

## Método para la preparación del agar-citrato-desoxicolato

(Medio de Leifson modificado)

Por HECTOR SOSA

---

El agar al citrato y desoxicolato de sodio, propuesto por Leifson (1935), es un excelente medio de aislamiento que ha aumentado las posibilidades técnicas en el estudio de las bacterias causantes de enfermedades entéricas. Muestra un marcado efecto de inhibición sobre el desarrollo de gran número de gérmenes del grupo Coli, sobre casi todas las bacterias Gram-positivas y sobre muchas cepas proteus que cuando desarrollan sólo lo hacen en forma O, sin tendencia a extenderse en velo. Con su aplicación al estudio de las especies patógenas intestinales se ha obtenido un sensible aumento en el número de aislamientos positivos, que aunque no llega a las cifras dadas por otros autores (Hardy, Watt, De Capito y Colodny; Cooper, Furcolow, C. Mitchell y Cullen, 1939; Hormaeche y Surraco, 1941), demuestran claramente su utilidad en estas investigaciones.

Leifson considera que se puede confiar en este medio para el aislamiento del bacilo de Eberth, de los tipos Flexner y de muchas salmonelas; mientras que los bacilos de Shiga, Sonne, Dispar y Alkaléscens, son inhibidos. Las observaciones efectuadas no confirman exactamente lo afirmado por Leifson, y concuerdan más con lo hallado por Hormaeche y Surraco. El medio de Leifson se ha mostrado adecuado para el aislamiento del género Shigella, en general, prestándose menos para el grupo Salmonella. En repetidas ocasiones se ha aislado, además del Flexner, los tipos Shiga y Sonne. Especialmente con este último no se ha notado el efecto inhibitorio de que habla Leifson. Las diferencias pueden ser debidas a que estas experiencias se refieren exclusivamente a observaciones efectuadas con material directo de enfermos, y a que Leifson trabajó preferentemente con capas de colección. En cuanto al grupo Salmonella, este medio se ha mostrado inferior a otros de

uso corriente, aunque puede aumentarse el número de aislamientos positivos prolongando la incubación y empleando el medio de selección (Sosa 1939) para el picado de las colonias.

Como el medio de Leifson pierde mucho de sus buenas propiedades al ser conservado, se trató de ensayar su preparación según el método adoptado ya con todos los otros medios, que se obtienen en el momento preciso agregando, al agar común, una solución concentrada con los ingredientes necesarios. En los primeros ensayos se encontraron grandes dificultades debidas a la propiedad del desoxicolato de pasar fácilmente al estado de gel, y a la gran concentración de sales de este medio. Esto ha obligado a modificar la fórmula original agregando un poco de alcohol que, sin alterar las cualidades del medio, presta estabilidad a la solución concentrada, cuya composición es la siguiente:

Citrato de sodio ( $2 \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11 \text{H}_2\text{O}$ ) . . . .	25 gr
Lactosa . . . . .	10 »
Desoxicolato de sodio . . . . .	5 »
Alcohol 95° . . . . .	20 ml
Rojo neutro . . . . .	20 mg
Citrato de hierro am. v. . . . .	2 gr
Agua destilada c. s. p. . . . .	100 ml
pH = 7,4	

#### INGREDIENTES

El medio ha sido compuesto tomando como base la utilización del citrato de sodio de fórmula  $2\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11 \text{H}_2\text{O}$ . No hay inconveniente en utilizar otros de constitución distinta, siempre que sean agregados en concentración molecular equivalente. Las dificultades para la obtención de drogas, en los momentos actuales, pueden obligar a recurrir no sólo a citratos que difieran en el agua de cristalización, sino en la proporción de sodio, y hasta podría emplearse ácido cítrico. En estos casos debe tenerse en cuenta, además de la equivalencia molecular, el volumen necesario para la neutralización, que debe restringirse a los límites permitidos por la fórmula concentrada.

La sal sódica del ácido desoxicólico da en agua soluciones alcalinas, de las que se precipita el ácido a pH alrededor de 6,5, obteniéndose ya a 7,5 una lenta formación de gel. Este fenómeno es exagerado por la presencia de sales y neutralizado, en gran parte, por el alcohol. En las proporciones indicadas en la fórmula se

logran soluciones utilizables, aunque algo turbias, con un pH próximo a 7,0. Es más fácil encontrar en el comercio el ácido desoxicólico, del que se puede obtener la sal sódica considerándolo como ácido monobásico, pero es más simple operar como se indica más adelante, obteniéndose la sal directamente en el proceso de preparación del líquido concentrado. La obtención del ácido desoxicólico en el laboratorio, partiendo de bilis, no ofrece dificultades.

