

MINISTERIO DEL INTERIOR
DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

REVISTA
DEL
INSTITUTO BACTERIOLOGICO
"DR. CARLOS G. MALBRAN"

El cultivo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae*,
Inada e Ido, 1915.

- I. - CONDICIONES Y FACTORES QUE RIGEN SU DESARROLLO *IN VITRO*.
METODO PARA LA CUENTA DE LEPTOSPIRAS.
- II. - NUEVO MEDIO DE CULTIVO.

Por ENRIQUE SAVINO y EDUARDO RENNELLA

En este trabajo consideramos algunas características físicas y químicas que condicionan el cultivo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* y la acción de varias sustancias sobre su crecimiento *in vitro*. Para poder apreciar comparativamente el desarrollo de la leptospira en los diversos ensayos realizados, hemos recurrido a la cuenta de estos microorganismos mediante un método fundado en los mismos principios de la hematimetría. Los resultados conseguidos nos han permitido concretar un nuevo medio nutritivo que, en nuestra opinión, es óptimo para el cultivo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

ANTECEDENTES

En la literatura microbiológica están descrito diferentes medios nutritivos para el cultivo de la *L. icterohaemorrhagiae*.

Inada, Ido, Hoki, Kaneko e Ito (1916), emplearon líquido ascético adicionado de trocitos de riñón.

Noguchi (1917), aconsejó el siguiente medio de cultivo: suero sanguíneo de conejo: 1 p.; solución salina de Ringer: 3 p.; plasma citratado de conejo: 0.5 p.

Vervoort (1923), preparó una solución de peptona (0,1 %) y cloruro de sodio (0,05 %) en agua corriente, que llevó a pH 7.2 mediante adición de una solución de fosfatos. Después agregó suero inactivado de conejo (10 %) y sangre de conejo (1 gota por ml.). Sin embargo, este autor sostiene que la sangre de conejo no es indispensable para el desarrollo de la leptospira.

Noguchi y Lindenberg (1925), sostienen que los sueros de conejo y de oveja son los mejores favorecedores del cultivo de la *L. icterohaemorrhagiae*, sobre todo si al medio se añade agar en la concentración del 0.1 al 0.3 %. Noguchi recomienda usar: cloruro de sodio al 0.9 % (800 partes), suero de conejo (100 p.), solución de hemoglobina (10-20 p.), agar nutritivo al 2 %, pH 7.2 (100 p.). El agar nutritivo una vez fundido se deja enfriar hasta los 45°C., momento en que se le agrega rápidamente la solución salina, mantenida a la misma temperatura. Después agrega el suero y la hemoglobina de conejo. Prepara la solución de hemoglobina mezclando una parte de sangre defibrinada de conejo y tres partes de agua destilada.

Wenyon (1926), propone el medio nutritivo siguiente: solución de cloruro de sodio al 0.85 % (270 ml.) y agar nutritivo al 2.5 %, pH 7.5 (30 ml.). A la solución caliente de cloruro de sodio agrega el agar nutritivo. Distribuye la dilución de agar en tubos de ensayos (9.4 ml. en cada uno). Enfría hasta 50°C., y a esta temperatura deja caer en cada tubo XV gotas de sangre de conejo, dejando que la sangre se difunda a través del agar.

Fletcher (1928), diluye el suero sanguíneo de conejo en agua destilada (12 %) y calienta a 50°C. A cada 100 ml. de dicha solución le agrega 6 ml. de agar nutritivo (2 %), lo lleva a pH 7.4 y distribuye el medio nutritivo en tubos de ensayos. Finalmente calienta el medio de cultivo a 56°C., 1 hora durante 2 días sucesivos.

