

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

### III. - Ensayo del valor nutritivo de diversas sustancias

Por ENRIQUE SAVINO y EDUARDO RENNELLA

---

En un trabajo anterior (Savino y Rennella, 1942), hemos estudiado algunas condiciones necesarias para el cultivo de las leptospiras; luego, en prosecución de tales estudios hemos investigado la influencia de diversas sustancias en el desarrollo de estos microorganismos. En este relato no hacemos más que exponer el método utilizado y los resultados obtenidos en el cultivo de las leptospiras usando medios nutritivos de constitución química más definida.

#### I. — ANTECEDENTES.

En la literatura microbiológica se registran muy pocos datos sobre las condiciones nutritivas necesarias para el cultivo de las leptospiras. De su lectura sólo se deduce que el suero sanguíneo contiene el factor necesario para el desarrollo de estos microorganismos.

Rosenfeld (experiencias no publicadas), encuentra que el factor de crecimiento para las leptospiras, contenido en el suero sanguíneo, es de naturaleza no proteica, precipita por el alcohol y no da la reacción del biuret.

Rosenfeld y Meridian (1941), estudian el cultivo de la *Leptospira canicola* encontrando que el suero sanguíneo es un elemento indispensable para su desarrollo y que el crecimiento es estimulado por las sustancias siguientes: ácido nicotínico, tiamina, nicotinamida, riboflavina, piridoxina, y ácido ascórbico, mencionadas en orden decreciente de acuerdo a su actividad.

#### II. — MATERIAL

1. CEPAS DE LEPTOSPIRAS ESTUDIADAS. — En nuestros experimentos hemos estudiado el crecimiento de las cepas de leptospiras siguientes: RGA, ST, IV, China, Lisboa, 467, 161, 192, 462, 189, MA,

R<sub>1</sub> y Montevideo. Las cuatro primeras cepas fueron enviadas por el Ministerio de Higiene de Berlín. La cepa Montevideo fué cultivada por Fabini y Estrella (1938), del caso humano descrito por los autores citados y las cepas restantes fueron obtenidas en su mayor parte por el Dr. N. Morales Villazón, de las ratas grises que llegan a la Sección Peste.

### III. — SUSTANCIAS ENSAYADAS

Diversas sustancias fueron empleadas en el cultivo de las leptospiros y para mayor claridad las enunciaremos así:

a) *Vitaminas y cuerpos de acción similar*: ácido nicotínico, tiamina, nicotinamida, riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina y ácido pantoténico.

b) *Aminoácidos*: l. asparagina, l. cistina, l. cisteína, d.l. valina, l. tirosina, l. triptofano, d.l. methionina, d.l. leucina, β alanina, l. α alanina, d.l. alanina, d. ornitina, glicocola, glutiatone, ácido aspártico y ácido glutámico.

c) *Hidratos de carbono*: sacarosa, glucosa, manita, ramnosa, inulina, dextrina, eritrita, inosita, xilosa, lactosa, glucógeno, maltosa, arabinosa, galactosa, salicina, almidón, celobiosa, rafinosa, sorbita, manosa, adonita, trealosa y arabita.

d) *Otras sustancias orgánicas*: colessterina, ácido pimélico, lactato de amonio y glicerina. Las sales sódicas de los ácidos lácticos, tártrico, tartrónico, crotónico, succínico, acético, málico, maleico y cítrico.

e) *Sales inorgánicas*: SO<sub>4</sub>Cu.5 H<sub>2</sub>O ; SO<sub>4</sub>Zn.7 H<sub>2</sub>O ; SO<sub>4</sub>Mn.4 H<sub>2</sub>O ; SO<sub>4</sub>Fe.7 H<sub>2</sub>O y (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Co.

f) *Hidrolizado de caseína*: Fué preparado por el Dr. A. Sordelli y el Sr. J. P. Ferrari (\*), siguiendo en sus líneas generales el método de Mueller y Miller (1941).

g) *Autolizado de levadura*: El método de preparación ya fué descrito (Savino y Rennella, 1942). En el texto de este trabajo llamaremos F<sub>1</sub> a este autolizado.

h) *Fracciones purificadas del autolizado de levadura*: En nuestros experimentos hemos empleado dos fracciones purificadas del autolizado de levadura que denominamos F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>.

