

Medios con extracto de hígado para el cultivo del neumococo

Por R. QUIROGA

La obtención de cultivos abundantes de neumococos es relativamente difícil, pues es necesario recurrir a medios especiales o a la adición de sustancias activantes a los medios comunes.

El empleo de medios especiales esterilizados, tal como los aconsejados por Cotoni, Truche, Raphael ⁽¹⁾ (medio T y M M) o el caldo de neumococos (pneumococos Broth) aconsejados por Park ⁽²⁾ y otros autores americanos, permiten con algunas pocas excepciones obtener cultivos abundantes.

Aparte del pequeño inconveniente que significa preparar medios diversos, los medios citados no dan siempre un cultivo abundante en pocas horas y es necesario recurrir a la adición de suero o a siembras con mucho material o a un acostumbramiento previo de la cepa que se siembra.

En el curso de algunas investigaciones sobre los neumococos, nos vimos obligados a estudiar la mejor forma de obtener en cualquier momento y con los cultivos de colección, un desarrollo abundante y con poca acidez en el medio. Fué así que estudiamos la influencia de la adición de glucosa al medio M M en distintos momentos, como así mismo la del "buffer" de fosfato de sodio, repitiendo ensayos hechos por autores americanos con caldos diferentes de M M.

La adición de glucosa (0.1 %, 0.2 %) antes de la esterilización, favorece de una manera notable el cultivo. Puede decir-

(1) Como medio de conservación de neumococos usamos con resultado excelente, como por otra parte conocido, la siembra por punción en un medio de cuatro partes de agar con una parte de sangre desfibrinada de conejo a 37°. En este medio se conservan por más de 60 días y hasta 100 días.

se que en ausencia de glucosa apenas desarrolla. Una nueva adición de glucosa después de la esterilización, revela también una acción favorecedora.

La mezcla de $\text{PO}_4\text{H Na}_2$ y $\text{PO}_4\text{H}_2 \text{K}$ de pH 7.8 no ha modificado favorablemente los resultados. La mezcla esterilizada, con glucosa ha revelado una acción frenadora del cultivo.

En resumen, puede decirse que la glucosa (al 0.2 %) favorece el desarrollo del neumococo si se añade a un caldo alcalino de pH 8.4 antes de su esterilización y que la adición de 0.1 - 0.2 % más, después de la esterilización de ese mismo medio, aumenta el desarrollo o por lo menos la turbidez. En estos medios la acidez es ya manifiesta a las 24 horas, siendo por lo tanto poco conveniente para obtener cultivos virulentos.

La solución de este pequeño problema la hemos hallado con el empleo del extracto de hígado aconsejado para el cultivo del gonococo (Sordelli, Miravent y Negróni, Revista del Instituto Bacteriológico, vol. 4, página 636) y usado también con éxito para el meningococo. El extracto de hígado se prepara por maceración de una parte de hígado de bovino con 2 partes de agua corriente con 5 % de cloruro de sodio, durante 2 horas a 45°. La temperatura se eleva gradualmente hasta 60 - 65°, manteniéndola por espacio de 10'. El líquido se aclara y se filtra rápidamente por papel.

El líquido claro se filtra por bujía esteril, se distribuye en ampollas y se asegura su esterilidad por calentamiento a 55° tres días seguidos 1 hora. El enturbamiento de este extracto no modifica apreciablemente sus cualidades. Conviene usar solo el líquido para lo que basta con centrifugar las ampollas antes de ser abiertas.

CULTIVO EN CALDO

Basta la adición de 2 a 5 % de este extracto a un caldo para favorecer de una manera considerable el desarrollo del neumococo. Los caldos han sido los comunes destinados a usos generales en un laboratorio de bacteriología, ya caldo Martín de pH 8.4 o caldo con peptona Parke Davis al 1 % o 2% y de misma alcalinidad. La semilla ha sido tomada de un tubo de agar-suero o agar-sangre ⁽¹⁾. El desarrollo se observa ya a las 3 horas y llega al máximo dentro de las primeras 24. En este momento el número total de gérmenes por opacidad, es próximo a 3.000 millones por cm^3 y el número de gérmenes vivos

es de \pm 1.000 a 2.000 millones (neumococos II). La acidificación en 24 horas de cultivo es relativamente pequeña, pues nunca alcanza el medio a tener menos de pH 7. (2)

Ensayos regulares que permitan demostrar que el medio es favorable para la conservación de la virulencia, no hemos realizado, pero sí puede decirse que para la rutina, es su uso corriente. La virulencia máxima hallada fué la de un neumococo tipo III, que mata al ratón blanco por inyección peritoneal con 1/10.000.000 de cm.³, es decir, aproximadamente con 200 gérmenes.

La determinación fué hecha por dilución en solución fisiológica a razón de 1/10 (1 cm.³ de caldo más 9 de sol. fisiológica) y cambiando la pipeta a cada dilución. Si no se guarda este requisito, se cometen errores de cuya magnitud no se puede tener cuenta alguna. A este defecto de técnica deben imputarse los errores cometidos por algunos autores que alcanzan a matar un ratón blanco con 10^{-10} de cm.³, es decir, con una fracción de menos de 1/10 de neumococo.

El neumococo cultivado de este modo tiene una cápsula fácilmente coloreable por el método de Huntoon.

La adición de glucosa al medio de caldo-hígado es también favorable al desarrollo.

El cultivo en agar con extracto de hígado por diseminación, es abundante y las colonias son semejantes a las obtenidas en el agar-suero.

El cultivo en punción es abundante a lo largo del trazo del ansa. En la superficie desarrolla escasamente y no tiene tendencia a extenderse.

CONCLUSIONES

El medio de caldo-hígado es conveniente para la obtención regular de un cultivo abundante de neumococos, capsulados y virulentos. Su preparación es simple y no requiere medios especiales.

(2) En el extracto de hígado existen sustancias reductoras (4 ‰). No podemos decir si se trata de glucosa u otro cuerpo reductor, aunque probablemente sea glucosa o maltosa.

Para la obtención de antígenos, para la preparación de vacunas, tiene la ventaja de excluir el empleo de suero de caballo, que aunque usado en proporción pequeña puede ser suficiente para sensibilizar a los sujetos vacunados.

El medio agar-hígado es muy conveniente para la conservación.

BIBLIOGRAFIA

- COTONI, TRUCHE, RAPHAEL. Pneumocoques et affections pneumococciques, pág. 17 y pág. 97. Masson, París 1922.
- PARK Y WILLIAMS. Pathogenic Microorganismes. Lea Febiger, 1924. Philadelphia y New York.