Smith y Tulloch (1937), toman 1500 ml. de agua destilada y le agregan 1.5 grs. de peptona Witte. Hierven la mezcla y después le añaden 300 ml. de solución salina de Ringer. Luego le agregan 150 ml. de la solución de fosfato de Sörensen (72 ml. de PO_4HNa_2 , M/15 para 100 ml. de PO_4KH_2 , M/15) pH 7.2. El líquido lo llevan a ebullición hasta tener una precipitación completa. Enfrían en heladera, separan el precipitado por filtración a través de papel y rectifican el pH. Luego distribuyen el líquido obtenido, en pequeños tubos de ensayos colocando 3 ml. en cada uno y lo esteri-

lizan por calentamiento a 115°C. durante 20 minutos. Finalmente, le agregan 0.3 ml. de suero fresco de conejo estéril y calientan el medio nutritivo a 56°C. 30 minutos con objeto de inactivar el suero.

I. CONDICIONES Y FACTORES QUE RIGEN EL DESARROLLO DE LA *Leptospira icterohaemorrhagiae* in vitro. - MÉTODO PARA LA CUENTA DE LEPTOSPIRAS.

MATERIAL. En nuestros ensayos hemos utilizado las cepas de leptospiras siguientes: RGA, Lisboa, STIV y China enviadas desde Berlín por el Ministerio de Higiene; la cepa Montevideo, aislada en la ciudad del mismo nombre; y las cepas 189, 462, 467, 161, 192, MA y R₁. Las cepas nombradas en tercer término, a diferencia de las primeras, eran virulentas para el cavia, fueron aisladas (Sección Peste) de ratas grises, en su mayor parte obtenidas por el Dr. N. Morales Villazón y conservadas por transplantes en el medio de Wenyon.

TÉCNICA GENERAL. — 1. *Cuenta de leptospiras.* — Con este objeto hemos desarmado una cámara de Thomas Zeiss para cuenta de glóbulos sanguíneos y la hemos reconstruido sobre un cubre-objeto de 0.35 mm. de espesor. Para ello hemos pegado, sobre dicho cubre-objeto, el disco que lleva el retículo y la lámina cuadrada que lo rodea, utilizando Bálsamo de Canadá. Luego, con un compás de espesor determinábamos la profundidad de la cámara.

Para la observación de las leptospiras hemos empleado un microscopio binocular Zeiss, condensador cardiode, objetivo 40 y ocular 10 x. Con el objeto de contar las leptospiras hemos colocado en el interior de ambos oculares un diafragma (una lámina delgada de hierro galvanizado, pintada de negro y con una abertura cuadrangular en su parte media de 5.5 mm. de lado). De esta manera sólo es posible la visión conjunta de cuatro pequeños cuadrados de la cámara o sea 1/100 mm².

Para realizar la cuenta de leptospiras colocamos sobre el disco situado en centro de la cámara, una gota del cultivo (o una dilución del mismo en solución fisiológica, si su número fuera grande) y contamos el número de leptospiras contenidas en 1/100 mm². (o sea en el espacio delimitado por el diafragma ocular); teniendo la precaución de recorrer con el tornillo micrométrico toda la altura de la cámara (1/10 mm.), porque las leptospiras son muy tenues, no sedimentan y permanecen en suspensión en toda la altura de la cámara.

Así en esta forma realizamos la cuenta en 10 volúmenes, cuyas dimensiones hemos citado en el párrafo anterior y con este procedimiento tenemos el número de leptospiras contenidas en 1/100 mm³. Conociendo la dilución del cultivo, con un sencillo cálculo es fácil saber cuantas leptospiras están contenidas en 1 ml. de cultivo.

2. *Medio nutritivo básico*. — El medio de cultivo que nos sirvió de base para nuestros ensayos lo hemos preparado en la forma siguiente: en 20 ml. de agua destilada disolvemos PO₄HK₂: 2 grs.; ClNa: 3 grs.; SO₄Mg: 0.05 grs.; Cl₂Ca: 0.01 grs., agregando una cantidad tal de HCl que cuando esta solución de sales minerales es diluída 1/50 en agua destilada, su pH sea 7.1 - 7.2.

Los 20 ml. de la solución salina, preparada en la forma indicada anteriormente, la distribuimos en ampollas, que cerramos a la llama y la esterilizamos por calentamiento, en agua en ebullición, durante 20 minutos.

