

UN MEDIU DE CULTURA PENTRU IZOLAREA ȘI CULTIVAREA BACILILOR TUBERCULOZEI

G. Badenski, L. Simplăceanu, D. Bedeleanu

Intr-o comunicare anterioară, doi din autorii lucrării de față (2) reluind după Rauschnig (3) prepararea de medii de cultură în care extractul de carne este înlocuit cu extract de soia, au obținut medii care aveau la bază extract de soia, extract de fasole, sau mazăre. Extractele erau obținute prin digestia peptico-clorhidrică a făinilor vegetale.

Reamintim pe scurt tehnica de preparare: boabele de soia, sau fasole, sau mazăre, se macină în rșișnița de laborator. Pulberea se trece prin sita nr. 4, pentru obținerea făinei, care va fi supusă digestiei. În acest scop, se cântăresc separat câte 100 gr făină, în trei borcane de 2—2,5 l. cu dop rodat. Se adaugă în fiecare borcan 2 l. apă distilată, 16 ml HCl concentrat, 1 gr pepsină, produs românesc și 20—25 ml cloroform.

Amestecurile închise (cu dop rodat) se încubează la 37° timp de 48 ore, se filtrează și neutralizează cu o soluție de NaOH 10%, față de hîrtie indicator universal la 7,4—7,5. Se obțin astfel digeratele native.

La digerale se adaugă la cald 1% peptonă și NaCl necesar (după dozarea clorurilor native). Lichidul obținut se filtrează și sterilizează. El se folosește fie ca atare — mediu lichid — fie se gelozează 1,5—3% după nevoie.

Analiza biochimică a hidrolizatelor finale pentru N total, proteic, polipeptidic, etc., substanțe reducătoare, oze, a demonstrat că au un conținut ridicat în substanțe azotate, în special în azot amino-acidic, aproape dublu ca al bulionului de carne.

De asemenea dozarea substanțelor reducătoare, arată un procent ridicat de substanțe reducătoare totale, în special de oze fermentescibile.

De la începutul încercărilor de a cultiva diverși germeni pe mediile preparate cu aceste extracte, s-a observat că sînt deosebit de favorabile pentru dezvoltarea bacililor tuberculoși de tip bovin și aviar. Intr-adevăr, după 18 zile de la însămînțare s-au dezvoltat colonii bine vizibile de bacili de tip bovin și aviar, bacilii de tip uman, dezvoltîndu-se ceva mai lent, dar dînd de asemenea ulterior colonii abundente.

Observația aceasta a dus la următoarele concluzii:

1. Mediile sînt favorabile în special acelor tipuri de bacili tuberculoși, care din punct de vedere filogenetic sînt mai aproape de bacilii paratuberculoși, confirmînd astfel, pe altă cale cercetările Acad. *Ionescu-Mihăiești*. După acesta, bacilul tuberculos bovin, este la origine un paratuberculos adaptat la organismul animal (4). Acad. *Ionescu-Mihăiești* demonstrează această filiație bazat pe similitudinea modificărilor suferite de mediile de cultură și de conținutul în fermenți, studiînd paralel 3 tulpini de tip bovin: *Vallée*, *Ratti* și *Cerny* și 3 tulpini de paratuberculoși.

2. Prin îmbogățirea mediului de bază, s-ar putea obține un mediu și mai favorabil, care să permită dezvoltarea oricărui tip de bacil tuberculos.

3. S-ar putea obține astfel medii echivalente ca valoare diagnostică, cu cele mai bune din cele utilizate astăzi: *Löwenstein-Jensen*, *Dorset*, eventual *Dubos*, dar cerînd ingrediente, puține, ușor de preparat și la un preț foarte scăzut.

Sa adăugăm la aceste considerații că după o serie de autori, mediul *Löwenstein-Jensen* este în special favorabil pentru izolarea bacililor de tip uman (5) și că după alte cercetări, pentru izolarea inițială, mediul *Dorset* își păstrează integral valoarea, atît pentru bacilul de tip uman ca și pentru tipul bovin (5). În sfîrșit dacă se ține seama de faptul că unele tulpini de tip bovin, la izolare, dau colonii bine dezvoltate, pentru ca după cîteva treceri să nu se mai dezvolte de loc, avînd în vedere calitatea hidrolizatelor vegetale, de a favoriza în special dezvoltarea bacililor de tip bovin și aviar, s-a socotit că prin simplă adăugare de ou la hidrolizate, s-ar putea obține medii care să fie egal de favorabile pentru indiferent ce tip de acidorezistent.

