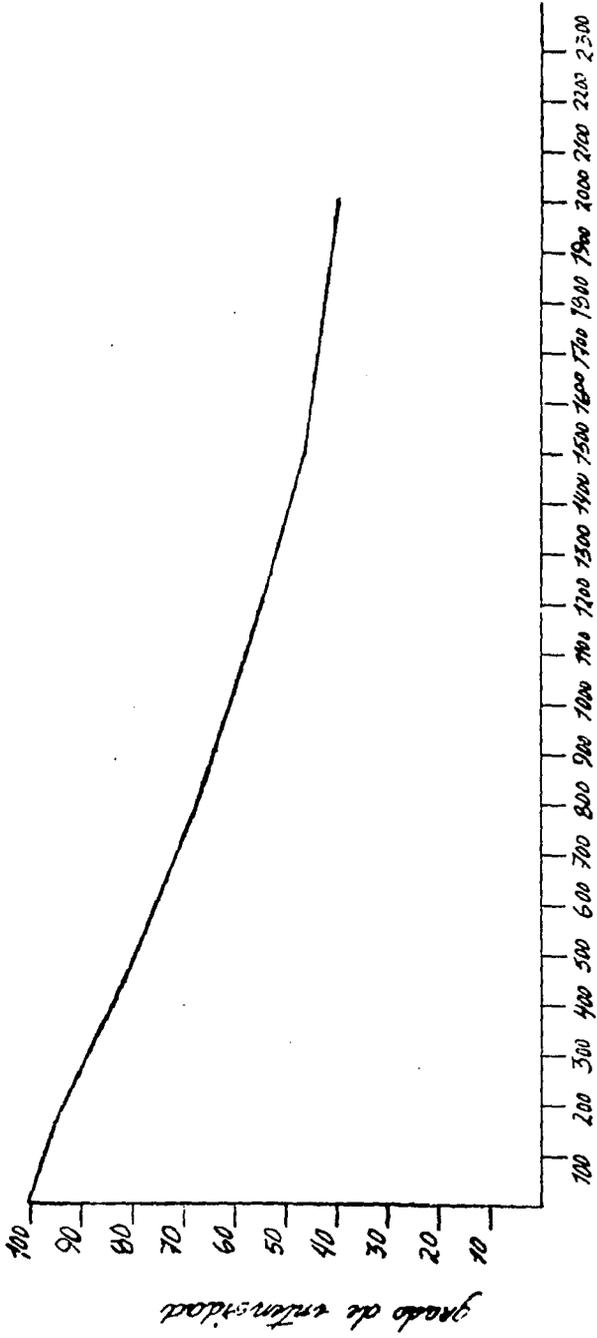
b).—Método Fotocolorimétrico

$$\text{Resultado} = \frac{1.00 \times 10^9}{\text{-----}}$$

c).—Nitrógeno total por Kjeldahl

$$\text{Resultado} = 0.11 \text{ gr.}\%$$

Shigetta B-21



germenes por 10⁶

Cuenta de gérmenes de una
suspensión de

Shigella

(Cámara de Helber)

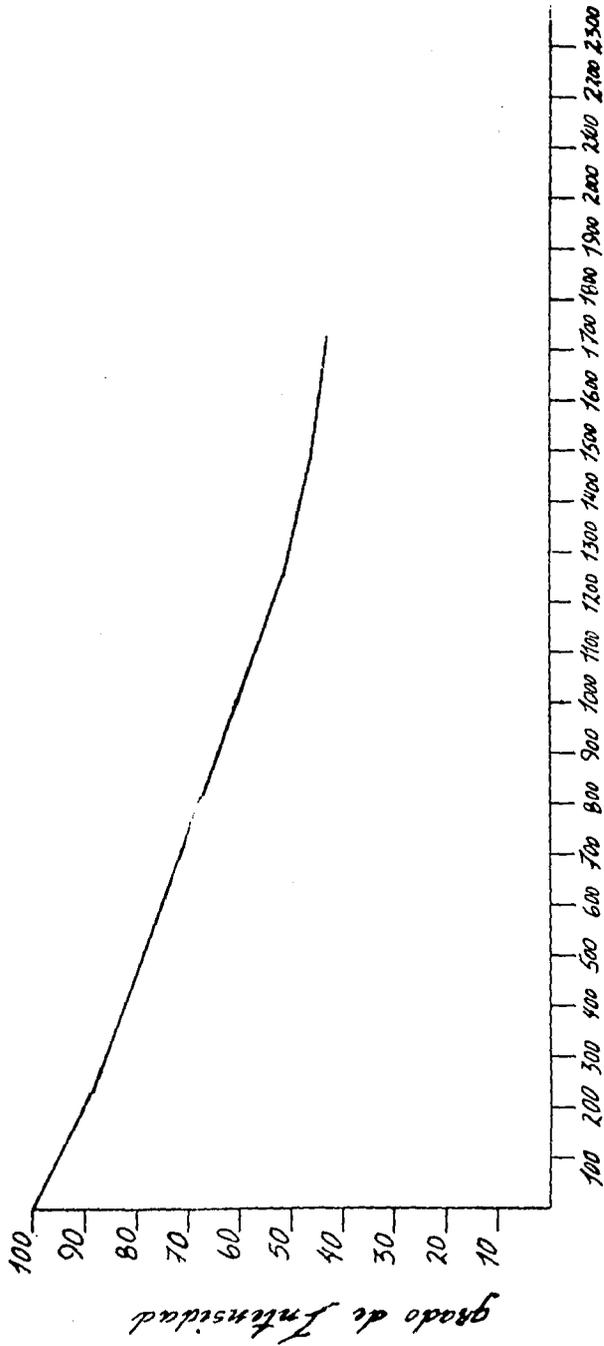
No.	Grado de Dilución	CANTIDAD DE GÉRMESES (CONTADOS EN 32 CUADRITOS)				Media Aritmética	Gérmenes en 1000 millones (10 ⁹)	Media Aritmética	Gérmenes/cc.
		1	2	3	4				
1	1:200	104	101	99	106	102.5	12.8	11.3	11,300,000,000
2	1:200	89	86	106	89	92.5	11.5		
3	1:250	79	74	76	69	74.5	11.6		
4	1:250	68	68	65	69	67.5	10.5		
5	1:300	65	65	63	61	63	11.8		
6	1:300	50	49	59	59	54.3	10.1		

(Microscopio de Fases de contraste.)