Por otra parte tomamos frascos de Erlenmeyer «Pyrex» de 500 ml. de capacidad, colocamos 175 ml. de agua destilada y lo esterilizamos a 115°C., 30 minutos. Luego, a estos frascos que contienen agua destilada estéril, le añadimos 1 ml. de sangre defibrinada de conejo, estéril, agitamos suavemente hasta hemolizar los glóbulos sanguíneos; y finalmente le agregamos 4 ml. de la solución salina, arriba citada y 20 ml. de suero de oveja esterilizado por filtración (bujía Chamberland L₃).

Siguiendo este procedimiento tenemos el medio de cultivo básico, que fraccionamos, estérilmente, a razón de 10 ml. por cada tubo de ensayo.

La siembra de las leptospiras la hemos realizado tomando 0.1 ml. de cultivo de 5 días de incubación a 29-30°C.

TÉCNICA ESPECIAL. — *Preparación de hematina, autolizado de levadura e hidrolizado de caseína*. 1. *Hematina*. — Esta sustancia fué gentilmente preparada para nosotros por el Dr. Rafael A. Labriola, siguiendo el método de Nencki y Zaleski (1900), citado por Gattermann (1936). El procedimiento de obtención consiste en colocar en un balón de 4 litros de capacidad, 3 litros de ácido acético glacial que contiene 5 ml. de solución saturada de ClNa y calentada a 100°C., en baño de arena o de vapor de agua sobrecalentado. Teniendo la precaución de mantener dicha temperatura se hace caer, sobre el ácido acético, gota a gota 1 litro de sangre defibrinada de bovino, que previamente ha sido filtrada por una tela de hilo. La sangre defibrinada de bovino debe caer en 20-30 minutos y la temperatura no debe bajar de 90°C. Luego el líquido se mantiene en

ebullición 30 minutos y llevado entonces a 40-50°C., para separar los cristales de hemina. El precipitado obtenido es separado por centrifugación y lavado, sucesivamente, con ácido acético 50 %, agua, alcohol y éter.

2. *Autolizado de levadura.* — Fué preparado siguiendo el método de Grassmann y Haag (1927), que consiste en autolizar la levadura con acetato de etilo, propiedad que fué utilizada por Weizmann y Rosenfeld (1937), en la obtención del autolizado de levadura. Para ello a 1 kilo de levadura de cerveza agregamos 100 ml. de acetato de etilo y agitamos, con una espátula de vidrio, algunos minutos hasta que la levadura esté completamente licuada y se tenga una plasmolisis de la levadura. Entonces le agregamos una solución al 10 % de PO_4HNa_2 hasta llevarlo a pH 6.8-7.0. Lo dejamos 2 horas a temperatura ambiente, rectificamos el pH, le agregamos 100 ml. de toluol y en un frasco bien tapado lo llevamos a la estufa a 37°C. Al día siguiente, le agregamos al líquido, una determinada cantidad de la solución de fosfatos, hasta llevarlo nuevamente a pH 6.8-7.0 y lo llevamos nuevamente a la estufa por otras 48 horas. Luego el autolizado de levadura lo dializamos en tubos de papel de celofán, empleando en el líquido exterior 4 litros de agua destilada que contiene 150 ml. de xilol y 150 ml. de cloroformo. Después de 24 horas de diálisis a temperatura ambiente, recogemos el líquido de diálisis y colocamos otros 4 litros de agua con xilol y cloroformo. Esta operación la repetimos en total 3 veces y los líquidos de diálisis lo concentramos al vacío hasta que aparezca en él un enturbiamiento (más o menos 600 ml.). Finalmente, el líquido así obtenido lo dejamos 2 días en cámara fría para facilitar la formación de un precipitado amorfo que separamos por centrifugación o por filtración.

Siguiendo el procedimiento, arriba citado, nosotros hemos obtenido un líquido (autolizado de levadura) de color amarillo rojizo, con un 23 % de residuo seco, 2.5 % de nitrógeno y 0.1 % de ClNa.