S-au făcut astfel mai multe serii de experiențe, care au căutat să lămurească:

a) Dacă prin adăugare de ou și glicerină valoarea nutritivă a extractelor vegetale poate fi mărită și care sînt proporțiile optime.

b) Odată stabilită formula mediului, cum se comportă în încercările de izolare a diverselor tipuri de bacili tuberculoși (6).

Mediile preparate în acest scop, au fost obținute după formula dată. Odată hidroliza terminată, imediat după neutralizare și aducerea la pH 7,5 apare un precipitat. Pentru clarificare, mediul a fost fiert scurt timp, răcit și filtrat prin hîrte de filtru. S-a adăugat apoi ou și glicerină, dar fără peptonă și fără NaCl.

1. S-a încercat astfel în primul rînd adăugarea de gălbenuș, în diverse proporții de la 1/8 (10 cc gălbenuș la 80 cc hidrolizat) mediu care a trebuit solidificat prin adăugare de geloză, pînă la o proporție de 1:1 (175 cc gălbenuș la 200 cc) ca și în mediul *Löwenstein-Jensen*. Ca substanță de contrast și inhibitor pentru germeii de asociație, s-a adăugat verde malachit în concentrația finală de 1/25000 (ca la *Löwenstein-Jensen*).

De asemenea, din fiecare hidrolizat (de mazăre, fasole), preparat după formula de mai sus, s-au făcut loturi glicerinate 1% și neglicerinate.

Testarea mediilor de cultură s-a făcut întrebându-se paralel 3 tulpini de laborator: uman Ratti, bovin Cerny și o tulpină de b. tuberculos aviar, reprezentând cele 3 tipuri de patogeni.

Din fiecare tulpină (tip uman, bovin, aviar) s-au însămânțat cu pipeta Pasteur din cultură tinere și omogenizate, diluții zecimale, mergând de la 10 și 20 germeni, până la 100.000 și 200.000 germeni pe un tub de cultură.

Însămânțarea s-a făcut deci pentru fiecare diluție, atât pe mediu cu hidrolizat de fasole, ca și pe hidrolizat de mazăre, cu și fără adaos de glicerină — câte 2 tuburi din fiecare tip de mediu, cu 2 tuburi martore de Löwenstein-Jensen — deci 10 tuburi de cultură pentru o diluție dată.

Această cercetare a arătat de la început că:

1. Apariția și numărul coloniilor e în raport direct cu cantitatea de ou adăugată la mediu.

De exemplu: atunci când mediul conține ou în proporție de 1/8, primele colonii sînt vizibile la 3 săptămîni chiar pentru 20 germeni pe tub și sînt vizibile la 2 săptămîni, pentru aceeași densitate, atunci cînd proporția de ou crește la 1/3 putînd fi decelate și la 10 zile, cînd proporția crește la 1/1,1, dar pentru densități care trebuie să atingă 80 germeni pe tub.

Datele acestea se referă la bacilul tbc. uman și bovin, pentru că bacilul tbc. aviar se dezvoltă mult mai rapid, avînd colonii vizibile de la 10 zile pentru 20 germeni pe tub de cultură, în medii în care proporția de gălbenuș este de 1/4.

Chiar și pe mediile la care proporția de gălbenuș nu atîngea pe aceea din mediul Löwenstein-Jensen, am avut cazuri în care primele colonii vizibile au apărut după 10 zile, fără ca ele să apară pe Löwenstein-Jensen. Pe acest din urmă mediu, mai ales pentru bacilii de tip uman apariția coloniilor a fost mult mai tardivă. Și în aceste 3 variante s-a putut observa că mediul este în mod hotărît mai favorabil pentru tipul bovin decît pentru cel uman, diferență care dispare treptat, odată cu mărirea cantității de gălbenuș care ameliorează mediul în favoarea dezvoltării și a bacilului de tip uman.

În general, mediile preparate în condițiile noastre de lucru se apropiau ca valoare de Löwenstein-Jensen.

II. Paralel cu această încercare de testare a sensibilității în raport cu cantitatea de gălbenuș s-a încercat un mediu la care cantitatea de ou era egală cu aceea din mediul Löwenstein-Jensen. Pe mediile astfel preparate s-au însămînțat un număr de 134 spute, de la bolnavi cu tuberculoză pulmonară (diagnostic clinic), supuși chimoterapiei. Evident înainte de însămînțare, s-a făcut examenul microscopic al sputelor, iar 82 au fost inoculate și la cobai.