El rojo neutro, según Leifson puede ser la sal cloruro o ioduro y debe ser de un grado de pureza conocido.

El citrato de hierro, es el citrato verde amoniacal en escamas. Debe recordarse que es ácido, higroscópico y sensible a la luz. Conviene emplear una solución neutralizada con amoníaco y conservada en oscuro sobre cloroformo.

#### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA

En los primeros ensayos se disolvía el ácido desoxicólico por separado en alcohol, y se neutralizaba antes de agregarlo al total. Esto es innecesario y puede operarse como sigue.

En un matraz aforado, adecuado a la cantidad de solución a preparar y por cada 100 ml. de volumen definitivo, se va agregando: el citrato que se emplee, calculado según las condiciones ya especificadas; 10 gramos de lactosa; el ácido desoxicólico proporcional a la fórmula; 20 ml. de alcohol de 95°; 2 ml. de una solución de rojo neutro al 1 %, y una cantidad de agua algo mayor que la necesaria para disolver el citrato.

Para favorecer la disolución se dispone el matraz en un baño de agua a 60°C y se agrega una solución de hidrato de sodio, poco a poco, guiándose por la reacción del rojo neutro. Es difícil apreciar exactamente el grado de neutralización, pues que dada la concentración de sales hay tendencia a la separación de dos fases líquidas, y el equilibrio de los componentes sólo será alcanzado al agregar el agua necesaria para llevar a un volumen próximo al definitivo.

El retardo en la desaparición del tono amarillo provocado por la adición de NaOH servirá de guía para llegar a un punto cercano a la neutralización. Se agrega entonces 4 ml. de una solución neutra de citrato de hierro amoniacal verde al 50 % (para 100 ml.), y se completa con agua destilada dejando un margen prudente para la corrección final; obtenida la cual, se enfría y enrasa.

El grado justo de alcalinidad será acusado por un ligero cambio de tono del rojo neutro y estará en su punto exacto cuando agregando 10 % de solución concentrada a un caldo con un pH de 7,4 no modifique apreciablemente su reacción. Como término de comparación se tomará el mismo caldo con la cantidad equivalente de rojo neutro.

La solución concentrada se conserva bien sin agregarle antisépticos y cuidándola de la acción de la luz.

#### PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

El citrato de sodio y la sal de hierro hacen que el medio al desoxicolato sea menos sensible a los constituyentes de la base nutritiva. Como en las experiencias efectuadas no se han apreciado diferencias notables en los resultados obtenidos con el caldo de carne de cerdo con una peptona determinada, y el caldo común preparado con carne de ternera, después de ensayar distintas peptonas se llegó a la conclusión de que no es necesario emplear una base especial.

El medio sólido de rutina en este Instituto (agar al 2 % en caldo de ternera con peptona Martín), al agregarle la « solución concentrada » se ha comportado en igual forma que el original de Leifson, obtenido siguiendo exactamente las indicaciones del autor.

Para la preparación definitiva se distribuye la solución concentrada en placas de Petri de manera que, al agregarle el medio base, quede diluida al 10 %. Si se prefiere, puede prepararse en mayor cantidad agregando al agar nutritivo, licuado y enfriado a 50°C, un décimo de su volumen de la solución antes de repartirlo en placas; evitando el calentamiento a mayor temperatura, que alteraría sus condiciones físicas por hidrólisis del agar.

#### RESUMEN

Con el medio de Leifson al citrato desoxicolato de sodio se logran muy buenos resultados en el estudio bacteriológico de las enfermedades entéricas, pero al ser conservado este medio pierde rápidamente sus propiedades.

Para suprimir este inconveniente se propone el empleo de una solución concentrada, estabilizada con alcohol.

Esta solución se mantiene bien al abrigo de la luz, y al ser agregada en proporción del 10 % al agar nutritivo común, permite obtener de inmediato y en la cantidad necesaria, un medio con todas las propiedades del propuesto por Leifson.

## BIBLIOGRAFIA

- COOPER, M. L.; FURCOLOW, M. L.; CRAEME MITCHELL, A., y CULLEN, G. E. — 1939. *Jour. of Pediatr.* 15: 172.
- HARDY, A. V.; WATT, J.; DE CAPITO, T. M., y KOLODNY, M. H. — 1939. *Publ. Health. Rep.* 54: 287.
- HORMAECHE, E., y SURRACO, N. L. — 1941. *Arch. Urug. Med. Cir. y Esp.* 18: 485.
- LEIFSON, E. — 1935. *J. Path. Bact.*, 40: 581.
- SOSA, H. — 1939. *Rev. Inst. Bact. D. N. H.* 9: 478.