Grado de Dilución	Cant. de Grams de 100	TRANSMISIÓN DE LUZ EN EL FOTO COLORÍMETRO					Media Aritmética
1.55	2.05	39	40	39	39	38	39
1.60	1.88	42	44	43	44	44	43.5
1.65	1.72	43.5	43.5	43.5	43.5	43.5	43.5
1.70	1.61	44	44	44	44	44	44
1.75	1.50	46	46	46	46	46	46
1.80	1.41	48	47	48	48	49	48
1.85	1.32	51	52	50	51	51	51
1.90	1.25	54	54	54	54	54	54
1.95	1.18	54	55	54	55	57	55.5
1.100	1.13	56	57	56	55	55	56
1.105	1.07	57	58	59	58	58	58
1.110	1.02	59	60	60	61	59	60
1.115	.98	60	62	60	61	62	61
1.120	.94	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
1.125	.90	63	64	65	64	64	64
1.15	.75	65	65	65	65	65	65
1.175	.64	73	73	73	73	73	73
1.20	.56	76	76	76	76	76	76
1.25	.45	81	81	81	81	81	81
1.30	.37	85	85	85	85	85	85
1.40	.28	89	89	89	89	89	89
1.50	.22	92	92	92	92	92	92
1.60	.18	94	94	94	94	94	94
1.70	.16	95	95	95	95	95	95
1.80	.12	95	96	96	96	96	96

Shigella

Salmonella Gallinarum



germenes por 10⁶

Cuenta de gérmenes
de una suspensión de

(Cámara de Helber) Salmonella

No.	grado de Dilución	Cantidad de gérmenes (contados en 32 cuadratos)				Media aritmética (en números de vias (100))	Gérmenes en 1000 milis. (10%)	Media aritmética $\times 10^8$	gérmenes/c.c
		1	2	3	4				
1	1:200	79	80	81	80	80.0	10.0	9.51	9,510,000,000
2	1:200	79	86	85	86	81.5	10.0		
3	1:250	68	60	65	69	67.5	10.5		
4	1:250	65	65	59	69	64.5	10.0		
5	1:300	48	45	59	49	49.7	9.3		
6	1:300	36	49	33	42	40.0	7.2		

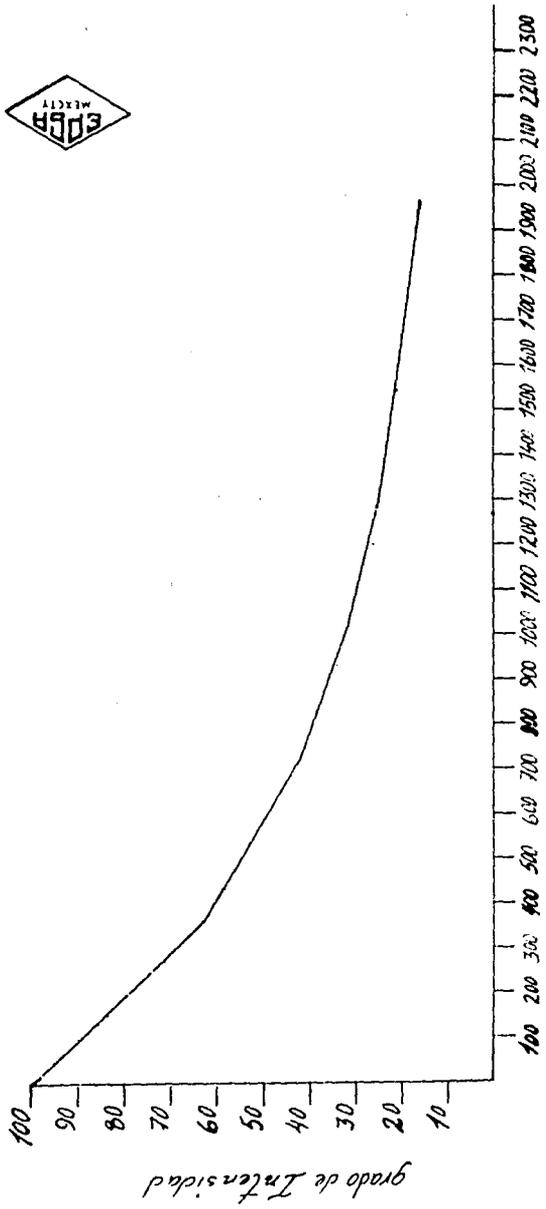
(Microscopio de fases de contraste)

GRADO DE DILUCION	Grms. 100	Temperatura de Luz en el Laboratorio					Media de 10
1.55	1.72	43.5	43.5	43.5	43.5	43.5	43.5
1.60	1.58	46	46	46	46	46	46
1.65	1.46	49	49	49	49	49	49
1.70	1.35	51	51	51	51	51	51
1.75	1.26	54	56	55	50	52	53
1.80	1.18	56	56	56	56	56	56
1.85	1.11	58	58	58	58	58	58
1.90	1.05	59	59	59	59	59	59
1.95	1.00	61	61	61	61	61	61
1.100	0.98	63	65	61	63	63	63
1.105	0.90	65	65	65	65	65	65
1.110	0.86	66	66	66	66	66	66
1.4.5	0.82	67.5	67.5	67.5	67.5	67.5	67.5
1.120	0.79	68	68	68	68	68	68
1.125	0.76	69	69	69	69	69	69
1.150	0.63	72	72	72	72	72	72
1.175	0.54	75	75	75	75	75	75
1.20	0.47	77	77	77	77	77	77
1.25	0.38	81	81	81	81	81	81
1.30	0.31	80	80	80	80	80	80
1.40	0.25	80	80	80	80	80	80
1.5	0.20	85	85	85	85	85	85
1.60	0.15	84	84	84	84	84	84
1.70	0.10	85	85	85	85	85	85
1.80	0.05	87	87	87	87	87	87

S. Gallisport

Gráfico a una dilución 1:10

Hemófilo perdisis



gérmenes por 10⁶

Cuenta de gérmenes de una
Suspensión de
Hemophilus Pertussis

(Cámara de Helber)

