

EVALUACION DEL EFECTO DEL ACIDO NALIDIXICO, AMPICILINA, KANAMICINA, PENICILINA G Y POLIMIXINA B EN LOS CULTIVOS DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA

Sofia Duque Beltrán* , Augusto Corredor Arjona** , Marleny Montilla Moreno***,
Dioselina Peláez Carvajal****.

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de ácido nalidíxico, ampicilina, kanamicina, penicilina G y polimixina B, sobre la población de promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis*, *Leishmania donovani chagasi* y *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*. La penicilina G y la ampicilina se pueden utilizar hasta concentraciones de 1000 ug/ml y 500 ug/ml respectivamente en cultivo de promastigotes de cualquier cepa de *Leishmania* sin que éstos se afecten. La polimixina B disminuye la población de promastigotes por lo cual es preferible no usarse en cultivos de *Leishmania*. El ácido nalidíxico y kanamicina pueden ser utilizados *in vitro* pero teniéndose en cuenta la especie de *Leishmania* y la concentración de antimicrobiano recomendado para la misma.

INTRODUCCION

Es importante el aislamiento y mantenimiento de cepas de *Leishmania* en cultivo porque ellas son el antígeno que se emplea tanto para las pruebas inmunodiagnósticas como para estudios bioquímicos e inmunológicos.

Los promastigotes que se mantienen en cultivo provienen de los amastigotes que han sido obtenidos a partir de biopsias ya sea de humanos o animales vertebrados. La fuente de origen de los parásitos puede contener microorganismos los cuales contaminan los cultivos impidiendo el mantenimiento de los promastigotes *in vitro*. La prioridad de conservar una cepa de *Leishmania* axénica ha llevado a los investigadores a buscar soluciones para eliminar los microorganismos. Un procedimien-

to para tal fin es utilizar antibióticos que inhiban y eliminen los agentes contaminantes.

La adición de antibióticos en medios de cultivo ha sido discutida durante años (1,2). Se pensaba que la adición de éstos sólo debería hacerse cuando se aislaran cepas de *Leishmania*. Sin embargo, con el tiempo se comprobó que una contaminación con hongos o bacterias era difícil de manejar *in vitro* y que aquellas se podían controlar y hasta eventualmente eliminar con antibióticos como gentamicina, penicilina y estreptomycin individualmente o en combinaciones.

Desde hace varios años se conoce que anfotericina B y pentamidina son activos contra la forma promastigote de *Leishmania* (3, 4) y que ciertos bactericidas como sulfadiazina,

* Bióloga, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud

** Médico Cirujano, Jefe Grupo de Parasitología-Instituto Nacional de Salud, Profesor Facultad de Medicina-Universidad Nacional de Colombia

*** Bióloga, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud

**** Bacterióloga, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud

sulfadoxina, sulfadimetoxina, trimetropin, isoniazida, rifampicina, isoniazida + rifampicina, tiambutosina, salicil-aldehido-isonicotin-hidrazona, acetil-sulfona, sulfitrona, ácido 4-amino salicílico y clofazimina tienen actividad antileishmania reduciendo la cantidad de macrófagos infectados (5).

El presente trabajo evalúa el efecto del ácido nalidíxico, ampicilina, kanamicina, penicilina G y polimixina B sobre el número de promastigotes de *Leishmania* pertenecientes al complejo *braziliensis*, *mexicana* y *chagasi*. Estos antimicrobianos son de fácil adquisición para los laboratorios donde se lleve a cabo cultivos de *Leishmania* y además poseen actividad de amplio espectro contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

MATERIALES Y METODOS

PARASITOS. Promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis* (L.b.b.), *Leishmania donovani chagasi* (L.d.ch.) y *Leishmania mexicana amazonensis* (L.m.a.) mantenidos *in vitro*.

MEDIOS DE CULTIVO. La composición de los medios de cultivo NNN modificado (fase sólida) y REI modificado (fase líquida) con sus respectivos procedimientos de elaboración fueron los descritos por Duque y Colaboradores (6).

CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS CEPAS DE *Leishmania*. Los promastigotes de cada una de las cepas de *Leishmania*, fueron cultivados tanto sin antimicrobianos como con la adición de cada una de las concentraciones de éstos a estudiar. Los cultivos fueron sembrados por duplicado e incubados a 24 °C.