3. *Hidrolizado de caseína.* — Fué preparado por el Dr. A. Sordelli y el Sr. J. P. Ferrari, quienes gentilmente nos facilitaron dicho hidrolizado. Para su preparación siguieron, los autores citados, el método de M. Mueller y Miller (1941); era un líquido de color amarillento, con un precipitado que se disolvía por calentamiento; tenía 1.86 % de ClNa y 1.44 % de nitrógeno.

RESULTADOS. — Los ensayos efectuados para establecer las condiciones y factores que rigen el desarrollo *in vitro* de la *L. icterohaemorrhagiae*, se refieren particularmente a: 1. Influencia del pH. 2. Influencia de la presión osmótica. 3. Influencia del suero de oveja. 4. Influencia de la sangre de oveja. 5. Influencia de los glóbulos sanguíneos hemolizados de conejo y del suero de oveja. 6. La hematina, factor del crecimiento de la *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Acción activadora del autolizado de levadura y del hidrolizado de caseína. 7. Acción de las sustancias activadoras en el medio nutritivo básico con suero de oveja y sangre hemolizada de conejo.

1. *Influencia del pH en el desarrollo de la leptospira.* — Para estudiar la influencia del pH preparamos los siguientes medios de cultivo: a 10 frascos de Erlenmeyer, que contenían, cada uno, 75 ml. de agua destilada esterilizada, en autoclave a 115°C., 15 minutos, le agregamos 0.5 ml. de sangre defibrinada de conejo y una vez hemolizada le adicionamos a cada uno de los frascos la siguiente mezcla salina, disuelta en 10 ml. de agua destilada, y esterilizada por calentamiento a 115°C. durante 15 minutos. (Véase la Tabla 1).

TABLA 1

Número del frasco	PO ₄ H ₂ K	ClNa	NaOH (20%)
1	0,2 grs.	0,2 grs.	0.01 ml.
2	»	»	0.05 »
3	»	»	0,15 »
4	»	»	0.20 »
5	»	»	0.25 »
6	»	»	0.27 »
7	»	»	0.28 »
8	»	»	0.29 »
9	»	»	0.30 »
10	»	»	0.32 »

Finalmente, a cada frasco le agregamos 10 ml. de suero de oveja, esterilizado por filtración (bujía Chamberland L₃) y con agua destilada estéril completamos hasta un volumen de 100 ml. Una vez preparados los medios de cultivo, lo fraccionamos en tubos de ensayos estériles; en cada caso determinamos el pH con el potenciómetro a electrodos de vidrio de Beckmann y sembramos 0.05 ml. de un cultivo de leptospiras desarrolladas en el medio nutritivo básico de 6 días de incubación y que tenía alrededor de 30.10⁶ leptospiras por ml.

En la Tabla 2 tenemos el desarrollo obtenido en los medios de cultivo, a distinto pH y a diferentes días de incubación a 30°C.

TABLA 2

Número del cultivo	pH	Número de leptospiras por ml.		
		2º día	4º día	6º día
1	6.30	1.1.10 ⁶	5.10 ⁶	9.10 ⁶
2	6.60	1.8. »	12. »	22. »
3	7.10	2.8. »	20. »	30. »
4	7.20	2.0. »	19. »	21. »
5	7.30	2.0. »	11. »	12. »
6	7.60	1.0. »	10. »	12. »
7	7.80	1.0. »	7. »	10. »
8	8.30	0.8. »	2. »	2. »
9	8.50	0.6. »	2. »	2. »
10	8.80	0.3. »	1. »	1. »

De la tabla anterior deducimos que *el pH óptimo para el desarrollo de las leptospiras es 7.1*. Nosotros hemos repetido varias veces el experimento anterior y en todos los casos hemos encontrado que el mejor crecimiento de estos microorganismos se tenía a un pH 7.0-7.1.