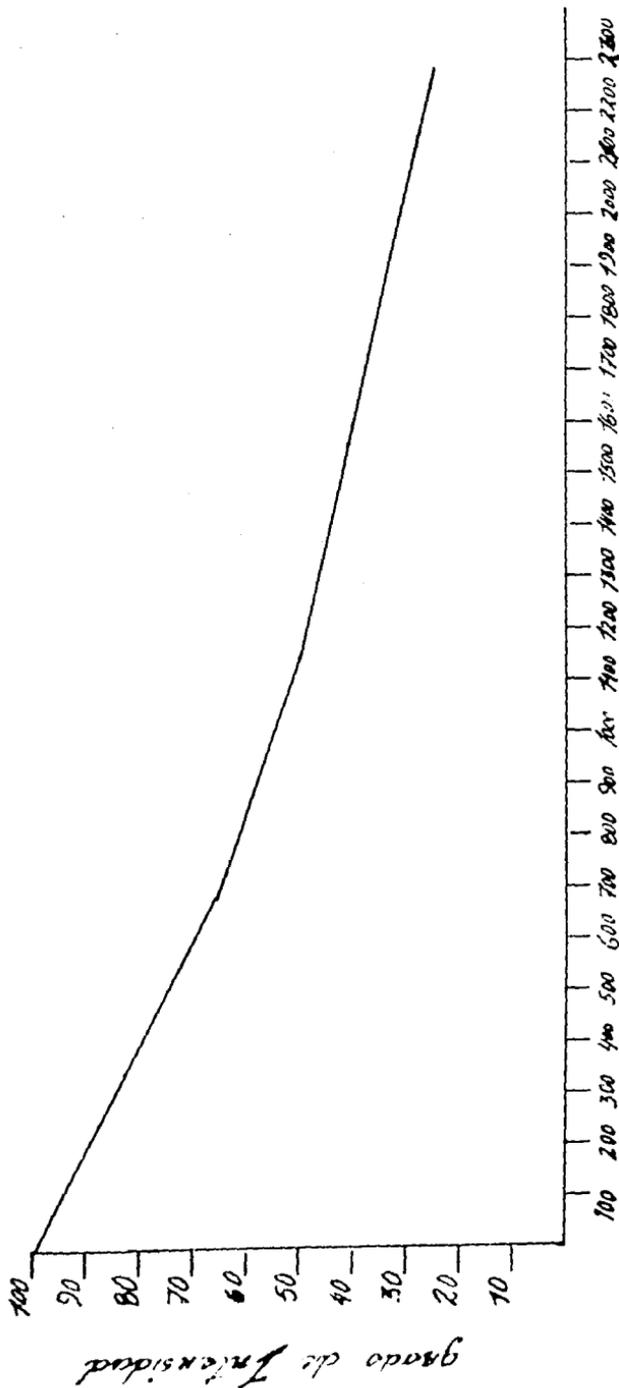
No.	Grado de Dilución	CANTIDAD DE GÉRMINES (CONTADOS EN 32 CUADROS)				Media Aritmética	Gérmenes en 100 millones (10 ¹⁰)	Media Aritmética	Gérmenes/cc.
		1	2	3	4				
1	1:200	114	105	117	112	112 14.0	14.0	10,800,000,000	
2	1:200	100	99	103	100	101	12.5		
3	1:250	82	83	90	89	86	10.7		
4	1:250	80	82	84	82	82	10.2		
5	1:300	73	71	75	73	73	9.0		
6	1:300	65	68	75	72	70	8.7		

(Microscopio de fase de contraste)

Grado de Dilución	Grados $\times 10^3$	Transmisión de luz en el Fotocolorímetro					Media Aritmética.
		T10	T15	T17	T16	T16	
1:55	1.96	16	15	17	16	16	16
1:6.0	1.80	17	17	17	17	17	17
1:6.5	1.66	20	19	20	21	20	20
1:7.0	1.54	21	21	21	21	21	21
1:7.5	1.44	23	23	23	23	23	23
1:8.0	1.35	24	24	24	24	24	24
1:8.5	1.27	25	25	25	25	25	25
1:9.0	1.20	26	26	26	26	26	26
1:9.5	1.13	27	27	27	27	27	27
1:10.0	1.08	29	27	29	29	31	29
1:10.5	1.02	31	31	31	31	31	31
1:11.0	0.98	33	33	33	33	33	33
1:11.5	0.93	34	34	34	34	34	34
1:12.0	0.90	35	35	35	35	35	35
1:12.5	0.86	36	36	36	36	36	36
1:15.0	0.72	42	42	42	42	42	42
1:17.5	0.61	55	55	55	55	55	55
1:20.0	0.54	59	59	59	59	59	59
1:25	0.43	66	66	66	66	66	66
1:30	0.36	71	71	71	71	71	71
1:40	0.27	73	75	76	76	75	75
1:50	0.21	78	78	78	78	78	78
1:60	0.18	83	83	83	83	83	83
1:70	0.15	84	85	86	85	85	85
1:80	0.13	95	95	95	95	95	95

H. fortisus

Staphylococcus aureus



germinas por 10⁶

Cuenta de gérmenes de una
suspensión de Staphylococcus aureus

(Cámara de Helber)

