

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

IV. - Cultivo en medio sintético y semisintético

Por ENRIQUE SAVINO y EDUARDO RENNELLA

En un trabajo anterior (Savino y Rennella, 1942 b) estudiamos la acción de diversas sustancias sobre el desarrollo de las leptospiras y de acuerdo a los resultados conseguidos hemos podido llegar a la obtención de medios nutritivos sintéticos y semisintéticos. En este trabajo exponemos los datos acerca de la influencia de los diversos factores estudiados.

I. — ANTECEDENTES

En el trabajo arriba citado demostramos una vez más que la hematina es un factor de crecimiento para la leptospira y que su concentración más adecuada correspondió a 50 mg por litro. Observamos que el autolizado de levadura (F₁) y el hidrolizado de caseína permiten el cultivo de las leptospiras en las dosis respectivas de 0.1 y 0,5 %. Determinamos también que la asparagina (0.4 %), el ácido aspártico (0.05 %) y la dextrina (0.2 %) estimulan el crecimiento de estos microorganismos. Finalmente, decíamos que también activan su desarrollo el ácido nicotínico, la tiamina, la nicotinamida, la riboflavina, la piridoxina y el ácido pimélico.

II. — MATERIAL

Hemos estudiado las mismas 12 cepas de leptospiras cuya nómina detallada ha sido mencionada en trabajos anteriores.

III. — SUSTANCIAS EMPLEADAS

En nuestros experimentos hemos utilizado, en las concentraciones que se indican, las sustancias siguientes:

1: hematina, 0.005 %; 2: autolizado de levadura (F₁), 0.1 %; 3: hidrolizado de caseína, 0.5 %; 4: asparagina, 0.4 %; dextrina,

0.2 %; 6: la mezcla de los cuerpos siguientes, cuyas dosis se expresan en mg por litro: ácido nicotínico, 1; nicotinamida, 0.5; tiamina, 1; riboflavina, 0.5; piridoxina, 0.1; ácido pimélico, 50, y ácido aspártico 500. En el texto denominaremos con el nombre de « activadores » a la mezcla de los mismos, citados en el párrafo anterior.

IV. — MÉTODO

El método seguido en nuestro trabajo consistió ante todo en la preparación del medio mineral siguiente: ácido fosfórico siruposo (85 %), 1.32 ml; Cl Na, 3 gr; SO₄Mg, 0.05 gr; Cl₂Ca, 0.01 gr; KaOH (20 %), 10.5 ml; agua bidestilada, 1 litro. Corrección del pH a 7.1 y esterilización a 115°C durante 15 minutos.

Luego al medio mineral le agregamos las diferentes sustancias empleadas, previamente disueltas en agua, distribuidas en ampollas y esterilizadas por calentamiento — baño de agua a 100°C — durante 20 minutos. Finalmente, el medio nutritivo lo envasamos en tubos de ensayo Pyrex (1.5 × 16 cm), tapados con algodones recubiertos con gasa y esterilizados en autoclavé. En cada tubo de ensayo colocamos 10 ml del medio nutritivo ensayado.

V. — RESULTADOS

Para facilitar su exposición, reunimos en un grupo los resultados relacionados con los medios nutritivos semisintéticos y en otro aquellos obtenidos con medios sintéticos.

a) *Medios semisintéticos.* — En estos medios nutritivos hemos utilizado el medio mineral adicionado de hematina (0.005 %), autolizado de levadura (F₁) (0.1 %) y caseína hidrolizada (0.5 %). Hemos realizado muchos ensayos con estas sustancias y sólo consignaremos uno de ellos que está contenido en la tabla 1.

TABLA 1

Factores (1)	Desarrollo al 10° día
H.	0
A. L.	0
H. C.	0
H. + A. L.	2,1 × 10 ⁶ por ml
H. + H. C.	1,2 × 10 ⁶ » »
H. + A. L. + H. C.	4,8 × 10 ⁶ » »

(1) Las letras tienen el significado siguiente: H.: hematina; A. L.: autolizado de levadura, y H. C.: caseína hidrolizada.