S-au izolat astfel 95 tulpini de b. ai tuberculozei din spute. Izolarea s-a făcut trăind sputele cu H_2SO_4 6%. Acest fapt își are importanța lui, pentru că tratarea sputelor cu NaOH, permite ulterior dezvoltarea unui număr mai mare de germeni de asociație, în special ciuperici, dintre care unele nu numai că contaminatează tulpinile dar și lichidiază rapid mediul. Din cele 134 spute, în 15 cazuri nu s-a obținut o tulpină de tulpini pe mediul Löwenstein-Jensen, ci numai pe mediile cu hidrolizate. În alte 6 cazuri situația a fost inversă, izolarea fiind obținută numai pe Löwenstein-Jensen.

Din 132 spute, 12 au fost negative la examenul direct. Din acestea 12, am izolat prin cultură 7 tulpini de b. tuberculoși, 5 numai pe mediile cu hidrolizate, 2 numai pe mediul Löwenstein-Jensen.

Din restul de 5 rămase negative și prin cultură, totuși inocularea la cobai a dat rezultate pozitive în 4 cazuri.

Deci, după experiența noastră, inocularea la animal rămîne cea mai sensibilă metodă de detectare a b. tuberculos.

Această concluzie, reiese și din compararea rezultatelor a 17 din sputele însămînțate paralel pe mediu cu hidrolizate, pe Löwenstein-Jensen și inoculate la cobai. Este vorba de 17 produse selecționate pentru motivele care se vor vedea mai jos:

— În primul rînd cu toate aceste 17 spute cobaii au făcut după inoculare o infecție benignă, au căștigat în greutate în cursul observației și au trebuit să fie sacrificați. Pe 11

spute, b. tuberculoși, nu au fost prezenți decît în ganglionii inghinali ai cobailor. Șase spute au dat și leziuni discrete — adesea unice — în splină sau și în ficat, deci evoluție tipică de tulpini hidrazidorezistente.

Din 17 spute care au infectat cobaiul, 4 au rămas negative pe Löwenstein-Jensen și una pe medule cu hidrolizate.

Din cele 95 tulpini izolate din spută, 12 sînt menționate în laborator pe medii cu hidrolizate, avînd pînă în momentul de față 19 treceri, păstrîndu-și capacitatea de a se dezvoltă cu ușurință pe mediile de cultură, într-un interval de peste 3 ani.

III. În afară de tulpinile umane, în cursul anilor 1957—1958 și 1959 s-au izolat de la animale (bovidee) tuberculoase, 15 tulpini de bacili de tip bovin. Trei tulpini nu au putut fi izolate pe mediul Löwenstein-Jensen, în schimb s-au dezvoltat numai pe hidrolizatele cu ou.

Este interesant de menționat că din 15 tulpini, 2 au 17 treceri, 1—14, 1—13, 1—10 și 7 tulpini 9 treceri pe medii cu hidrolizate, reprezentînd intervale între 2 și 3 ani.

Merită de asemenea să fie scos în evidență faptul că mediile glicerinatate nu s-au arătat cu nimic nefavorabile pentru izolarea bacilului de tip bovin, față de medule fără glicerină.

Ceva mai mult, la cîteva tulpini izolarea pe medule cu glicerină a fost mai ușoară, colonile mai abundente, mai bine dezvoltate decît pe medule fără glicerină.

Observația demonstrează că în condițiile noastre de lucru, glicerină în proporție de 4% își pierde capacitatea de a da efectul diagnostic pentru bacilii de tip bovin.

Trebuie semnalat și că unele din tulpini au prezentat — așa cum se înfîșlează adesea la început — o dezvoltare discretă, ca ulterior în cursul trecerilor să se adapteze și dezvoltarea să devină abundentă.

Totuși două tulpini, rămîn și astăzi cu o dezvoltare mai săracă.

În sfîrșit e interesant poate de menționat, că în cursul trecerilor, din tulpinile izolate nu s-a pierdut decît una singură, la a treia trecere.

IV. Au putut fi de asemenea izolate cu foarte mare ușurință 5 tulpini de tip aviar, care s-au dezvoltat egal pe toate variantele întrebunțate, ca și pe Löwenstein-Jensen.

O tulpină de aviar a fost trecută pînă în prezent de 14 ori, alta de 13 ori, restul de 12 ori, reprezentînd un interval de peste 2 ani.

V. Morfologia germinilor în cultură, indiferent de tip, nu este deosebită de aceea prezentată pe medule uzuale.

VI. Aspectul colonilor, după dezvoltarea lor deplină, constituie un punct particular, al dezvoltării b. tuberculoși pe medule cu hidrolizate.

