

NUEVOS ENSAYOS PARA OBTENER CULTIVOS DEL NEISSERIA GONORRHOEAE EN MEDIOS LIQUIDOS

Por NESTOR MORALES VILLAZON, RICARDO A. MARGNI y
GUILLERMO RUFF

En un estudio anterior dimos a conocer los resultados obtenidos cultivando el gonococo en medio líquido. En aquella oportunidad, y sobre la base de numerosos ensayos afirmamos que era posible tener cosechas abundantes, sin correr los riesgos e inconvenientes con los cuales se tropieza siguiendo los métodos consagrados.

El medio utilizado fué el de Huntoon, cuya fórmula se dió entonces. Afirmamos también que estaba casi totalmente desprovisto de albúmina animal, considerada por los antiguos observadores como indispensable para el cultivo del Gono, con fines de técnica, convenía resolver este punto sin lugar a dudas, se procedió como sigue:

Determinación cualitativa. — De acuerdo a la técnica de Osgood y Haskin, se añade al líquido problema la mitad de su volumen de solución saturada de cloruro de sodio. Calentar lentamente y verter cuatro o cinco gotas de ácido acético glacial. La intensidad de la turbidez que se produce, muestra el mayor o menor contenido del líquido en albúmina. En el medio de Huntoon apenas se pudieron descubrir vestigios.

Determinación cuantitativa. — Para tener una valoración exacta seguimos la técnica de Kingsbury y colaboradores (Kinsbury F. B., Clark C. P., Williams G., Post A. L., Jour Lab and Clinic. Med. 11.981-1926), y se obtuvieron los siguientes resultados:

Valoración de albúminas en el agar ascitis al 5 %	250 a 300 mlgrs. %
„ del medio líquido para gono	5 „ %

Es decir, una proporción prácticamente despreciable, lo que nos permite asegurar que el valor nutritivo del medio, no reside en su contenido en sustancias albuminosas. Tres cepas diferentes de Neisseria Gonorrhoeae, se cultivaron en el medio de Huntoon, las que después de 96 horas

en la estufa a 37°C dieron por término medio una riqueza bacteriana de 3.000 millones por c. c. Este resultado se le podía calificar de satisfactorio, pero quisimos ver si no era posible mejorarlo, pues abrigábamos la confianza de que añadiendo el caldo básico las sustancias conocidas como activadoras, que hoy gozan de indudable prestigio, sería posible obtener un título más elevado.

Con este fin se prepararon 12 fórmulas distintas, que se dan a conocer a continuación, y para no repetir la lista de los activadores utilizados, los mencionamos de inmediato, de suerte que posteriormente, cuando de ellos se trate, sólo diremos mejorador Nº 2 y Nº 3.

Fórmula del mejorador Nº 2. — Alanina, 0,115 grs. Acido nicotínico, 0,115 grs. Acido pimélico, 0,0075 grs. Sulfato de magnesia (con 7 moléculas de agua), 22,5 grs. Sulfato de cobre (con 5 moléculas de agua), 5 cc de una solución al 1 %. Sulfato de zinc (con 7 moléculas de agua), 4 cc de una solución al 1 %. Cloruro de magnesio (con 4 moléculas de agua), 4 cc de una solución al 1 %. Acido clorhídrico concentrado, 3 cc. Llevar todo a 100 cc con agua destilada.

Fórmula del mejorador Nº 3. — L cistina, 20 grs. Acido clorhídrico concentrado, 20 cc. Agua destilada hasta 100 cc. Las fórmulas ensayadas han sido las siguientes:

(¹) Medio original; (²) Medio original 250 cc. Hidrolizado de caseína 12,5. Mejorador Nº 2, 0,30. Mejorador Nº 3, 0,25; (³) Medio original 250 cc. Digestión triptica de caseína 12,5. Mejorador Nº 2, 0,30. Mejorador Nº 3, 0,25; (⁴) Medio original 250 cc. Hidrolizado de caseína 12,5. Mejorador Nº 2, 0,3; (⁵) Medio original 250 cc. Hidrolizado de caseína 12,5. Mejorador Nº 3, 0,25. (⁶) Medio original 250 cc. Mejorador Nº 2, 0,3. Mejorador Nº 3, 0,25. (⁷) Medio original 250 cc. Digestión triptica de caseína 12,5. Mejorador Nº 2, 0,3. (⁸) Medio original 250 cc. Digestión triptica de caseína, 12,5. Mejorador Nº 3, 0,25; (⁹) Medio original 250 cc. Hidrolizado de caseína 12,5; (¹⁰) Medio original 250 cc. Digestión triptica de caseína 12,5; (¹¹) Medio original 250 cc. Mejorador Nº 2, 0,3; (¹²) Medio original 250 cc. Mejorador Nº 3, 0,25. Todas las fórmulas al pH 8.

GRAFICO N° 2

Cepa de Neisseria gonorrhoeae N° 2

La siembra original se efectuó el 28 de Julio de 1949.

D í a s	29 - VII - 49	31 - VII - 49	2 - VIII - 49
Medio de cultivo	E. P. S. C.	E. P. S. C.	E. P. S. C.
N.º 1	± — — —	+ + + 2.000	+ + + 3.000
N.º 2	± — — —	+ + + 2.500	+ + + 3.000
N.º 3	± — — —	+ + + 3.000	+ + + 4.000
N.º 4	+ — — —	+ + ± 2.500	+ + ± 3.000
N.º 5	± — — —	+ + + 2.500	+ + ± 3.000
N.º 6	± — — —	+ ± ± 1.500	+ + + 3.000
N.º 7	+ — — —	+ ± ± 3.500	+ + ± 4.000
N.º 8	+ — — —	+ + + 3.000	+ + + 4.000
N.º 9	± — — —	+ + + 2.000	+ + + 2.500
N.º 10	+ — — —	+ + + 3.500	+ + + 4.000
N.º 11	± — — —	± — — 1.000	+ + + 3.000
N.º 12	± — — —	+ + + 1.500	+ + ± 3.000

E: enturbiamiento.

