

Preparación del medio de Besredka

Por Fernando Modern y N. V. D'Alessandro

La aplicación del antígeno de Besredka para el diagnóstico de las afecciones tuberculosas por la fijación del complemento, aunque se ha difundido de manera lenta, ha llegado a tener una boga no alcanzada por método alguno. Fundamenta sin duda alguna esto, la claridad de los resultados obtenidos y la intensidad de las reacciones, por una parte y su valor diagnóstico o pronóstico.

El éxito del método reside sin duda alguna en la naturaleza del antígeno cuya preparación Besredka describe en su memoria aparecido en los Anales del Instituto Pasteur en el año 1921 (1).

La dificultad mayor reside según su autor en la clarificación del medio por la solución de hidrato de sodio e indica, en el mismo artículo, un método para salvar este inconveniente. La aplicación de esa técnica permite la obtención de un medio en el que cultiva el B. tuberculosis, pero su poder antigénico es variable y escaso. La alcalinización es siempre difícil y los puntos finales que se alcanzan son muy diferentes. Por otra parte la propiedad que tiene el B. de Koch de crecer óptimamente en medios de alcalinidad escasa, induce a no apartarse de esa condición a la que sin duda se deben los fracasos tenidos con el antígeno preparado con ese medio.

(1) A. BESREDKA. Culture de Bacilles Tuberculeux dans du jaune d'œuf. *Annales de l'Institut Pasteur*, pág. 291, año 1921. Además KURT WEISE (*Eigelb-wasser zur Züchtung von Tuberkelbaz. aus Liquor u Ascites*. *Centralbt. f. Bakt.*, etc. *Originale* Bd 94, Heft 1 año 1925, pág. 35, introduce una modificación que consiste en agregar un exceso de alcalí antes de la esterilización, neutralizando después por adición de HCl, llevando el medio a pH 7.2-7.4.

La oportunidad de haber observado el Dr. Sordelli personalmente en el laboratorio de Besredka que para la preparación de su antígeno este investigador empleaba un medio de alcalinidad extraordinariamente elevada de modo que antes de esterilizar viraba la fenolftaleína al violeta y aconsejados por el Dr. Sordelli resolvimos elevar la alcalinidad de este medio para evitar los fracasos.

La adición de mayor cantidad de hidrato de sodio llega a producir en un momento determinado un aclaramiento del medio que no se modifica por nuevas cantidades agregadas. Ese punto corresponde a una alcalinidad grande, alrededor de $\text{pH}=9$ y a veces superior. La determinación electrométrica de pH con electrodos de hidrógeno es imposible, pues se obtienen resultados discordantes.

El Dr. Wernicke aplicó el método de Michaelis con fenolftaleína y pudo obtener resultados comparables y reproducibles. La alcalinización óptima juzgada por el aclaramiento correspondía a valores comprendidos entre $\text{pH}=9$ y $\text{pH}=10$. La esterilización reducía esa alcalinidad a pH 7.9 - 8.5.

La alcalinización a un pH determinado solo tendría justificación si el medio obtenido diera resultados uniformes y permitiera la obtención de un antígeno de poder de fijación elevado y específico.

Un número grande de ensayos nos autoriza a decir que la alcalinidad del medio superior a pH 9 antes de la esterilización y 8.4 después, hacen del medio de yema de huevo un medio excelente para la obtención del antígeno de Besredka para la fijación del complemento.

La técnica adoptada es la siguiente ⁽²⁾:

a) Material y reactivos.

Todo el material de vidrio neutro (Jena o Pyrex) y preferentemente esterilizado en calor seco.

1) Huevos frescos lavados con agua y jabón, y luego en alcohol.

2) Solución de NaOH N/200, preparada en el instante de usarla por dilución de una solución stock N/10, en agua destilada hervida.

(2) Es la misma indicada por Besredka que nosotros reproducimos para mayor comodidad de los que la apliquen.

3) Solución de NaOH 1 % en agua destilada preparada en el momento de su uso con NaOH libre de CO_3Na_2 (esta solución no requiere tener una concentración exacta).

4) Dilución de esta solución al 1:10 cm^3 . H_2O destilada (NaOH 1 ‰).

5) Solución stock de fenolftalenina de 1 gramo en 1000 cm^3 de alcohol a 60°.

6) Dilución al 1:10 de esta solución que se prepara en el momento de usarla (solución al 0.1 ‰).

b) *Preparación del medio de cultivo.* A 100 cm^3 de yema (más o menos 6 huevos). Se agregan 300 cm^3 de agua destilada y se clarifica por adición de hidrato de sodio al 1 por ciento (± 10 -15 cm^3) hasta que vire al color rosado con fenolftaleína (usar el método de toques).

En un tubo de ensayo (1) se coloca *exactamente* 0.1 cm^3 de solución de fenolftaleína al 0.1 ‰ y tres cm^3 de la emulsión de huevo clarificada y 6.5 cm^3 de agua destilada. En otro tubo (2) se colocan 1 cm^3 de agua destilada y 3 cm^3 de la emulsión de yema. Ambos se introducen en un comparador (por ej: el de Walpole) la solución tipo para pH 9.4 se prepara de acuerdo con los datos de Michaelis en la forma siguiente: en un tubo (3) de igual diámetro que los anteriores se ponen 0.34 cm^3 de solución de fenolftaleína al 0.1 ‰ y 9.66 cm^3 de NaOH N/200. Se coloca este tubo delante del tubo (2) en el comparador. Detrás del tubo (1) se pone un cuarto tubo con agua destilada y se procede a la determinación de la cantidad de NaOH que se debe añadir al medio, agregando al tubo (1) solución de NaOH al 1 ‰ hasta que los colores sean en ambos lados del comparador iguales.

Supongamos que se hayan agregado 0.5 cm^3 (*). La alcalinización se hace por un simple cálculo añadiendo a la emulsión de yemas NaOH al 1 ‰; en este caso para los 394 cm^3 se deben añadir $394 \times 0.5 \times 1/10 \times 1/3 = 6.5$. A la emulsión se agrega 1.576 cm^3 de agua destilada (prácticamente hasta completar a 2 litros). Se filtra por gasa estéril y se distribuye en balones para ser esterilizado a 110° C durante 20'

(*) Se comete un pequeño error porque la dilución en el tubo (1) es diferente de las de los tubos (2) y (3), $3+0.1+6.5+0.5=10.1$ en vez de 10 cm^3

A continuación a título de ejemplo damos los protocolos de uno de los tantos ensayos efectuados.

		pH antes de esterilizar	pH después de esterilizar 25' a 100 c.
Solución.....	1	9.40	8.50
»	2	9.30	8.45
»	3	9.30	8.40
»	4	9.30	8.45

Para determinar el pH después de la esterilización se emplearon las mezclas reguladoras de Palitzsch (**) (borax-ácido bórico). En estos cuatro medios el desarrollo de los bacilos tuberculosos fué abundante e igual a los demás ensayos anteriores.

(**) Clark: Hydrogen ion concentration. p. 83. 1929.