ANTIMICROBIANOS. *Acido nalidíxico.* Control 0 ug/ml. Concentraciones de 30, 50 y 100 ug/ml

Ampicilina. Control 0 ug/ml. Concentraciones de 100, 300 y 500 ug/ml

Kanamicina. Control 0 ug/ml. Concentraciones de 50, 100 y 200 ug/ml

Penicilina G. Control 0 ug/ml Concentraciones de 500, 1000 ug/ml

Polimixina B. Control 0 U.I./ml. Concentraciones de 300, 500 U.I./ml

DETERMINACION DEL CRECIMIENTO POBLACIONAL

El crecimiento de los flagelados en los medios de cultivo y en presencia de cada una de las concentraciones de los antimicrobianos anteriormente mencionados fue llevado a cabo mediante cuantificaciones periódicas de las poblaciones por ml utilizando la cámara de Neubauer y partiendo para cada cepa de inóculos de poblaciones por ml conocidos.

ANALISIS ESTADISTICO

El incremento o disminución de promastigotes fue analizado mediante el test t ($p < 0.05$)

RESULTADOS

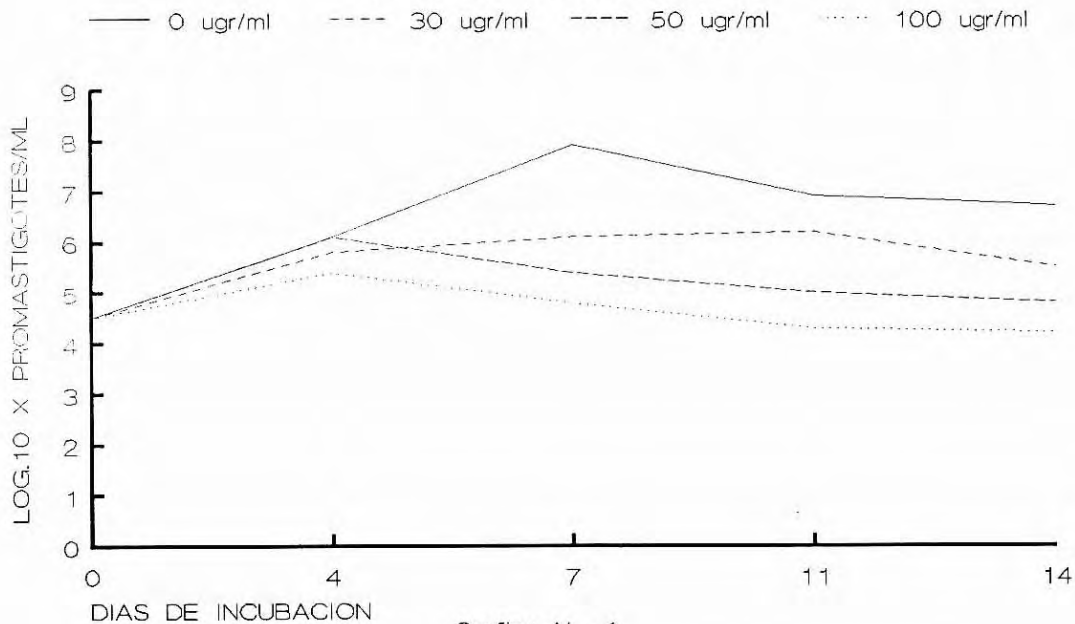
ACIDO NALIDIXICO

Las poblaciones de promastigotes de *L. braziliensis braziliensis*, *L. donovani chagasi* y *L. mexicana amazonensis* en presencia de concentraciones de 30, 50 y 100 ug/ml de ácido nalidíxico (Fig.1, 2 y 3) presentaron un incremento en el número de parásitos siendo éste más notorio durante los primeros cuatro días siguientes a su siembra inicial. Sin embargo, el incremento poblacional en cada especie comparado con su respectivo control fue menor en las distintas concentraciones del antimicrobiano.

