

# MEDI DE CULTIU DEL BACIL DIFTÈRIC

per

M. ARMANGUÉ

R. ALBI

La ciència bacteriològica, en el seu avenç constant, ha vist complicar extraordinàriament la seva tècnica. La troballa successiva de nous gèrmens patogènics, de llurs propietats bioquímiques, de llurs afinitats colorants i exigències culturals, junt amb la subdivisió en races de la majoria dels gèrmens per diferències serològiques i fermentatives que permeten de reconèixer els diversos tipus, tot ha contribuït a complicar la tècnica bacteriològica, apartant-la de la relativa senzillesa d'abans, per obtenir dades més precises en l'estudi i diagnòstic dels agents etiològics de les malalties infeccioses.

Un dels punts més importants i que mereixen més atenció és el que es refereix als medis de cultiu dels gèrmens. La utilització de quatre o sis medis de cultiu per al desenrotllament de totes les espècies microbianes conegudes, cosa que es venia fent en els primers temps de la bacteriologia, era un greu inconvenient, ja que, si bé en els susdits medis ordinaris creixen luxuriosament molts gèrmens, altres ho fan tan dèbilment, que llur cultiu és sumament pesat, això a part que el de molts altres fracassi completament.

Per millorar els resultats s'ha afavorit el creixement



dels gèrmens per mitjà d'una adaptació exacta de la reacció del medi al germen destinat, a benefici del roig de fenol i mitjançant l'addició de determinades substàncies (sucres, hemoglobina, etc.) que, si bé en casos determinats milloren els cultius, en altres poc o cap benefici se n'obté, a part de l'efecte que especialment produeixen els sucres de disminuir el temps de vitalitat dels gèrmens.

Una nova i fructífera via és l'empresa en aquests últims anys de preparar els medis de cultiu segons les afinitats de les bactèries per a determinats teixits. Així el *Micrococcus Melitensis*. Aquest cultiu, dèbil i tardà en els medis ordinaris, es millorava poc amb la recomanada addició de nutrosa o de glicerina. Creix amb molta facilitat i abundantment sobre agar-placenta, i el mateix podem dir del gonococ en l'agar-testicle, que utilitzen especialment els tècnics americans, els quals obtenen cultius luxuriants. Veiem, doncs, que els gèrmens fàcilment cultivables beneficien dels medis ordinaris; però en cada un dels altres és precís indagar fins a trobar el medi que, amb certa llibertat d'expressió, podríem anomenar específic. Seguint aquesta via, adaptant a cada germen el seu medi, s'arriba a una complicació gran de la tècnica dels cultius pels múltiples medis que el bacteriòleg ha d'emprar : més, encara, si la preparació d'aquests és pesada. Tot allò que sigui fer més senzilla llur preparació és facilitar el treball del bacteriòleg, que hi perd gran part del seu temps.

El bacil diftèric, per la importància que té en patologia humana, és un dels gèrmens les condicions de cultiu del qual han estat més estudiades i a favor de les quals s'han proposat més mitjans. Entre els líquids, el brou Martin, a base d'autolitzat d'estómac de porc, és el preferit correntment en la preparació de la toxina.



En aquest brou, degudament alcalinitzat, el germen es multiplica ràpidament, conservant bé la seva vitalitat, i mostra el màxim poder toxigen. Quant als medis sòlids, són destinats a dos fins : a obtenir el germen isolat dels seus associats en les falses membranes, o a obtenir fàcilment gran quantitat de cossos bacil·lars sense toxina. Per al primer fi (diagnòstic ràpid de diftèria) s'utilitza universalment el sèrum de brou recollit estèrilment, afegit a un 1 per 100 de glucosa tindalitzat i coagulat en tubs inclinats. És, en gran manera, el millor medi per a aquest fi : en 9 a 18 hores s'obtenen colònies del germen, acompanyat no rarament de colònies de microbis associats, especialment el neumococ i l'estreptococ, que, si bé es distingeixen fàcilment per llur cultiu dèbil puntiforme, no és cert que comencin a germinar molt més tardanament, com tant s'ha dit. Aquest retard és cert quan es tracta d'altres microorganismes, com per exemple l'estafilococ i el tetragen. El sèrum de bou ha estat substituït per alguns autors per sèrum de cavall, i també per clara d'ou (Sakaroff); i, si bé ha dat bons resultats, no pot substituir a aquell amb avantatge.

Amb tot, el sèrum és de preparació més pesada del que sembla a primera vista. Abans de tot, l'obtenció asèptica de la sang obliga a la majoria dels bacteriòlegs a traslladar-se a l'escorxador. Si es vol obtenir sang sense precaucions d'asèpsia, pot fer-se filtrant després el sèrum amb ajuda de l'aparell de Miquel, o efectuant una tindalització rigorosa durant uns quants dies. La tindalització i coagulació del sèrum, tant l'obtingut asèpticament com el que ho ha estat sense aquesta condició, requereixen estufes especials, temps i atenció. El sèrum es resseca quelcom, i, malgrat tot, no es pot evitar que alguns tubs s'alterin o infectin.



Els bacils diftèrics ja repicats de temps en medis de cultiu artificials, arriben a adaptar-se a ells i germinen en major abundància que en ésser isolats de l'organisme, ja que fins germinen en agar-peptonat ordinari. Malgrat això, no s'aconsegueix obtenir cultius luxurians, cremosos, que donin una gran quantitat de cossos bacil·lars.