P: película.

S: sedimento.

C: cantidad de bacterias, en mil de millón por ml.

+, ±: grados de intensidad.

—: ausencia.

GRAFICO N° 1

Cuadro que resume la composición de los medios antes mencionados.

MEDIOS DE CULTIVO	Me d i o	Hidrolizado	Mejorador	Mejorador	Digestión
	o r i g i n a l	de caseína	Nº 2	Nº 3	t r í p t i c a de caseína
	ml.	ml.	ml.	ml.	m
Fórmula N.º 1	250	—	—	—	—
Fórmula N.º 2	250	12,5	0,30	0,25	—
Fórmula N.º 3	250	—	0,30	0,25	12,5
Fórmula N.º 4	250	12,5	0,30	—	—
Fórmula N.º 5	250	12,5	—	0,25	—
Fórmula N.º 6	250	—	0,30	0,25	—
Fórmula N.º 7	250	—	0,30	—	12,5
Fórmula N.º 8	250	—	—	0,25	12,5
Fórmula N.º 9	250	12,5	—	—	—
Fórmula N.º 10	250	—	—	—	12,5
Fórmula N.º 10	250	—	—	—	12,5
Fórmula N.º 11	250	—	0,30	—	—
Fórmula N.º 12	250	—	—	0,25	—

Todas las fórmulas a pH : 8

El 28 de julio del año en curso se hizo la primera experiencia. Tubos conteniendo 10 cc de las diferentes fórmulas se sembraron por duplicado a las 15 horas, con 4 gotas de cultivo de 48 horas en medio líquido; de la cepa N° 2. El cuadro N° 2 resume los resultados.

Con el fin de saber si los cultivos procedentes de agar ascitis daban resultados comparables se procedió como sigue: Cultivos de las cepas 2 y 4, en agar ascitis de 48 horas, se suspendieron en 10 centímetros cúbicos del medio original y se sembraron 8 gotas por tubo.

El recuento del número de gérmenes sembrados por tubo, demostró que cada uno de ellos había recibido poco más o menos 5.600. Para ambas cepas el resultado fué absolutamente igual y se resume como sigue: a las 24 horas no se observa cultivo en ninguno de los medios, y a las 48 horas, como se detalla en el cuadro N° 3.

GRAFICO N° 3

Cepas de *Neisseria gonorrhoeae* N° 2 y N° 4
La siembra original se efectuó el 28 de julio de 1949.

D í a s	29 - VII - 49	31 - VII - 49	2 - VIII - 49
Medio de cultivo	E. P. S. C.	E. P. S. C.	E. P. S. C.
N.º 1	— — — —	+ + + 1.000	+ + + 2.500
N.º 2	— — — —	+ + + 1.500	+ + + 2.500
N.º 3	— — — —	± — — 2.000	+ + + 3.000
N.º 4	— — — —	+ + + 2.000	+ + ± 2.500
N.º 5	— — — —	+ + + 3.000	+ + ± 3.500
N.º 6	— — — —	± — — 1.500	+ + + 2.500
N.º 7	— — — —	+ + + 1.500	+ + ± 3.000
N.º 8	— — — —	+ + + 2.500	+ + + 3.000
N.º 9	— — — —	+ + + 2.000	+ + + 2.500
N.º 10	— — — —	+ + + 3.000	+ + + 3.500
N.º 11	— — — —	± — — 1.000	+ + + 2.000
N.º 12	— — — —	± — — 1.500	+ + ± 2.500

NOTA: Las abreviaturas corresponden a las del cuadro N° 2.

La densidad máxima en gérmenes no alcanzó a 3.000 millones por cc. Examinando los dos cuadros que antece-

den, lo primero que salta a la vista es que las siembras procedentes de medio líquido a otro igual, especialmente en las fórmulas III, VII, VIII y X, dan desarrollo a las 24 horas, mientras que las de agar ascitis a medio líquido permanecen sin modificación apreciable. En segundo término, los medios antes mencionados son los que dan mejor resultado, mientras que las II, IV, V y IX son de menos valor.

Como los caldos conteniendo digestión triptica de caseína, son aquellos en los que el cultivo es más rico y los con hidrolizado de caseína los más pobres, fluye la conclusión de que aquel factor, más que los mejoradores, es el que acrecienta el valor nutritivo del medio.

En el cuadro N° 2 se puede apreciar la escala en la cual los medios III, VII, VIII y X aumentan la riqueza del cultivo. Se puede comprobar que a las 48 horas se enturbien y a las 72 horas presentan sedimento y película fina; la riqueza bacteriana oscila entre 1.500 y 3.000 millones. A los cinco días los caldos estaban claros, la película es bastante gruesa y el sedimento abundante, y en la mayor parte de ellos, el título se elevó a 4.000 millones. Pasado este plazo, el título empieza a decrecer, lo cual se explica por la lisis de los gérmenes.

CONCLUSIONES

1° Los medios líquidos conteniendo hidrolizado de caseína, dan cultivos menos abundantes que los que contienen digestión triptica de la misma.

2° La riqueza aumenta hasta los cinco días y luego tiende a disminuir rápidamente.

Consulte:

BIBLIOGRAFÍA

MORALES VILLAZÓN N., MARGNI R. A. Y BELLIDO J.: "Vitalidad del *Neisseria Gonorrhoeae* en medio líquido"; Revista del Instituto Bacteriológico Malbrán. 1949. En prensa.