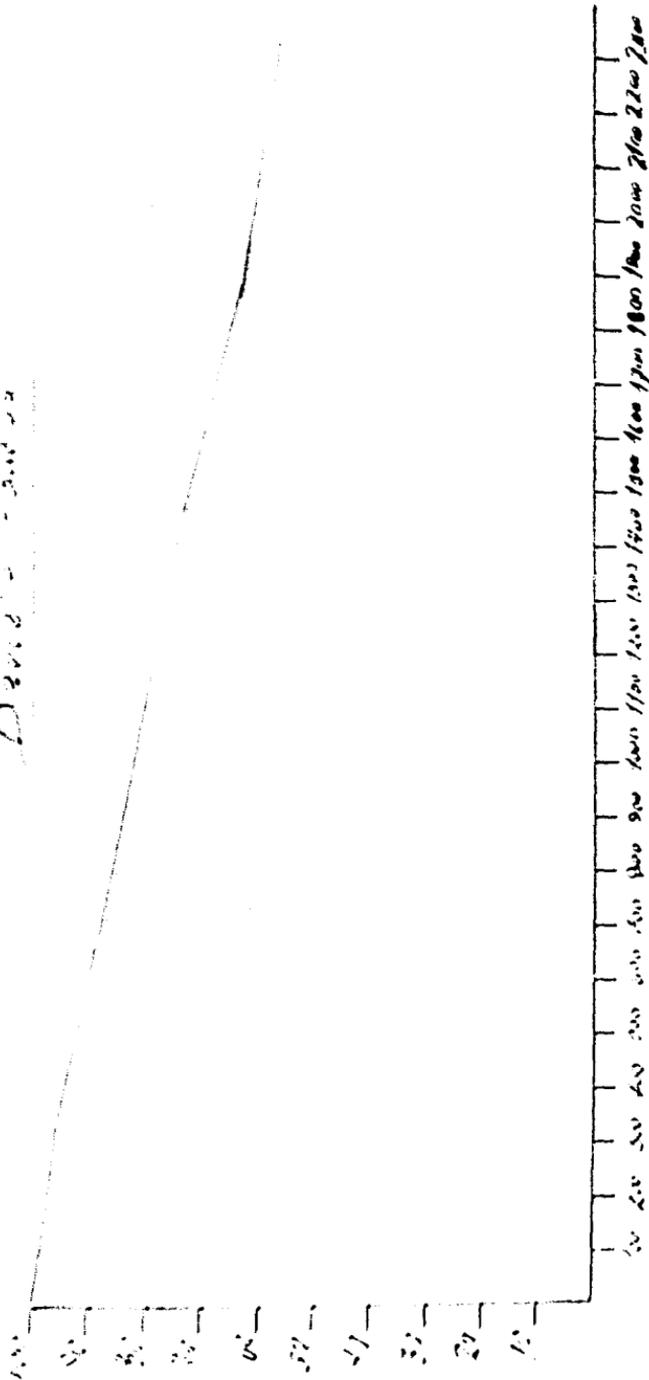
No.	Grado de dilución	CANTIDAD DE GÉRMELES (CONTADOS EN 32 CUADRITOS)				Media Aritmética	Gérmenes en 1000 millones (10%)	Media Ponderada	gérmenes/c.c.
		1	2	3	4				
1	1:200	140	150	150	122	137.7	17.2	17,100,000,000	
2	1:200	118	116	143	123	125.0	15.6		
3	1:250	97	111	111	98	104.2	16.2		
4	1:250	96	115	105	96	103.0	16.0		
5	1:300	101	99	108	97	101.0	18.6		
6	1:300	100	92	107	83	97.0	18.1		

(Microscopio de fases de contraste)

Grado de Dilución	Genes x 10 ⁹	Transmisión de Luz en el Fotocolorímetro					Media Matemática
		1ro	2do	3do	4do	5to	
1.55	510	20	20	20	20	20	20
1.60	2.85	215	215	215	215	215	215
1.65	2.63	225	225	225	225	225	225
1.70	2.44	235	235	235	235	235	235
1.75	2.28	245	24	245	245	27	255
1.80	2.13	255	27	27	275	275	272
1.85	2.01	28	28	28	28	28	28
1.90	1.90	29	29	29	29	29	29
1.95	1.80	33	33	33	33	33	33
1.10.0	1.71	36	36	36	36	36	36
1.105	1.62	40	40	40	40	40	40
1.11.0	1.55	415	415	415	41	41	412
1.115	1.48	45	45	45	45	45	45
1.120	1.42	44	44	44	44	44	44
1.125	1.36	45	455	45	45	455	452
1.15.0	1.14	50	50	50	50	50	50
1.175	0.97	54	54	54	54	54	54
1.20	0.85	58	57	58	59	58	58
1.25	0.68	65	66	65	66	66	65.5
1.30	0.57	72	72	72	72	72	72
1.40	0.42	73	73	73	73	73	73
1.50	0.34	77	78	77	76	75	77
1.60	0.28	82	82	82	82	82	82
1.70	0.24	87	87	87	87	87	87
1.80	0.21	92	92.5	93	92.5	93	92.5

S. aureus

Bever - Canada



Syringe in International

Germany x 10⁶

Cuenta de gérmenes
de una suspensión de
Brucella abortus

(Cámara de Keller)

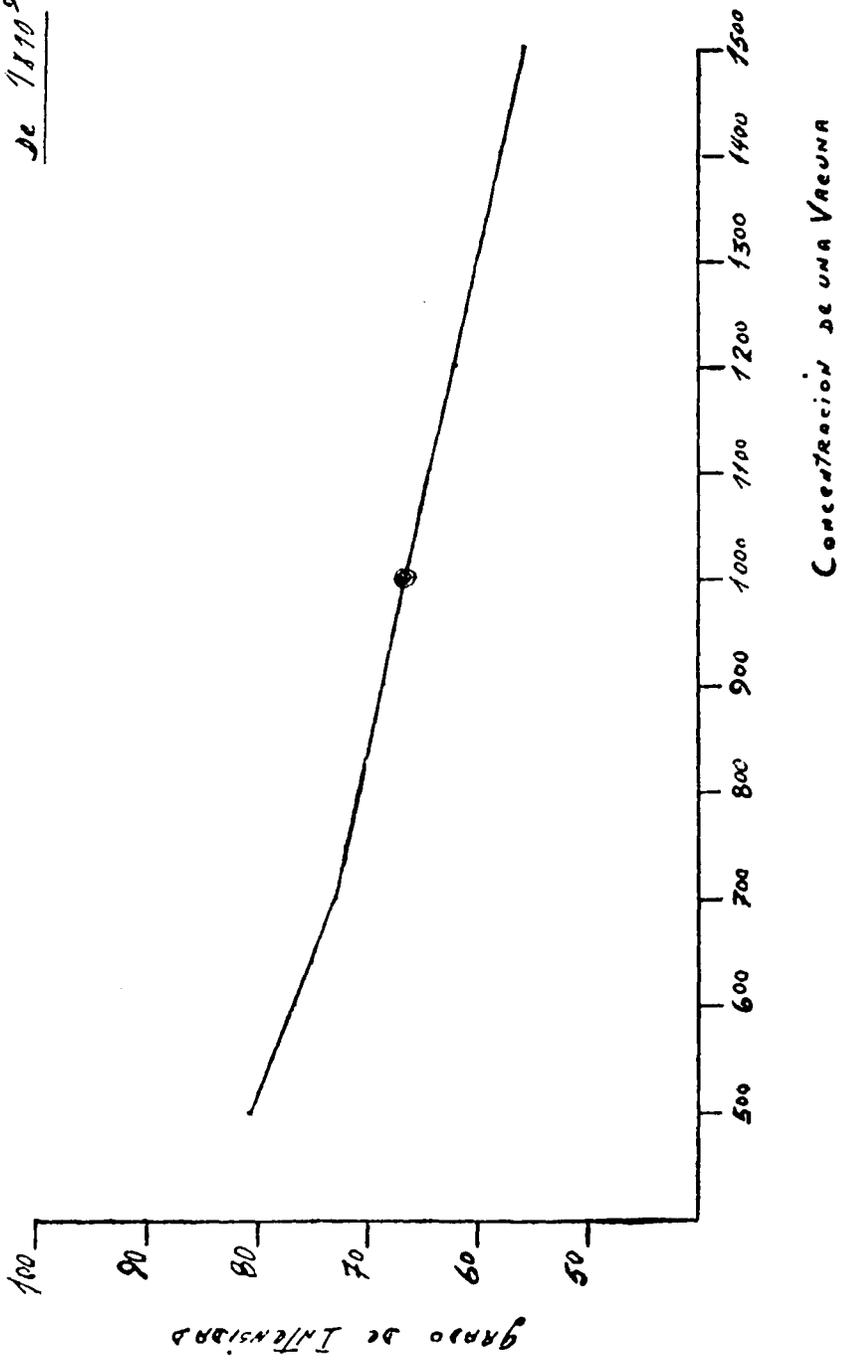
No	Grado de Dilución	Cantidad de GERMENES POR C.C. (EN 32 CUADRILÓS)				Media Aritmética	Gérmenes de 1000 millones (10 ⁹)	Media Aritmética	Gérmenes/cc.
		1	2	3	4				
1	1:200	110	111	99	106	106.5	15.3	139	13,900,000,000 gérms.
2	1:200	95	99	101	115	102.5	12.8		
3	1:250	89	85	90	94	89.5	13.9		
4	1:250	96	95	92	89	93.0	14.5		
5	1:300	79	74	76	69	74.5	15.9		
6	1:300	79	76	86	89	82.5	15.4		