Tant per a l'isolament del bacil diftèric com per al seu cultiu intensiu, s'han proposat infinitat de medis destinats a substituir, amb millors resultats o més fàcil preparació, el sèrum de bou. A part dels ja citats (sèrum equí, clara d'ou), anomenarem l'agar-llet (en el qual apareixen formes involutives que dificulten el diagnòstic), el medi de Rankin (sèrum-glucosa-roig neutre-sulfocianat potàssic), els dos de Péryola (agar-telurit de potassa-rovell d'ou o bé sèrum-sal-telurit-rovell d'ou), el de Sandel (clara d'ou-llet), l'agar-ascitis, agar-glicerina, els medis de Junrrain Smith, de Kantbach, de Hayward, de Capaldi, etc., a base tots d'agar, sucres i líquids exudatius. Aquests medis, quant als resultats, no superen ni tan sols igualen els del sèrum de bou glucosat, i són, en general, d'una preparació encara més pesada que la d'aquest.

Nosaltres, amb desigs de simplificar la preparació del sèrum de bou coagulat, vàrem fer proves per indagar si el sèrum coagulat a temperatures més elevades perdia les seves bones propietats per la germinació del bacil de Klebs-Loeffler; i vàrem poder comprovar que era igualment apte per al seu creixement. Coneguda aquesta dada, i després d'una llarga sèrie de proves, havem arribat a l'obtenció d'un medi la facilitat de preparació del qual permet de tenir-lo llest en poc temps i els òptims resultats del qual ens indueixen a recomanar la seva adaptació.



Es recull sang de bou sense precaucions d'asèpsia rigorosa (cosa que permet d'enviar un subaltern a l'escorxador), i, una vegada separat el sèrum, s'afegeixen a cada 200 cm<sup>3</sup> d'aquest 102 gr. de glicerina pura i neutra, i es va afegint en petites proporcions sobre un rovell d'ou de gallina (16 a 18 gr. de pes), barrejant-se per batuda fins a tenir una barreja homogènia. Es distribueix en tubs grans de cultiu *el vidre dels quals no contingui plom*, es tapa amb cotó, i es porten els tubs, inclinats en la posició adequada, a 80-85 gr., fins a coagulació. Aquesta es pot accelerar augmentant la temperatura, però curosament; car si la temperatura fos massa alta es formarien bombolles que alterarien la llisor del medi. Una vegada obtinguda la coagulació, es porten els tubs a l'autoclau, l'aixeta de la qual serà tancada *així que en surti vapor*; car si, al contrari, hom espera que en surti un fort raig, s'alterarà també la superfície del medi. Llavors es manté 10 minuts a 1/4 d'atmosfera. Després, tancat el gas, deixarem refredar espontàniament l'autoclau fins a menys de 100 gr., i podrem treure els tubs ja llestos per a llur ús. Es tindrà preparat el medi en 1 hora o 1 hora i mitja. És opac, amb una superfície ferma, brillant, humida, de color crema clar, i al fons del tub queda una mica d'aigua de condensació. Els tubs parafinats podran guardar-se indefinidament. Sobre aquest medi, isolament del bacil de Klebs-Loeffler s'aconsegueix, en alguns casos, fins en 6-9 hores. Els gèrmens associats creixen igualment en el medi original, i poden veure's especialment l'estreptococ, les colònies puntiformes que no aconsegueixen créixer més i no impedeixen la germinació del diftèric, del qual, demés, es distingeixen fàcilment. Els bacils diftèrics repicats ja diverses vegades en el laboratori sobre el nostre medi, produeixen un cultiu ràpid que arriba, en uns 4 dies,



a donar una capa espessa, cremosa, de bacils, d'incomparable valor per a obtenir cossos bacil·lars en gran quantitat.

Els avantatges del medi que proposem són abans de tot una preparació fàcil. Ultra el sèrum, sols es necessita glicerina neutra i rovell d'ou; coses, totes dues, que es troben a mà de tothom en qualsevol moment. En menys de 2 hores és té llest en el cas d'haver-se de preparar. Se suprimeixen la pesada manipulació asèptica de la sang i del sèrum, i les llargues tindalitzacions amb llurs inconvenients, entre els quals hi ha l'excessiva deshidratació i dessecació del sèrum; i, finalment, l'esterilització a l'autoclau evita la pèrdua d'uns quants tubs, sempre inevitable, en preparar el medi clàssic, per contaminacions accidentals. Per les mateixes raons podem fàcilment preparar a l'acte, en cas d'urgència, el susdit medi substituint el sèrum de bou pel de cavall, en la forma que segueix. En cada un de dos o tres tubs es posen 10 cm<sup>3</sup> d'un sèrum terapèutic de cavall (normal antitetànic, antipestós) que no contingui antisèptics conservadors, tal com els preparen els laboratoris del nostre país. S'afegeixen a cada tub dues gotes de glicerina i unes 18 de rovell debatut. Es barreja bé el contingut dels tubs, els quals són sotmesos a coagulació i esterilització en la forma dita. En efectuar aquesta última operació, s'aprofitarà, si havem d'efectuar el diagnòstic d'una falsa membrana, per a esterilitzar el tub que conté el portacotó que ha de servir en l'extracció del material sèptic. De totes maneres recomanem utilitzar el sèrum de bou sempre que sigui possible, i solament servir-se del de cavall en el cas de no disposar del primer.

*Laboratori Municipal de Barcelona*