2. *Influencia de la presión osmótica en el desarrollo de las leptospiras.*— Para estudiar la importancia de la presión osmótica

TABLA 3

Medio nutritivo	Fosfatos (*)	ClNa 20 %	HCl 1 %	pH	t	Presión osmótica Atms.	Leptospiras por ml 6º día
1	1 ml.	5 ml.	—	7.00	0º 72	8.69	0
2	1 »	2 »	—	7.05	0º 37	4.46	5.10 ⁶
3	1 »	1 »	—	7.10	0º 30	3.62	25. »
4	1 »	—	0.2 ml.	7.10	0º 14	1.69	32. »
5	0.5 »	—	0.4 »	7.20	0º 12	1.45	22. »
6	0.2 »	—	0.8 »	7.15	0º 07	0.84	16. »
7	0.1 »	—	0.8 »	7.15	0º 05	0.83	12. »

(*) La solución de fosfatos era la siguiente: PO₄H₂K: 10 grs.; NaOH, 20 %: 8.5 ml.; agua destilada: 50 ml.

en el crecimiento de las leptospiras realizamos el siguiente ensayo: tomamos 7 frascos de Erlenmeyer, a cada uno le agregamos 75 ml. de agua destilada que esterilizamos por calentamiento a 115°C.

durante 15 minutos y luego le añadimos 0.5 ml. de sangre defibrinada de conejo; hemolizado los glóbulos sanguíneos le agregamos 10 ml. de suero de oveja estéril. Finalmente, a cada frasco le adicionamos la solución de fosfatos, de ClNa al 20 % y de HCl al 1 % (en las cantidades indicadas en la Tabla 3); luego completamos, con agua destilada estéril, a un volumen de 100 ml. Los medios de cultivos, preparados en la forma arriba indicada, lo fraccionamos en tubos de ensayos, determinando para cada caso el pH y el descenso crioscópico. Cada tubo, con 10 ml. de medio nutritivo, fué sembrado con 0.05 ml. de un cultivo de leptospiras de 5 días de desarrollo y que tenía aproximadamente 30.10^6 microorganismos por ml.

El experimento indicado en la Tabla 3 fué repetido varias veces y de los resultados obtenidos nosotros hemos llegado a la conclusión que la presión osmótica más favorable, para el desarrollo de las leptospiras, está comprendida entre 3.62 y 1.45 atms.

3. *Influencia del suero de oveja.* — En esta serie de ensayos hemos utilizado el medio nutritivo básico, descrito en el párrafo 2, con la diferencia que hemos variado la cantidad de suero de oveja. En 10 ml. de medio nutritivo hemos sembrado 0.05 ml. de un desarrollo de leptospiras de 5 días de incubación y que tenía una concentración de 30.10^6 microorganismos por ml.

TABLA 4

Medio nutritivo	Suero de oveja	Leptospiras por ml 10° día
1	30 %	0
2	20 »	$6.4.10^6$
3	10 »	13.8. »
4	5 »	7.0. »
5	0 »	0.2. »

Los resultados obtenidos están en la Tabla 4. Este mismo experimento fué realizado repetidas veces y en todos los casos el mejor crecimiento de las leptospiras correspondió a la concentración del 10 % del suero de oveja.

4. *Influencia de la sangre hemolizada de conejo.* — En estos ensayos hemos utilizado el medio nutritivo básico, con el 10 % de suero de oveja y con cantidades variables de sangre hemolizada de conejo. Los resultados obtenidos están en la Tabla 5.

Los experimentos realizados demostraron que utilizando el medio nutritivo básico con el 10 % de suero de oveja y cantidades varia-

TABLA 5

Medio nutritivo	Sangre hemolizada de conejo	Leptospiras por ml 10° día
1	40 %	0
2	20 »	64.10 ⁶
3	10 »	105. »
4	4 »	58. »
5	2 »	25. »
6	1 »	24. »
7	0 »	20. »

bles de sangre hemolizada de conejo, el cultivo de la leptospira es más abundante cuando se emplea la sangre hemolizada de conejo en la concentración del 10 %.