(Microscopio de fases de contraste)

JARDIN DE DILUION	JERMS 1109	TRANSMISION DE LUZ EN EL FUTRO colorimetrico					MEDIA PERMEDIADA
155	252	52	52	52	52	52	52
160	231	56	56	56	56	56	56
165	213	60	60	60	60	60	60
170	198	64	64	64	64	64	64
175	185	63	63	63	63	63	63
180	173	67	67	67	67	67	67
185	163	70	70	68	69	69	69
190	154	72	72	72	72	72	72
195	146	75	75	75	75	75	75
1100	139	74	73	75	74	74	74
1105	132	76	76	76	76	76	76
1110	126	77	76	77	77	78	77
1115	120	78	78	78	78	78	78
1120	115	79	79	79	79	79	79
1125	111	80	80	80	80	80	80
1150	092	82	82	80	82	85	81.9
1175	089	84	84	84	84	84	84
120	069	87	87	87	88	88	88.5
125	055	91	91	90	91	90	90.5
130	044	92	93	95	95	92	92.7
140	030	96	90	95	95	95	95.7
150	027	97	96	96	96	96	96.7
160	023	96	97	97	96	97	97
170	010	98	97	98	97	97	97.7
180	017	98	98	98	98	98	98

Brucella abortus

VACUNA GONOCOCCICA MOSTRA A LA CONCENTRACION
de 1810^o



IV.—DISCUSSION

Como ya se dijo, es imposible contar los gérmenes exactamente, pero debe elegirse un método de estandarización, es decir que nos proporcione en varias determinaciones aproximadamente los mismos resultados, dándonos además una mayor exactitud ya que en el fondo solamente es un pseudo exactitud (19).

Según los estudios comparativos de Glynn, M. Powell, Armstrong Rees y Lissat Cox (6), el método de Wright proporciona valores demasiado bajos (y esto se ha comprobado prácticamente), estos autores obtuvieron mejores resultados siguiendo el método de cuanteo por el hemocitómetro.

El método de Wright (25), es laborioso ya que cada persona tiene distinto número de glóbulos rojos por ml. de sangre. En su crítica H. Hopkings (8), opina que este procedimiento es tedioso y tiene serios errores principalmente porque la acta de sangre usada no sea uniformemente extendida y queden capas de acumulamientos celulares, por ejemplo las suspensiones de *Streptococcus* que se tienen que agitar fuertemente y varias veces para separar los agrupamientos y es casi imposible lograrlo.

El método de la Cámara de Recuento (7), (11), presenta algunas de las ...mas dificultades, sobre todo la presencia de acumulos en la suspensión, siendo además muy laborioso y pesado cuando se tiene que hacer en gran escala, pero si al hacer las diluciones y agitar la suspensión se tiene el mayor cuidado posible, los errores de éste comparados con diversos métodos llevan a valores que no exceden a 5% de promedio (19), siendo así uno de los más exactos ya que proporciona resultados muy satisfactorios.

El método de cultivo en placas (14), (17), tienen la desventaja de que sólo pueden contarse los gérmenes vivos y éstos tardan varios días en desarrollarse y formar colonias, algunas de las cuales son tan pequeñas que no es posible contarlas. La preparación incorrecta del medio según el tipo de bacterias, el no extender o mezclar uniformemente la suspensión en el medio y el no separar completamente los acumulos de bacterias, son factores que contribuyen a dar un resultado erróneo. Por último las diluciones muy altas no deben tomarse en cuenta, porque el error se multiplicaría.

Entre los métodos para cuenta bacteriana tal vez al que más objeciones se le pueden hacer, es el Neifelométrico de Mc Farland (13). Tenemos en primer lugar el error visual, el distinto colorido de las suspensiones y de los tubos empleados, además el tipo de luz que se usa para la lectura.

En el método Neifelométrico de Mc Farland tenemos una sola tabla de valores para todos los gérmenes, cosa que no es adecuada, ya que

cada germen tiene distinto tamaño y diferente densidad óptica y en suspensiones muy diluidas es imposible ver la diferencia entre un tubo y otro.

Hans Schmidt (19), opina que los cuanteos son más exactos aplicando su método, siempre y cuando se considere la hipótesis de que las bacterias tienen forma esférica, lo que puede decirse únicamente de los cocos.

En este método deben tenerse las siguientes precauciones:

1a.—Lavar varias veces los gérmenes hasta que quede eliminado todo el medio de cultivo.

2a.—Llevar enseguida la suspensión a baño maría a 65° o a 68°C para evitar la autólisis que en algunos gérmenes comienza rápidamente.