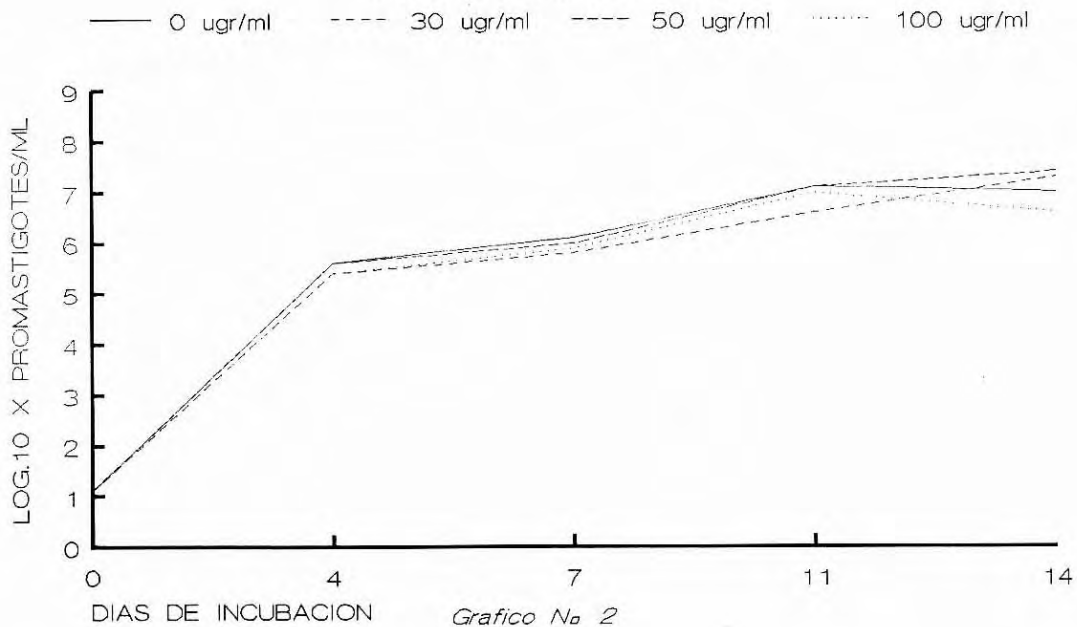
El número de promastigotes obtenido frente a cada una de las concentraciones del ácido nalidíxico en *L. b. braziliensis* fue notoriamente menor y la fase logarítmica de crecimiento reducida.

Las diferencias en el incremento poblacional observadas en *L. d. chagasi* y *L. m. amazonensis* en cada una de las concentraciones del ácido nalidíxico no fueron considerables con excepción del descenso observado en la concentración de 100 ug/ml al 7º día en *L. m. amazonensis* donde el número de parásitos disminuyó drásticamente.