1. (\*) A quienes agradecemos la gentileza al facilitarnos dicho hidrolizado.

PREPARACIÓN DE LAS FRACCIONES  $F_2$  Y  $F_3$ . — En nuestros ensayos de purificación del autolizado de levadura hemos seguido algunas de las indicaciones dadas por Kögl y Tönnis (1936) para la obtención de la biotina de la yema de huevo. Hemos partido de 450 ml del autolizado de levadura ( $F_1$ ), llevado a pH 5.0 - 5.5, a los que agregamos 100 grs. de carbón animal, dejándolos en contacto 24 horas, lapso durante el cual esta mezcla se agita varias veces. Separado el carbón animal por filtración en Buchner, es suspendido en un líquido compuesto de agua (160 ml), piridina (40 ml) y alcohol metílico (40 ml). Después de 2 horas de contacto, durante las cuales se agita frecuentemente, la porción líquida es separada por filtración y concentrada (por evaporación en el vacío). Una vez concentrado este líquido (que denominamos  $F_2$ ) es tratado por ácido fosfotúngstico al 20 % — solución en ácido sulfúrico al 5 % — hasta que por nuevo agregado de este ácido no se produzca más precipitación.

El precipitado obtenido lo separamos por centrifugación y lo tratamos con una solución de hidrato de bario al 10 %, hasta que el líquido tenga reacción alcalina franca. Separamos el nuevo precipitado por centrifugación y el líquido sobrenadante lo llevamos a pH 7.2 con una solución diluida de ácido sulfúrico. Por centrifugación separamos este tercer precipitado — de sulfato de bario — y tenemos así la otra fracción del autolizado de levadura, aquella que llamamos  $F_3$ .

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE  $F_2$  Y  $F_3$ . — El grado de pureza de las diversas fracciones del autolizado de levadura se midió sobre la base y el hecho que el autolizado de levadura contiene sustancias necesarias para el crecimiento de razas domésticas de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se puede poner fácilmente en evidencia sembrando una pequeña cantidad de levaduras en un medio mineral con una sal amoniacal y glucosa. Se observa entonces que las levaduras no desarrollan en este medio, pero sí lo hacen mediante el agregado de sustancias que tengan actividad análoga a la biotina de Kögl y Tönnis y que György *et al.* (1940) a su vez la identificaron con la vitamina H.

Nosotros en nuestros experimentos hemos utilizado el medio mineral de Kögl y Tönnis, [ $SO_4(NH_4)_2$ : 3 grs.;  $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ : 0.7 grs.;  $PO_4H_2K$ : 1 gr.;  $PO_4HK_2$ : 0.1 gr.; Cl Na: 0.5 grs.;  $(NO_3)_2Ca$ : 0.4 gramos; agua 1 litro; pH 7.5] al que previamente esterilizado

TABLA 2

Concentración de la hematina	Desarrollo de las leptospiras al 10° día
2.000 mg por litro	No desarrolla
1.000 » » »	$2,4 \times 10^6$ por ml
100 » » »	$3,9 \times 10^6$ » »
10 » » »	$1,3 \times 10^6$ » »
1 » » »	No desarrolla

La tabla 2 nos permite deducir que el mayor desarrollo de las leptospiras se tiene cuando la hematina está en la concentración de 100 mg por litro; en concentraciones mayores a 2.000 mg o inferiores a 1 mg por litro las leptospiras no desarrollan. Experimentos análogos al de la tabla 2 fueron repetidos varias veces y en estos ensayos pudimos observar que la concentración óptima de la hematina para el desarrollo de las leptospiras, correspondía a 50 mg por litro, valor que coincide con el determinado anteriormente por nosotros (Savino y Rennella, 1942). Por otra parte el experimento de la tabla 2 indica que *la hematina es un factor de crecimiento de la leptospira*, como había sido demostrado por nosotros en el trabajo anteriormente citado.

b) *Acción del autolizado de levadura y de sus fracciones.* — Para realizar este experimento hemos utilizado el medio salino (página 4) con hematina — 50 mg por litro — y cantidades variables del autolizado de levadura. Cada 10 ml del medio nutritivo fué sembrado con 0,05 ml de un cultivo de leptospiras similar al anteriormente empleado. Los resultados obtenidos están en la tabla 3.