En este método, Schmidt hizo 16 determinaciones de una suspensión de *Staphylococcus aureus*, determinó la longitud de la columna de gérmenes y calculó cuántos cocos cabían en ella, sacando promedio de un mínimo y un máximo (refiriéndose a un mínimo como el número de cocos que cubrirían sin presionarse unos a los otros y un máximo, el número de volúmenes de un coco, que caben en el volumen total de la columna).

Obtuvo resultados bastante semejantes entre cada determinación; de esta suspensión hizo 5 diluciones, nuevamente determinó el número de gérmenes y obtuvo casi idénticos resultados. Las diferencias entre las cantidades de gérmenes observadas, fueron entre 1.6 y 5.2% de las calculadas, a pesar de los errores propios de la medición y de la dilución. En este trabajo, Schmidt muestra una gráfica en la que se vé claramente que en las suspensiones menos densas, la diferencia entre los valores mínimo y máximo es menor que en las más densas, de modo que se aconseja para este método usar suspensiones de poca densidad (pero no demasiada).

Así pues el cree poder demostrar con estos experimentos que el método trabaja suficientemente exacto, al obtener una uniformidad en las diversas determinaciones.

Las desventajas y fallas del método son las siguientes:

1a.- Estas mediciones sólo pueden llevarse a cabo en suspensiones bacterianas no muy diluidas, ya que si se parte de una suspensión demasiado diluida, se tropieza con dificultades basadas en los capilares. La exactitud del cuanteco aumenta según lo ancho del capilar, pero un capilar demasiado angosto disminuye la exactitud, porque las centrifugas en uso no admiten un tubo mayor de 10 cm. Por otro lado es muy difícil introducir el mercurio en capilares muy delgados, los mejores resultados se obtuvieron usando capilares con un radio de 0.02 cm.

2a.—Para cuantear bacterias que no tienen forma esférica, Schmidt hizo determinaciones con bacilos, tomando como tipo la *Shigella* siguiendo los mismos pasos que para los *Staphylococcus aureus*; aquí encuentra una falla de 10%.

En bacilos flagelados se presenta un aumento de volumen, así pues también calculó los valores en *Salmonella typhi* y comparó con el método de Wright, obteniendo valores muy aproximados con un error de 10% (en las determinaciones posteriores comparó con el método de la Cámara de Recuento).

Por lo que respecta a las fallas tenemos en primer lugar la eficiencia de la centrífuga, ésta no sólo debe proporcionar la separación franca entre los gérmenes y el líquido sobrenadante, sino además debe reunir las bacterias lo más compacto posible para que dé resultados más exactos. Es muy importante dejar parar la centrífuga lentamente y no usar freno. Otra fuente de error se presenta en la desigualdad de los capilares y la exactitud con que se lea en el micrométrico al medir las columnas.

Por el método de Schmidt se puede determinar también el por ciento de sedimentación total que contiene una vacuna mixta y así encontraremos un factor específico para cada una de ellas, aplicando la fórmula que nos dé el número de gérmenes por ml. Este método es aplicable en caso de carecer de un fotocolorímetro, ya que los resultados que proporciona son bastante exactos porque:

1o.—Lleva menos tiempo su proceso que el método de cultivo y comparado con éste, el de Schmidt cuenta tanto gérmenes vivos como muertos.

2o.—Se evita el error visual del método de la Cámara de Recuento, que aunque es muy exacto es laborioso para trabajos en gran escala.

3o.—Este método dá resultados muy constantes obteniéndose uniformidad en las diversas determinaciones.

4o.—En el caso de determinaciones del número de gérmenes a vacunas mixtas, tenemos que por otros métodos es casi imposible lograrlo.

Ahora bien por lo que corresponde al método de Kjeldahl (9), para determinación de Nitrógeno protéico y total, no se determina la concentración de una suspensión, sólo se obtiene un dato digno de tomar en cuenta, cuando el conteo bacteriano no puede hacerse por ningún otro método (lisados y semilicados), no es muy fácil de efectuarse y requiere material especial de laboratorio y no es aplicable cuando la vacuna contiene alguna substancia que interfiera con la acción del ácido tricloroacético, porque la proteína no alcanza a precipitarse.

2a.—Para cuantear bacterias que no tienen forma esférica, Schmidt hizo determinaciones con bacilos, tomando como tipo la *Shigella* siguiendo los mismos pasos que para los *Staphylococcus aureus*; aquí encuentra una falla de 10%.

En bacilos flagelados se presenta un aumento de volumen, así pues también calculó los valores en *Salmonella typhi* y comparó con el método de Wright, obteniendo valores muy aproximados con un error de 10% (en las determinaciones posteriores comparó con el método de la Cámara de Recuento).

Por lo que respecta a las fallas tenemos en primer lugar la eficiencia de la centrífuga, ésta no sólo debe proporcionar la separación franca entre los gérmenes y el líquido sobrenadante, sino además debe reunir las bacterias lo más compacto posible para que dé resultados más exactos. Es muy importante dejar parar la centrífuga lentamente y no usar freno. Otra fuente de error se presenta en la desigualdad de los capilares y la exactitud con que se lea en el micrométrico al medir las columnas.

Por el método de Schmidt se puede determinar también el por ciento de sedimentación total que contiene una vacuna mixta y así encontraremos un factor específico para cada una de ellas, aplicando la fórmula que nos dé el número de gérmenes por ml. Este método es aplicable en caso de carecer de un fotocolorímetro, ya que los resultados que proporciona son bastante exactos porque:

1o.—Lleva menos tiempo su proceso que el método de cultivo y comparado con éste, el de Schmidt cuenta tanto gérmenes vivos como muertos.

2o.—Se evita el error visual del método de la Cámara de Recuento, que aunque es muy exacto es laborioso para trabajos en gran escala.

3o.—Este método dá resultados muy constantes obteniéndose uniformidad en las diversas determinaciones.

4o.—En el caso de determinaciones del número de gérmenes a vacunas mixtas, tenemos que por otros métodos es casi imposible lograrlo.

Ahora bien por lo que corresponde al método de Kjeldahl (9), para determinación de Nitrógeno protéico y total, no se determina la concentración de una suspensión, sólo se obtiene un dato digno de tomar en cuenta, cuando el conteo bacteriano no puede hacerse por ningún otro método (lisados y semilisados), no es muy fácil de efectuarse y requiere material especial de laboratorio y no es aplicable cuando la vacuna contiene alguna substancia que interfiera con la acción del ácido tricloroacético, porque la proteína no alcanza a precipitarse.