5. *Influencia de los glóbulos hemolizados de conejo y del suero de conejo.* — En este ensayo, al igual que en los anteriores, hemos empleado el medio nutritivo básico con el 10 % de suero de oveja y cantidades variables de glóbulos sanguíneos hemolizados de conejo, los que previamente habían sido repetidas veces lavados con una solución de ClNa al 0.85 %. Los resultados demostraron que el desarrollo de la leptospira era mayor cuando al medio nutritivo básico agregamos 10 % de glóbulos hemolizados de conejo.

Iguales resultados obtuvimos cuando en lugar de glóbulos sanguíneos hemolizados de conejo, empleamos el suero sanguíneo de este mismo animal. El mayor crecimiento correspondió al 10 % del suero sanguíneo de conejo.

6. *La hematina, factor de crecimiento de las leptospiras. Acción activadora del autolizado de levadura y del hidrolizado de caseína.* — Con esta finalidad hemos realizado una serie de experimentos con el objeto de determinar la acción de estas sustancias en el desarrollo de las leptospiras y la concentración en que mejor se manifiesta su acción.

Para ello utilizamos, como siempre, el medio nutritivo básico ya descrito, con el 10 % de suero de oveja y sin el agregado de sangre hemolizada de conejo. Luego agregamos los activadores en diferentes concentraciones y 10 ml. del medio nutritivo fué sembrado con 0.1 ml. de un cultivo de 5 días que tenía 4.10⁶ leptospiras por ml.

En la Tabla 6 tenemos el resultado de estos ensayos.

La Tabla 6 nos indica que el autolizado de levadura, el hidrolizado de caseína y la hematina activan el desarrollo de la leptospira. Las concentraciones más favorables corresponden al 0.1 % para el autolizado de levadura, 0.5 % para el hidrolizado de caseína y al 0.005 % para la hematina.

TABLA 6

Medio nutritivo	Activador	Concentración del activador	Número de leptospiras por ml 9° día
1	A. de L.	1 %	62.10 ⁶
2	»	0.2 »	102. »
3	»	0.1 »	130. »
4	»	0.05 »	80. »
5	»	0.02 »	32. »
6	H. de C.	2 »	72. »
7	»	1 »	128. »
8	»	0.5 »	132. »
9	»	0.2 »	126. »
10	»	0.1 »	116. »
11	Hematina *	0.02 »	32. »
12	»	0.01 »	36. »
13	»	0.005 »	58. »
14	»	0.002 »	26. »
15	»	0.001 »	20. »
16	—	—	20. »

(*) La hematina se agregó al medio nutritivo en solución al 1 %, pH 8.6.

Es importante hacer notar que una serie de experimentos realizados por nosotros demostraron que la hematina es un factor de crecimiento para la *Leptospira icterohaemorrhagiae*. En este trabajo sólo vamos a consignar el resultado obtenido empleando el medio nutritivo básico con el 10 % de suero sanguíneo de conejo (sin agregado alguno de suero de oveja al medio nutritivo). Este medio nutritivo estaba caracterizado por no poseer hemoglobina (la reacción de la benzidina fué negativa). Le agregamos los activadores en las concentraciones más favorables para el desarrollo de la leptospira y 10 ml. del medio nutritivo fueron sembrados con 0.05 ml. de un cultivo de leptospiras que tenía una concentración de 0.4.10⁶ microorganismos por ml. Este desarrollo provenía de un medio nutritivo, sin hemoglobina, que tenía 0.005 % de hematina.

Iguales características tenía el cultivo de leptospiras que utilizamos para la siembra en el experimento de la Tabla 6.

El resultado de estos ensayos está indicado en la Tabla 7. De su análisis deducimos que la hematina es un factor de crecimiento para la *Leptospira icterohaemorrhagiae*; en cambio, el hidrolizado de caseína y el autolizado de levadura son activadores del crecimiento de las leptospiras.