TABLA 3

Autolizado de levadura F <sub>1</sub>	Desarrollo de las leptospiras al 10° día
1 %	No desarrolla
0,1 »	$3,9 \times 10^6$ por ml
0,01 »	$2,9 \times 10^6$ » »
0,001 »	No desarrolla

La tabla 3 nos indica que el mejor desarrollo de las leptospiras corresponde a una concentración del 0,1 % del autolizado de levadura F<sub>1</sub>. Concentraciones del 1 % inhiben el crecimiento y por deba-

jo del 0,001 % ya no hay desarrollo. También debemos agregar que empleando las fracciones  $F_2$  y  $F_3$  del autolizado de levadura hemos observado que las leptospiras no desarrollan, lo que nos induce a pensar que por purificación el autolizado de levadura pierde su actividad, no obstante obtenerse una evidente purificación con respecto al crecimiento de la levadura según lo indica la tabla 1.

El experimento de la tabla 3 fué repetido en varias ocasiones empleando concentraciones más próximas de autolizado de levadura  $F_1$  y en todos los casos la mejor concentración del autolizado de levadura, para el desarrollo de las leptospiras, correspondió al 0,1 %, valor que coincide con la determinación realizada anteriormente por nosotros (Savino y Rennella, 1942).

c) *Influencia del hidrolizado de caseína.* — Los resultados obtenidos en el empleo de diferentes concentraciones del hidrolizado de caseína están en la tabla 4.

El experimento de la tabla 4 fué realizado sembrando 0,05 ml de un cultivo de leptospiras, que tenía alrededor de  $1,8 \times 10^6$  microorganismos por ml, en cada tubo que tenía 10 ml. del medio nutritivo en ensayo. También debemos decir que el cultivo utilizado en estas siembras tenía 6 pasajes en el medio nutritivo 1 descrito en la página 4.

TABLA 4

Caseína hidrolizada	Desarrollo de leptospiras al 10º día
5 %	No desarrolla
2 »	$2,1 \times 10^6$ por ml
1 $\frac{1}{2}$ »	$3,0 \times 10^6$ » »
0,5 »	$3,2 \times 10^6$ » »
0,2 »	$2,5 \times 10^6$ » »
0,1 »	$1,1 \times 10^6$ » »
—	No desarrolla

La tabla 4 indica que la caseína hidrolizada inhibe el crecimiento de las leptospiras en una concentración del 5 % y que la concentración más favorable corresponde al 0,5 % tal como lo habíamos determinado anteriormente nosotros empleando un medio nutritivo a base de suero de oveja (Savino y Rennella, 1942).

d) *Importancia de las vitaminas y de otros cuerpos de acción similar.* — Con este objeto hemos empleado el siguiente medio nutritivo: al medio salino (pág. 4), le agregamos asparagina (0,4 %),

dextrina (0,2 %) y hematina (0,005 %). Luego, lo distribuimos en tubos de ensayo y le añadimos diferentes cantidades de las sustancias en estudio. Finalmente, cada 10 ml del medio nutritivo eran sembrados con 0,05 ml de un cultivo de leptospiras que tenía  $0,3 \times 10^6$  microorganismos por ml y que había sido pasado 5 veces en el medio nutritivo, arriba citado, con asparagina, dextrina y hematina. Los resultados obtenidos están indicados en la tabla 5.