Tulpinile de tip aviar își păstrează aspectul strălucitor, gras, caracteristic, dar eu-rind, colonile izolate sau pătura confluentă, sau o nuanță cenușie.

Tulpinile de tip aviar pot fi diferențiate cu ușurință de la început de cele de tip uman și bovin, ca și pe medule uzuale pentru b. tuberculoși.

În schimb aspectul colonilor de b. tuberculoși de tip uman și bovin nu este complet caracteristic, așa cum îl găsim de exemplu pe cartof glicerinat.

Nu se poate face o deosebire între bacilii de tip uman și bovin, sau foarte greu. De obicei colonile deplin dezvoltate au în general caracterul rugos cunoscut, uneori de colac cu o depresiune centrală netă. Ele iau apoi frecvent un aspect albicios, umed, nu însă foarte. Foarte rare ori se poate observa o culoare ușor galbuie.

Din acest punct de vedere al pigmentării, mediul nu permite — ca Löwenstein-Jensen — identificarea tulpinilor de fotocromogeni și scotocromogeni. Din cele 95 tulpini izolate, n-au putut observa decît de 3 ori și după o îndelungată păstrare (1 lună) la temperatura camerei, apariția de colonii pigmentate, în comparație cu ceea ce se observă pe Löwenstein-Jensen.

VII. Studiul patogenității tulpinilor izolate n-a putut fi făcut decît incomplet, din cauza lipsei animalelor de laborator.

După cum s-a amintit s-au inoculat la cobai 82 spute. În 17 cazuri evoluția infecției la animalele cultivate ne-a dus la concluziile de la punctul II.

Așadar calificările noastre, că tulpinile izolate sînt de tip uman, bovin, aviar, nu se

sprjină decît pe originea produsului examinat. Determinarea precisă a tipului de b. tuberculos, rămîne să fie făcută.

Nu este mai puțin adevărat că mediul poate fi preparat cu cea mai mare ușurință în orice laborator, avînd în vedere că nu necesită decît 3 ingrediente, care pot fi găsite și la un punct farmaceutic, valoarea lui fiind sensibil egală cu aceea a mediului Löwenstein-Jensen.

Din aceleași considerente, mediul este și de o ieftinătate considerabilă.

Să mai menționăm două fapte:

— Intii, pentru obținerea unor bune rezultate e necesar ca mediile să fie proaspete, nu mai vechi de 2 săptămîni.

— În al doilea rînd, hidrolizatele de mazăre s-au arătat mai favorabile decît cele de fasole în izolări, nu pentru menținerea tulpinilor.

Am rugat pe tov. C. Oprescu, șeful serviciului de tuberculoză experimentală al Institutului Cantacuzino, să controleze valoarea mediului pentru tulpini de laborator și a găsit că se suprapune pe aceea a mediului Löwenstein-Jensen.*

In concluzie:

1. Se prepară un mediu pentru izolarea și cultivarea b. tuberculos, mediu care are la bază hidrolizate vegetale (de fasole și mazăre), îmbogățit prin adăugare de gălbenuș de ou și glicerină.

2. Pentru izolarea acido-rezistenților de la bolnavii cu diagnostic clinic de tuberculoză, mediul are aproximativ aceeași valoare ca și mediul Löwenstein-Jensen.

3. Mediul s-a arătat a fi deosebit de favorabil pentru izolarea de b. tuberculoși de la bovine, permițînd cultivarea a 15 tulpini din care 14 își mențin nemodificată capacitatea de dezvoltare.

Sosit la redacție: 10 mai 1961.

Bibliografie

1. D. BEDELEANU, L. SIMPLACEANU, N. PREDĂ: Despre obținerea de medii de cultură de origine vegetală M.S.P.S., S.S.M., R.P.R. Volumul „Lucrările prezentate la Conferința Națională de Farmacie, București (1958) 659; 2. D. BEDELEANU, N. PREDĂ: Sesiunea științifică I.M.F. (1958) autoreiterate p. 28; 3. S. RAUSCHNING: Pharmazeutische Zentralhalle für Deutschland (1950) v. 89, 6, 181; 4. IONESCU-MIHAIIEȘTI, A. DIMBOVICEANU, C. C. OPRESCU, G. GANCEVICI: Buletin Științific seria Științe Medicale, tom. 6, (1954) 2, 245; 5. TOPLEY AND WILSON: Principles of Bacteriology and Immunity (1955), v. 2, 1613; 6. L. M. MODEL: Biologia i biochimia tuberculoznih mikrobakterii (1952) Moscova.