TABLA 7

Medio nutritivo	Activadores	Leptospiras por ml 11º día
1	—	0
2	A. de L.	0
3	H. de C.	0
4	Hem.	43.10 ⁶
5	A. de L., H. de C.	0
6	A. de L., Hem.	68.10 ⁶
7	H. de C., Hem.	89.10 ⁶
8	A. de L., H. de C., y Hem.	157.10 ⁶

También hemos realizado una serie de experimentos en los cuales el medio básico nutritivo tenía el 10 % de suero de oveja, más todas las combinaciones posibles de la hematina con las sustancias activadoras. En estos casos como el suero de oveja tenía hemoglobina la hematina se comportó como un activador y no apareció como factor de crecimiento.

7. *Acción de la hematina y de las sustancias activadoras en el medio nutritivo básico con suero sanguíneo de oveja y sangre hemolizada de conejo.* — En este ensayo hemos empleado la hematina, el autolizado de levadura y el hidrolizado de caseína en las concentraciones más favorables para el crecimiento de las leptospiras. En cambio, la concentración de la sangre hemolizada de conejo y del suero sanguíneo de oveja varió del 1 al 10 %. Sin embargo, en la Tabla 8 sólo hemos consignado los valores del 5 y del 10 % por corresponder a estas dos concentraciones los resultados de mayor interés. En este caso 10 ml. de medio nutritivo fué sembrado con 0.2.10⁶ leptospiras.

El examen de la Tabla 8 es muy ilustrativo porque demuestra que la hematina, el autolizado de levadura y el hidrolizado de caseína aumentan el desarrollo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae*, en presencia de suero sanguíneo de oveja o de sangre hemolizada de

conejo. Además, la Tabla 8, al igual que la Tabla 5, muestra que la sangre hemolizada de conejo activa el crecimiento de la leptospira.

TABLA 8

Medio nutritivo	Sangre hemolizada conejo	Suero de oveja	Activadores	Número de leptospiras por ml 10º día
1	10 %	5 %	Hem., A. L., H. C.	260.16*
2	5 »	5 »	» » » » »	166. »
3	10 »	5 »	—	168. »
4	5 »	5 »	—	82. »
5	—	5 »	Hem., A. L., H. C.	48. »
6	—	5 »	—	18. »
7	10 »	10 »	Hem., A. L., H. C.	232. »
8	10 »	10 »	—	150. »
9	—	10 »	Hem., A. L., H. C.	124. »
10	—	10 »	—	66. »

II. NUEVO MEDIO NUTRITIVO

Como resultado de nuestros experimentos sobre el desarrollo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* describimos un nuevo medio nutritivo para el cultivo de este microorganismo. Para ello empezamos por preparar el siguiente medio mineral: PO₂HK₂: 2 grs.; ClNa: 3 grs.; SO₄Mg: 0.05 grs.; Cl₂Ca: 0.01 grs.; agua destilada 1 litro. Con HCl se lleva a pH 7.1 y se esteriliza a 115°C. 15 minutos.

Al medio mineral descrito anteriormente le agregamos 10 % de suero de oveja esterilizado por filtración (bujía Chamberland L₃) y hematina, autolizado de levadura e hidrolizado de caseína en las concentraciones más favorables para el crecimiento de la leptospira.

En este medio nutritivo nosotros hemos podido cultivar cualquiera de las 12 cepas de leptospiras que teníamos a nuestro alcance y el desarrollo del cultivo alcanzó en todos los casos una concentración del mismo orden.

En el nuevo medio de cultivo, descrito por nosotros, hemos llegado a sembrar hasta 10 leptospiras, en 10 ml. del mismo, separadas por dilución de un cultivo en medio básico (ver técnica general) de 5 días de incubación y después de un mes de permanecer en estufa a 30°C. hemos tenido un desarrollo abundante.

En otra ocasión hemos tomado el riñón de una rata gris infectada espontáneamente con *Leptospira icterohaemorrhagiae*, y en el cual con el fondo oscuro pudimos apreciar la presencia de algunos de estos microorganismos. En este caso, con una pipeta

recogimos una pequeña cantidad del tejido renal y lo sembramos en el medio nutritivo arriba indicado. Al mes de incubación pudimos comprobar que con este procedimiento habíamos conseguido aislar por cultivo directo la leptospira del riñón de la rata. Este hallazgo nos induce a pensar que éste podría ser un método de diagnóstico y de aislamiento de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* de la rata gris.