TABLA 5

Activador	Concentración mgr por litro	Desarrollo de las leptospiras al 10° día
Acido nicotínico .....	2,0	$2,5 \times 10^6$ por ml
» » .....	1,0	$3,3 \times 10^6$ » »
» » .....	0,5	$2,3 \times 10^6$ » »
» » .....	0,1	$2,3 \times 10^6$ » »
Tiamina .....	2,0	$2,8 \times 10^6$ » »
» .....	1,0	$3,3 \times 10^6$ » »
» .....	0,5	$2,7 \times 10^6$ » »
» .....	0,1	$2,3 \times 10^6$ » »
Nicotinamida .....	1,0	$3,7 \times 10^6$ » »
» .....	0,5	$4,0 \times 10^6$ » »
» .....	0,1	$2,3 \times 10^6$ » »
Riboflavina .....	1,0	$2,9 \times 10^6$ » »
» .....	0,5	$3,7 \times 10^6$ » »
» .....	0,1	$2,4 \times 10^6$ » »
Piridoxina .....	1,0	$3,5 \times 10^6$ » »
» .....	0,5	$3,9 \times 10^6$ » »
» .....	0,1	$5,1 \times 10^6$ » »
» .....	0,05	$4,2 \times 10^6$ » »
Acido ascórbico .....	1,0	$2,2 \times 10^6$ » »
» » .....	0,5	$2,9 \times 10^6$ » »
» » .....	0,1	$1,8 \times 10^6$ » »
» pantoténico .....	10	$2,1 \times 10^6$ » »
» » .....	5	$1,8 \times 10^6$ » »
» » .....	2	$1,9 \times 10^6$ » »
» » .....	1	$2,2 \times 10^6$ » »
» » .....	0,5	$2,3 \times 10^6$ » »
—	—	$2,0 \times 10^6$ » »

La tabla 5 y el conjunto de todos nuestros ensayos nos permiten afirmar que el ácido nicotínico, nicotinamida, tiamina, riboflavina y piridoxina favorecen el desarrollo de las leptospiras. En cambio, el ácido ascórbico y el ácido pantoténico no tienen ninguna acción. Las concentraciones más favorables, expresadas en miligramos por litro, son las siguientes: ácido nicotínico, 1; tiamina, 1; nicotina-

mida, 0,5; riboflavina, 0,5 y piridoxina, 0,1. Es interesante hacer notar que Rosenfeld y Meridian (1941) había observado que las citadas sustancias estimulaban el crecimiento de la *Leptospira canicola*. En la tabla 6 están indicadas las concentraciones más favorables encontradas por estos autores y las halladas por nosotros.

TABLA 6

Activador	Concentración en mgr por litro	
	Rosenfeld y Meridian	Savino y Rennella
Acido nicotínico .....	1	1
Nicotinamida .....	1	0,5
Tiamina .....	3	1
Riboflavina .....	0,001	0,5
Piridoxina .....	1	0,1

La tabla 6 muestra que nuestros resultados son bastante concordantes con los de Rosenfeld y Meridian a excepción de la riboflavina que según los autores citados impide el crecimiento de la leptospira en la concentración de 0,1 mg por litro y que sólo la toleran en la dosis de 1 mg por litro en presencia de catalasa. En cambio, nosotros hemos visto que el mejor desarrollo de las leptospiras se obtiene cuando la riboflavina está en la concentración de 0,5 mg por litro.

e) *Acción de los aminoácidos.* — La importancia de los aminoácidos fué estudiada utilizando el medio nutritivo 2 (pág. 4) sin asparagina y con agregado de dextrina al 0,2%. En los cultivos hemos empleado desarrollos que tenían 4 pasajes en el medio nutritivo citado en el párrafo anterior y la concentración en leptospiras era aproximadamente  $1,2 \times 10^6$  microorganismos por ml. Cada 10 ml del medio nutritivo en estudio fué sembrado con 0,05 ml del desarrollo citado. Los diversos ensayos realizados nos permitieron deducir que de todos los aminoácidos utilizados sólo la asparagina y el ácido aspártico favorecían el desarrollo de las leptospiras. En cambio, los aminoácidos restantes no tenían acción y algunos como ser la tirosina, méthionina, cistina, cisteína y glutatone tenían un efecto inhibitor en una concentración que variaba de 1 a 10 mg por litro. Por ésto, en la tabla 7 nosotros consignamos únicamente los resultados obtenidos con las asparagina y el ácido aspártico.