El experimento de la tabla 1 fué realizado sembrando en 10 ml del medio nutritivo, 0.05 ml de un desarrollo de leptospiras que tenía 2×10^6 microorganismos por ml y llevaba más de 10 pasajes en el medio nutritivo con hematina y autolizado de levadura. Es interesante hacēr notar que en el experimento de la tabla 1 la hematina sé comporta como un factor de crecimiento y que tanto el autolizado de levadura como la caseína hidrolizada favorecen el crecimiento de las leptospiras.

b) *Medio nutritivo sintético.* — En el estudio de los medios sintéticos hemos partido, como en el caso anterior, del medio mineral al que agregamos hēmatina (0.005 %) y asparagina (0.4 %). Luego, por adición de dextrina (0.2 %) y de la mezcla de « activadores », preparamos los cuatro medios nutritivos siguientes: 1, asparagina; 2, asparagina y dextrina; 3, asparagina y « activadores », y 4, asparagina, dextrina y « activadores ».

Cada 10 ml de los medios nutritivos citados fueron primeramente sembrados con 0.05 ml de un desarrollo de 4 días de incubación en el medio con suero ya descrito por nosotros (Savino y Rennella, 1942 a) que tenía 150×16^6 leptospiras por ml.

Una vez sembrados los medios nutritivos sintéticos eran incubados, como siempre a 20-30°C, y cada 10 días realizábamos la cuenta de las leptospiras y efectuábamos un nuevo pasaje sembrando 0.5 ml del desarrollo en 9.5 ml del mismo medio nutritivo. Los resultados obtenidos están en la tabla 2.

TABLA 2

Medio nutritivo	Número de leptospiras por ml			
	4° pasaje	5° pasaje	8° pasaje	10° pasaje
Asp. (1)	$0,4 \times 10^6$	0	—	—
Asp. + dext. (2)	$0,6 \times 10^6$	$0,4 \times 10^6$	0	—
Asp. + act. (3)	$1,1 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
Asp. + dext. + act. (4)	$1,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$0,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$

El experimento de la tabla 2 nos indica que por pasajes sucesivos podemos mantener el desarrollo de las leptospiras sólo con la presencia de la mezcla de las sustancias « activadoras ». Así hemos llegado a mantener los cultivos hasta más de 20 pasajes sucesivos.

Finalmente, debemos decir que de las 12 cepas de leptospiras es-

tudiadas sólo hemos podido mantener el desarrollo de las siguientes: RGA, ST IV, Lisboa y China. En cuanto a las restantes el crecimiento se detuvo en el segundo pasaje.

VI. — RESUMEN

Si realizamos una síntesis de nuestro trabajo vemos que hemos cultivado las leptospiras (por pasajes sucesivos) en medios nutritivos sintéticos y semisintéticos.

El medio nutritivo sintético se obtiene agregando a una mezcla mineral asparagina (0.4 %), dextrina (0.2 %) y una mezcla de sustancias « activadoras ». Además, en los numerosos experimentos que nosotros hemos realizado pudimos comprobar que la dextrina estimula el desarrollo de las leptospiras.

El medio semisintético que da un mejor desarrollo de las leptospiras, es obtenido por agregado al medio mineral (con hematina) de autolizado de levadura (F_1) y de hidrolizado de caseína en las concentraciones más favorables que será determinada en cada caso. Con los productos utilizados por nosotros la dosis ha sido 0.1 y 0.5 % respectivamente.

VII. — CONCLUSIONES

1. — Los medios nutritivos sintéticos que favorecen el desarrollo de las leptospiras están constituidos por un medio mineral con hematina, asparagina, dextrina y « activadores » (ácido nicotínico, nicotinamida, tiamina, piridoxina, riboflavina, ácido aspártico y ácido pimélico).

2. — En los medios semisintéticos el autolizado de levadura y el hidrolizado de caseína estimulan el desarrollo de las leptospiras.

BIBLIOGRAFIA

- SAVINO, E., y RENNELLA, E.—1942. a. «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 leptospitas. II. Nuevo medio de cultivo. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 18 (3): 176-189. *Rev. Inst. Bact.* 11 (1): 5-18.
- SAVINO, E., y RENNELLA, E. — 1942. b. El cultivo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* Inada e Ido, 1915. III. Ensayo del valor nutritivo de diversas sustancias. *Rev. Inst. Bact.* y *Rev. Soc. Arg. Biol.* 18 (6): 566-578.