En el método fotocolorimétrico encontramos las mismas fallas que en la Cámara de contaje como son, la presencia de acúmulos en la suspensión, errores de dilución, etc., ya que en parte la gráfica se hace por método directo. Por lo que respecta a la lectura que se hace para la gráfica en el fotocolorímetro, se nos puede presentar también errores de dilución además de irregularidad de voltaje, lo que puede corregirse por medio de un regulador.

Ya una vez determinadas las gráficas con todo cuidado para cada germen, el método proporciona resultados muy satisfactorios ofreciendo así muchas ventajas principalmente cuando se tienen que hacer cuentas bacterianas en gran escala. Además de todas las ventajas citadas en el método de Schmidt tenemos, que el método fotocolorimétrico es más fácil y rápido, tanto para cada especie de gérmenes como para vacunas mixtas.

Tomando esto en cuenta, numerosos investigadores han aplicado este método de determinaciones fotoeléctricas a curvas de crecimiento de distintas bacterias, haciendo mediciones cada $7\frac{1}{2}$ minutos entre ellos tenemos a R. J. V. Pulvertaft y C. G. Lemon 1936 (18).

Se pensó como aplicar este método para checar el número de gérmenes que llevan las vacunas mixtas antes de salir a la venta, teniendo un control que ofrecería mayor garantía a los consumidores de tales productos. Esto sería haciendo una gráfica para cada vacuna mixta, en la que puede determinarse el número de gérmenes de la suspensión base (por el método de Schmidt, pues por el de la Cámara de Contaje sería imposible hacer una cuenta exacta de todos los gérmenes que contiene una vacuna mixta). Ya con las gráficas terminadas sólo se necesita introducir la vacuna en el fotocolorímetro, anotar el porcentaje de transmisión de luz que marca y a este número, ver cuantos gérmenes le corresponden en la gráficas, la cual está acondicionada en un mínimo de 50% menos de la cantidad de gérmenes que deba llevar esa vacuna y un máximo de 50% más.

V.—CONCLUSIONES

En el estudio comparativo de diversos métodos para cuenta bacteriana de una suspensión de *Staphylococcus aureus* se obtuvieron los siguientes resultados:

a).—Método de Wright	14.96 $\times 10^9$
b).—Método de la Cámara de Recuento	17.2 $\times 10^9$
c).—Método de Cultivo en Placas	10.1 $\times 10^9$
d).—Método Nefelométrico de Mc Farland	15.0 $\times 10^9$
e).—Método de Hans Schmidt	17.54 $\times 10^9$
f).—Método Fotocolorimétrico	17.1 $\times 10^9$

En estos resultados se puede ver lo siguiente: Por el método de la Cámara de Recuento (siguiendo la técnica del Kolmer), y por el método Fotocolorimétrico nos dió casi la misma cantidad de gérmenes; por el de Hans Schmidt los resultados son casi idénticos, mientras que por los otros métodos son variables, dado seguramente a los errores y fallas que presentan.

Otro estudio comparativo se llevó a cabo en una vacuna contra la Brucelosis del ganado. Esta se preparó adicionando a la suspensión de *Brucella abortus*, gelatina como estabilizador, habiendo quedado a una concentración de 50 000 millones de gérmenes por ml. (cuenta efectuada en un nefelómetro especial para Brucellas), se colocaron 2 ml. en cada frasco de 10 ml. y se liofilizó. Dos meses después se agregó a un frasco 5 ml. de agua destilada, por lo tanto esta suspensión debe contener 20 000 millones de gérmenes por ml.

Ahora bien la cuenta de gérmenes in vivo (cultivo en placas), nos dió 12 000 millones de gérmenes por ml. valor bajo que se explica porque un 40% de las bacterias mueren durante el proceso de liofilización y otro pequeño porcentaje mueren durante el tiempo de almacenamiento de la vacuna (2 meses).

Según la gráfica en el fotocolorímetro, nos dió un promedio de 24 000 millones de gérmenes por ml. (los 4 000 millones más pueden ser por la opacidad de la gelatina).

De los estudios hechos con vacuna Gonocócica Mixta tenemos los siguientes resultados:

Por el método de Schmidt 1.172×10^9 (cuenta mixta).

Por el método Fotocolorimétrico 1.0×10^7

Nitrógeno total 0.11 gramos %

En cuenta de gérmenes para la elaboración de esta vacuna se uso el método de Schmidt y debe contener 1.0×10^7 en total de gérmenes por ml

Los diferentes resultados pueden ser debidos a que las vacunas mixtas llevan otros componentes que interfieren para la determinación del Nitrógeno total y en el método de Schmidt por la agregación de los gérmenes después de centrifugarse ya que los gérmenes tienen distinta forma y tamaño

Este trabajo no se extiende en forma convenientemente grande pero puede verse claramente, que partiendo de todos los resultados obtenidos y viendo las ventajas y desventajas de cada uno se deduce que los mejores métodos para cuenta bacteriana son:

1.—El de Hans Schmidt para la determinación de una especie bacteriana y para vacunas mixtas (en caso de no poseer un fotocolorimetro)

2.—El método Fotocolorimétrico, que es superior todavía pues dá resultados más exactos por sus pocos errores de técnica, menos laboriosidad y rapidez al efectuarse

Se llegó a esta conclusión después de haber hecho los trabajos prácticos antes mencionados, tomando en cuenta que todos los métodos para cuenta bacteriana sólo proporcionan una pseudo exactitud

VI.—RESUMEN

1.—Se realizó un estudio comparativo con una suspensión de *Staphylococcus aureus* por los siguientes métodos:

- a).—Método de Wright.
- b).—Método de la Cámara de Recuento.
- c).—Método de Cultivo en Placas.
- d).—Método Nefelométrico de Mc Farland.
- e).—Método de Hans Schmidt.
- f).—Método Fotocolorimétrico.

2.—Se llevó a cabo un estudio comparativo en una suspensión de *Brucella abortus* por los siguientes métodos:

- a).—Método Nefelométrico (especial).
- b).—Método de la Cámara de Recuento.
- c).—Método de Cultivo en Placas.
- d).—Método Fotocolorimétrico.

3.—Se estudió comparativamente la cuenta bacteriana de una suspensión de *Hemophilus pertussis* por los siguientes métodos:

- a).—Método de la Cámara de Recuento.
- b).—Método de Hans Schmidt.
- c).—Método Fotocolorimétrico.