TABLA 7

Aminoácido	Concentración	Desarrollo al 10° día
Asparagina .....	8.000 mg por litro	$1,8 \times 10_6$ por ml
» .....	4.000 » » »	$2,4 \times 10_6$ » »
» .....	2.000 » » »	$1,9 \times 10_6$ » »
» .....	1.000 » » »	$1,2 \times 10_6$ » »
» .....	500 » » »	$0,5 \times 10_6$ » »
Acido aspártico .....	1.000 » » »	$2,9 \times 10_6$ » »
» » .....	500 » » »	$3,3 \times 10_6$ » »
» » .....	200 » » »	$2,7 \times 10_6$ » »
» » .....	100 » » »	$2,6 \times 10_6$ » »
—	—	$0,5 \times 10_6$ » »

De la tabla 7 nosotros deducimos que la concentración más favorable, para el desarrollo de la leptospira, de la asparagina y del ácido aspártico corresponde al 0,4 y al 0,05 %, respectivamente. El valor obtenido para la asparagina corresponde con el determinado anteriormente (Savino y Rennella, 1942).

f) *Importancia de los hidratos de carbono.* — Este estudio fue realizado mediante el empleo del medio nutritivo (pág. 4). Cada 10 ml de dicho medio, con diferentes concentraciones de hidratos de carbono, lo hemos sembrado con 0,05 ml de un desarrollo de leptospiras que había sufrido 10 pasajes en el medio nutritivo 2 (pág. 4). Los repetidos ensayos que nosotros hemos realizado nos han llevado a la conclusión que de todos los hidratos de carbono estudiados sólo la dextrina tiene una acción favorecedora en el crecimiento de la leptospira y los demás hidratos de carbono ensayados no parecían influir en forma favorable en el crecimiento de dicho microorganismo. Debido a esto en la tabla 8 sólo se registran los valores obtenidos con el empleo de la dextrina.

TABLA 8

Concentración de la dextrina	Desarrollo al 10° día
20.000 mg por litro	$2,4 \times 10_6$ por ml
2.000 » » »	$2,8 \times 10_6$ » »
200 » » »	$0,3 \times 10_6$ » »
20 » » »	$0,2 \times 10_6$ » »
—	$0,3 \times 10_6$ » »

Por tanto, la dextrina favorece el desarrollo de las leptospiras de una manera marcada en la concentración del 0,2 %.

g) *Acción de otras sustancias orgánicas.* — En la realización de estos ensayos hemos utilizado el medio nutritivo 2 (pág. 4), con el agregado de dextrina al 0,2 %. De todas las sustancias estudiadas sólo el ácido pimélico influyó en forma favorable sobre el crecimiento de las leptospiras y por dicho motivo en la tabla 9 sólo consignamos, los resultados obtenidos con la citada sustancia.

TABLA 9

Concentración del ácido pimélico	Desarrollo al 10° día
200 mg por litro	$1,7 \times 10_6$ por ml
100 » » »	$3,0 \times 10_6$ » »
50 » » »	$4,4 \times 10_6$ » »
20 » » »	$1,8 \times 10_6$ » »
—	$2,0 \times 10_6$ » »

Como se ve en la tabla 9 el ácido pimélico en la concentración de 50 mg por litro es cuando mejor favorece el desarrollo de las leptospiras.

h) *Acción de las sales inorgánicas.* — Fué estudiada mediante el empleo del medio nutritivo 2 (pág. 4) y los resultados nos indicaron que ninguna de estas sales minerales influye de una manera favorable en el desarrollo de las leptospiras. Además, en dosis mayores a 10 mg por litro inhiben el crecimiento de estos microorganismos.

## VI. — RESUMEN

En el presente trabajo estudiamos la influencia de diversas sustancias en el desarrollo de las leptospiras y con este objeto hemos utilizado 12 cepas de diversos orígenes. Es interesante hacer notar que de todas las cepas estudiadas sólo desarrollaron y se comportaron en forma análoga las siguientes: RGA, ST IV, China y Lisboa; en cambio, las restantes: 467, 161, 192, 462, 189, MIA, R<sub>1</sub> y Montevideo no desarrollaron en ninguno de nuestros ensayos.

Las investigaciones realizadas permiten afirmar una vez más que la hematina es un factor de crecimiento de las leptospiras, según

ya lo habíamos dicho en un trabajo anterior (Savino y Rennella, 1942).