El desarrollo más abundante que hemos llegado a obtener con este nuevo medio nutritivo para la *Leptospira icterohaemorrhagiae*, fué de 240.10^6 microorganismos por ml.

Al alcanzar el máximo de desarrollo la leptospira enturbia ligeramente el medio nutritivo y por agitación aparecen ondas de « moirée ». El examen con el fondo oscuro de estos desarrollos demuestra que esa turbidez es debida a la alta concentración que alcanza la leptospira en este medio nutritivo.

También debemos decir que el ClNa, el SO_4Mg y el Cl_2Ca que contiene el medio nutritivo estudiado por nosotros favorece el desarrollo de la leptospira. Eliminando estas sales del medio nutritivo, el crecimiento de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* es menor, como lo demuestra una de las experiencias realizadas por nosotros y cuyos resultados están indicados en la Tabla 9.

TABLA 9

Medio nutritivo	Sales minerales	Leptospiras por ml 10° día
1	PO_4HK_2 , ClNa, SO_4Mg y Cl_2Ca	236. 10^6
2	PO_4HK_2 y ClNa	172. »
3	PO_4HK_2	102. »

Para mayor claridad diremos que la experiencia anterior fué realizada con el medio nutritivo que hemos descrito en este mismo capítulo, es decir, además de las sales indicadas en la Tabla 9, el medio de cultivo contenía 10 % de suero sanguíneo de oveja, hematina y autolizado de levadura e hidrolizado de caseína. En 10 ml. de medio nutritivo hemos sembrado $0.5.10^6$ leptospiras y los resultados fueron registrados a los 10 días de incubación a 29-30°C.

III. CONCLUSIONES

En el presente trabajo describimos algunas de las condiciones de cultivo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* y llegamos a las siguientes conclusiones.

1. El desarrollo de la leptospira es más abundante cuando el medio nutritivo tiene un pH de 7.1 y una presión osmótica comprendida entre 1.45 y 3.62 atms.

2. El suero sanguíneo de oveja o de conejo y los glóbulos hemolizados de conejo permiten el desarrollo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

3. La hematina es un factor de crecimiento para la *Leptospira icterohaemorrhagiae*, mientras que el autolizado de levadura y el hidrolizado de caseína sólo activan el crecimiento de la misma.

4. Describimos un método para la cuenta de las leptospiaras y un nuevo medio nutritivo para el cultivo « in vitro » de las mismas.

IV. BIBLIOGRAFÍA

1. FLETCHER, W.: 1928. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.* 21: 265.
2. GRASSMANN y HAAG: 1927. *Hoppe-Seyl.* 167: 188-201.
3. GATTERMANN, L.: 1936. *Die Praxis des organischen chemikers.* Berlín, 399-401.
4. INADA, R., e IDO, Y.: 1915. *Tokyo Ijishinski.* N° 1908.
5. INADA, R., IDO, Y., HOKI, R., KANEKO, R. e ITO.: 1916. *Journ. Exp. Med.* 23: 377.
6. MUELLER, M. y MILLER, P. A.: 1941. *Journ. Imm.* 40 (1): 21-32.
7. NENCKI y ZALESKI: 1900. *Hoppe-Seyl.* 30: 390.
8. NOGUCHI, H.: 1917. *Journ. Exp. Med.* 25: 755.
9. NOGUCHI, H. y LINDENBERG, A.: 1925. *Amer. Journ. Trop. Med.* 5: 63.
10. SMITH, J. y TULLOCH, W. J.: 1937. *Lancet.* (2): 846-850.
11. VERVOORT, H.: 1923. *Geneesk. Tij. Ned. Ind.* 63: 800.
12. WEISZMANN, C. y ROSENFELD, B.: 1937. *Bioch. Journ.* 21: 619-639.
13. WENYON: 1926. *Protozoology.* Londres. Bailliére, Tindall y Cox. p. 1299.