LEISHMANIA BRAZILIENSIS BRAZILIENSIS ACIDO NALIDIXICO



LEISHMANIA DONOVANI CHAGASI ACIDO NALIDIXICO



LEISHMANIA MEXICANA AMAZONENSIS
ACIDO NALIDIXICO

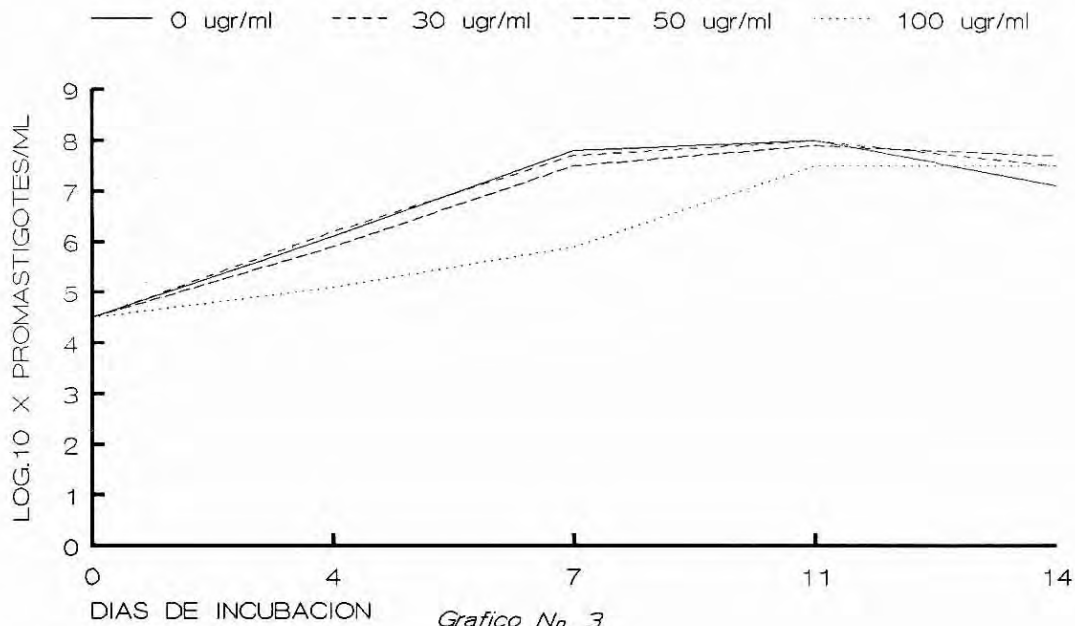


Grafico No. 3

AMPICILINA

El incremento de parásitos de *L. b. braziliensis*, *L. d. chagasi* y *L. m. amazonensis* obtenido en cultivo no se afectó por la presencia de ampicilina en ninguna de las concentraciones empleadas (Fig.4, 5 y 6).

KANAMICINA

El aumento de promastigotes de *L. b. braziliensis*, *L. d. chagasi* y *L. m. amazonensis* en presencia de kanamicina en concentraciones de 50, 100 y 200 ug/ml se afectó en forma diferente en cada una de las cepas (Fig.7, 8 y 9). La población de parásitos de *L. b. braziliensis* (Fig.7) y *L. m. amazonensis* (Fig.9) en presencia de kanamicina en concentraciones de 50 - 200 ug/ml disminuyó a partir del día tercero. El incremento de promastigotes de *L. d. chagasi* (Fig.8) en presencia de kanamicina en las concentraciones ante-

riormente mencionadas presentó un descenso leve, pero éste fue notorio al décimo día.

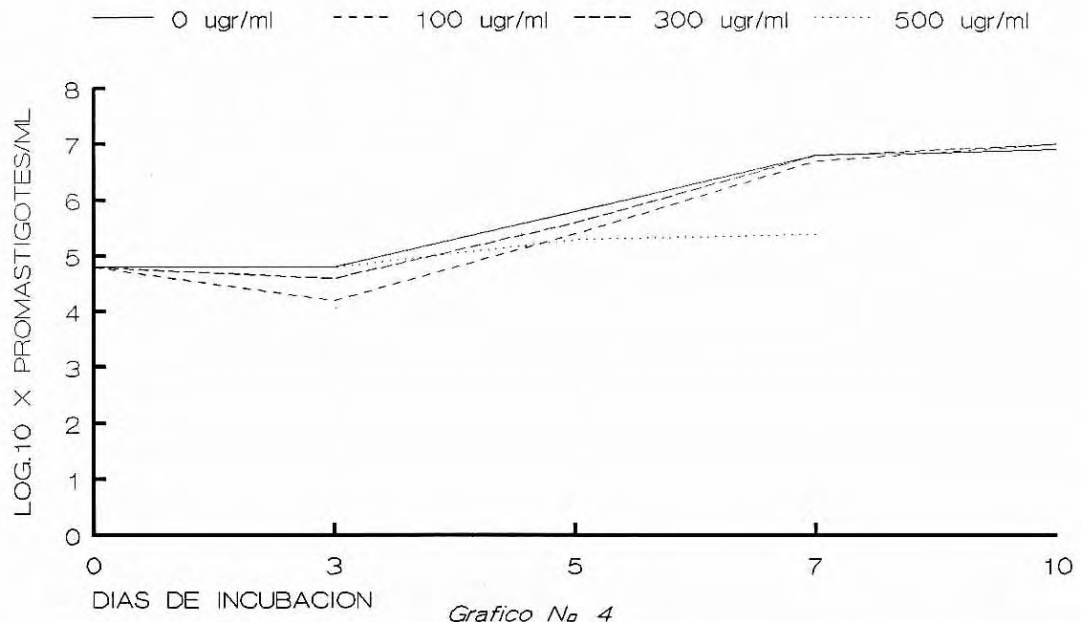
PENICILINA G

El crecimiento de promastigotes de *L. b. braziliensis*, *L. d. chagasi* y *L. m. amazonensis* *in vitro* no se afectó utilizando penicilina G en concentraciones de 500 y 1000 ug/ml durante los 14 días de cultivo de los parásitos (Fig.10, 11 y 12).