4.—Se determinaron gráficas para cuanteo bacteriano de las siguientes especies:

- a).—*Shigella*.
- b).—*Salmonella*.
- c).—*Hemophilus pertussis*.
- d).—*Staphylococcus aureus* y *albus*.
- e).—*Brucella abortus*.

5.—Se determinó comparativamente el número de ácrmenes en una vacuna mixta por los siguientes métodos:

- a).—Método de Hans Schmidt.
- b).—Método Fotocolorimétrico.
- c).—Se controló el Nitrógeno total por Kjeldahl.
- d).—Se determinó una gráfica para vacuna *Gonococcica Mixta*.

VII.—BIBLIOGRAFIA

- 1.—CSIZMAS L. und JOO I. 1957.
Photometrische Bestimmung der Mikroorganismenzahl nach dem Internationalen Standard.
Zbl. Bakt. I Orig. 169, 3/4, 223-232.
- 2.—DICHTL G.
Citado por SCHMIDT H.(19).
- 3.—DOLD.
Citado por SCHMIDT H. (19).
- 4.—FIEGE H.
Copilación de notas sobre cuenta bacteriana.
- 5.—GLYNN and COX. 1911.
Jour Path and Bacteriology XV, 360.
Citado por Hopkins J. G. (8).
- 6.—GLYNN E., POWELL M., ARMSTRONG REES Y LISSANT COX.
Citado por SCHMIDT H. (19).
- 7.—HELBER E. 1904.
Dtsch. Arch. Klin. Med. 81, 319.
- 8.—HOPKINGS J. G. 1913.
J. Am. Med. Asson. 60, 1615.
- 9.—FISHER H. J., ROBERTSON and REYNOLDS H. 1955.
Methods of Analysis 8a. Ed. Committee on Editing Methods of Analysis. Washington 4, D. C. 12.
- 10.—KOLMER J. A. and BOERNER F. 1948.
Métodos de laboratorio clínico. 2a. Ed. Editora Interamericana, S. A. México, D. F. 529.
- 11.—KOLMER J. A. and BOERNER F. 1948.
Métodos de laboratorio clínico. 2a. Ed. Editora Interamericana, S. A. México, D. F. 530-531.
- 12.—KOLMER J. A. and BOERNER F. 1948.
Métodos de laboratorio clínico. 2a. Ed. Editora Interamericana, S. A. México, D. F. 530.
- 13.—KOLMER J. A. and BOERNER F. 1948.
Métodos de laboratorio clínico. 2a. Ed. Editora Interamericana, S. A. México, D. F. 532.
- 14.—KOLMER J. A. and BOERNER F. 1948.
Métodos de laboratorio clínico. 2a. Ed. Editora Interamericana, S. A. México, D. F. 542.

- 15.—LIESE W. 1926.
Über die Oberflächenbestimmung von Bakterien mit dem Nephelometer nach Kleinmann.
Zschr. Hyg. Infektkr. 105, 483-487.
- 16.—LONGSWORTH L. G. 1936.
The Estimation of Bacterial Populations with the Aid of a Photoelectric Densitometer.
J. Bact., Baltimore, 32, 3, 307-328.
- 17.—MILES A. A. and MISRA S. S. 1938.
J. Hyg. Camb. 38, 722.
- 18.—PULVERTAFT R. J. V. and LEMON C. G. 1933.
The Application of Photo-Electricity to the Determination of Bacterial Growth Rate.
J. Hyg., London 33, 245-251.
- 19.—SCHMIDT H. 1936.
Zeitschrift für Hygiene und Infektions-Krankheiten, 106, 314.
- 20.—SCHMIDT H. and FISCHER E. 1930.
Z. Hyg. Infektkr 111, 542.
- 21.—STRAUSS W. 1930.
Objektive Nephelometrie mittels des Mollschens Trübungs-messers. demonstriert am Beispiel der Bakterienzählung.
Zbl. Bakt. I, Orig. 115, 1, 228-235.
- 22.—TOPLEY and WILSON'S 1948.
Principles of Bacteriology and Immunity. Third Ed.
G. S. WILSON, M. D., F.R.C.P., D.P.H., K.H.P. and A.A MILES M.A., F.R.C.P. 80-82.
- 23.—WILSON G. S. 1922.
J. Bact., , 405.
- 24.—WILSON G. S., TWIGG R. S., WRIGHT R. C., HENDRY C. B., COWELL M. P. and MAIER I. 1935.
Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun., London, No. 206.
- 25.—WRIGHT A. E. 1902.
Lancet, ii. 11.

- 15.—LIESE W. 1926.
Über die Oberflächenbestimmung von Bakterien mit dem Nephelometer nach Kleinmann.
Zschr. Hyg. Infektkr. 105, 483-487.
- 16.—LONGSWORTH L. G. 1936.
The Estimation of Bacterial Populations with the Aid of a Photoelectric Densitometer.
J. Bact., Baltimore, 32, 3, 317-328.
- 17.—MILES A. A. and MISRA S. S. 1938.
J. Hyg. Camb. 38, 722.
- 18.—PULVERTAFT R. J. V. and LEMON C. G. 1933.
The Application of Photo-Electricity to the Determination of Bacterial Growth Rate.
J. Hyg., London 33, 245-251.
- 19.—SCHMIDT H. 1936.
Zeitschrift für Hygiene und Infektions-Krankheiten, 106, 314.
- 20.—SCHMIDT H. and FISCHER E. 1930.
Z. Hyg. Infektkr 111, 542.
- 21.—STRAUSS W. 1930.
Objektive Nephelometrie mittels des Moll'schen Trübungs-messers. demonstriert am Beispiel der Bakterienzählung.
Zbl. Bakt. I, Orig. 115, 1, 228-235.
- 22.—TOPLEY and WILSON'S 1948.
Principles of Bacteriology and Immunity. Third Ed.
G. S. WILSON, M. D., F.R.C.P., D.P.H., K.H.P. and A.A MILES
M.A., F.R.C.P. 80-82.
- 23.—WILSON G. S. 1922.
J. Bact., , 405.
- 24.—WILSON G. S., TWIGG R. S., WRIGHT R. C., HENDRY C. B.,
COWELL M. P. and MAIER I. 1935.
Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun., London, No. 206.
- 25.—WRIGHT A. E. 1902.
Lancet, ii, 11.