Para realizar nuestros estudios hemos partido de un medio mineral al que le hemos agregado diferentes sustancias y los resultados de los múltiples ensayos nos permitieron llegar a los resultados siguientes:

1. Hemos observado que el ácido nicotínico, tiamina, nicotinamida, riboflavina y piridoxina favorecen el desarrollo de las leptospiras; en cambio, el ácido pantoténico y el ácido ascórbico no tienen ninguna acción.

2. Entre los amino ácidos ensayados la asparagina y el ácido aspártico estimulan el crecimiento de las leptospiras y en cambio no tienen ningún efecto favorable: l. cistina, d.l. valina, l. tirosina, l. triptofano, d.l. methionina, d.l. leucina,  $\beta$  alanina, l.  $\alpha$  alanina, ácido glutámico, d. ornitina, glicocola, glutatone y d.l. alanina.

3. La dextrina en la concentración de 0,2 % aumenta el desarrollo de las leptospiras; mientras que no tienen ninguna acción los otros hidratos de carbono utilizados, esto es: glucosa, manita, ramnosa, inulina, eritrta, inosita, xilosa, lactosa, glucógeno, maltosa, arabinosa, galactosa, salicina, almidón, celobiosa rafinosa, sorbita, manosa, adonita trealosa y arabita.

4. Hemos hallado que el ácido pimélico provoca un mejor desarrollo de las leptospiras, mientras no lo favorecen la colessterina, el lactato de amonio, la glicerina, y las sales sódicas de los ácidos láctico, tártrico, tartrónico, crotónico, succínico, acético, málico, maleico y cítrico.

5. Las sales minerales de hierro, cobre, zinc, manganeso y cobalto no provocan aumento del desarrollo de las leptospiras y generalmente lo inhiben en concentraciones superiores a 10 mg por litro.

6. El autolizado de levadura y el hidrolizado de caseína influyen en forma manifiesta sobre el crecimiento de las leptospiras.

7. La utilización de fracciones de autolizado de levadura, purificada siguiendo una técnica similar a la de Kögl y Tönnis para la obtención de la biotina de la yema de huevo, demuestra que la purificación hace perder la actividad del autolizado de levadura sobre el crecimiento de las leptospiras.

## VII. — CONCLUSIONES

1. — La hematina es un factor de crecimiento para las leptospiras y el autolizado de levadura o el hidrolizado de caseína favorecen su desarrollo.

2. — La asparagina, el ácido aspártico y la dextrina estimulan el crecimiento de las leptospiras.

3. — Activan el crecimiento de las leptospiras el ácido nicotínico, la tiamina, nicotinamida, riboflavina, piridoxina y el ácido pimélico.

4. — Las sustancias arriba citadas sólo permiten el crecimiento de 4 de las 12 cepas de leptospiras estudiadas.

## BIBLIOGRAFIA

1. FABINI, C., y ESTRELLA, J. C. — 1938. « Estudio clínico y bacteriológico del primer caso de espiroquetosis íctero-hemorrágica descrito en el Uruguay ». *Arch. Uruguayos Med. Cir. Esp.* 8 (5): 537-561.
2. GATTERMANN, L. — 1927. « Prácticas de química orgánica ». Manuel Marín. Barcelona. 393.
3. GYÖRGY, P.; VIGNEAUD, V.; MELVILLE, D. B., y ROSE, C. — 1940. « On the identity of vitamina H with biotin ». *Science.* 92: 62 y 609.
4. KÖGL, F., y TÖNNIS, B. — 1936. « Ueber das Bios-Problem ». *Hoppe-Seyl. Z.* 242: 43-73.
5. MUELLER, J. H., y MILLER, P. A. — 1941. « Production of diphtheric toxin of high potency on a reproducible medium ». *Journ. Imm.* 40 (1): 21-32.
6. ROSENFELD, D. W., y MERIDIAN, R. G. — 1941. Studies on the metabolism of *Leptospira* ». *Journ. Bact.* 42 (2): 165-172.
7. SAVINO, E., y RENNELLA, E. — 1942. « El cultivo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* Inada e Ido. 1915. I. Condiciones y factores que rigen su desarrollo « in vitro ». Método para la cuenta de leptospiras. II. Nuevo medio de cultivo ». *Rev. Soc. Arg. Biol.* 18 (3): 176-189. *Rev. Inst. Bact.* 11 (1): 5, 18.