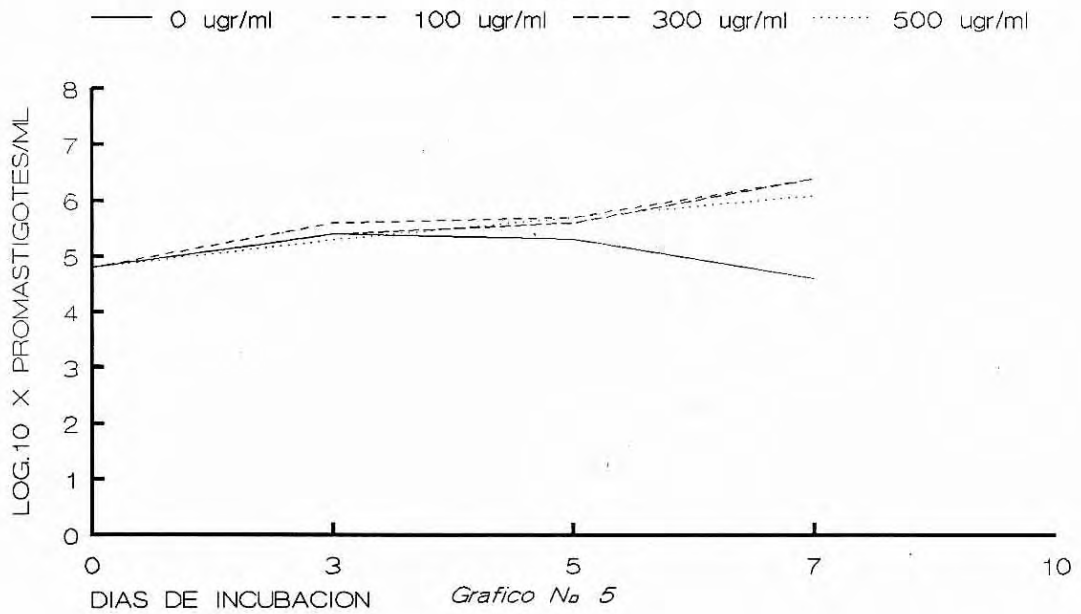
POLIMIXINA B

Este antibiótico produjo una disminución de parásitos en todas las cepas de *Leishmania* estudiadas. La reducción del número de promastigotes en la cepa de *L. b. braziliensis* fue leve y más notoria en las cepas de *L. d. chagasi* y *L. m. amazonensis* (Fig.13, 14 Y 15).

LEISHMANIA BRAZILIENSIS BRAZILIENSIS AMPICILINA

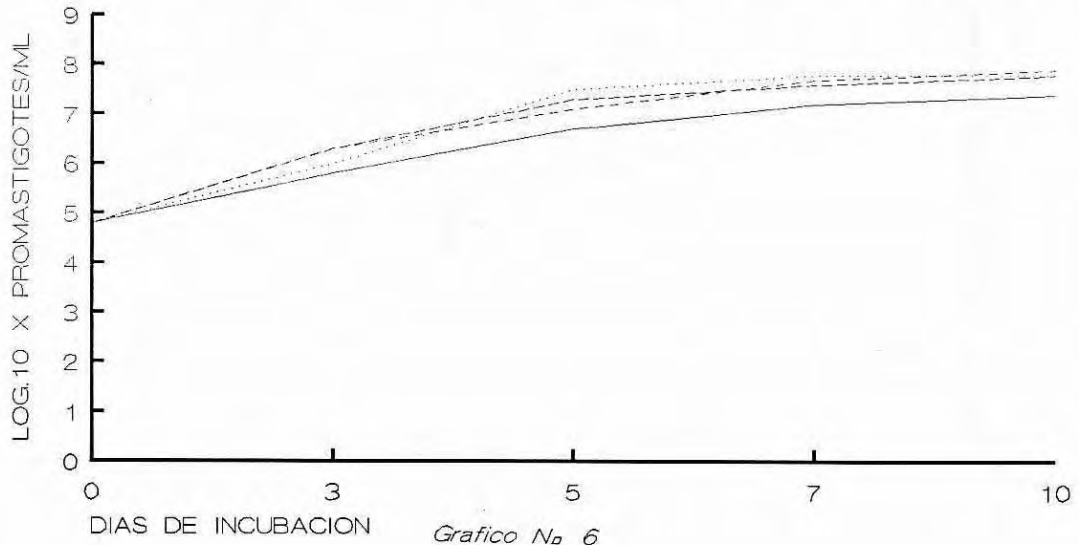


LEISHMANIA DONOVANI CHAGASI AMPICILINA



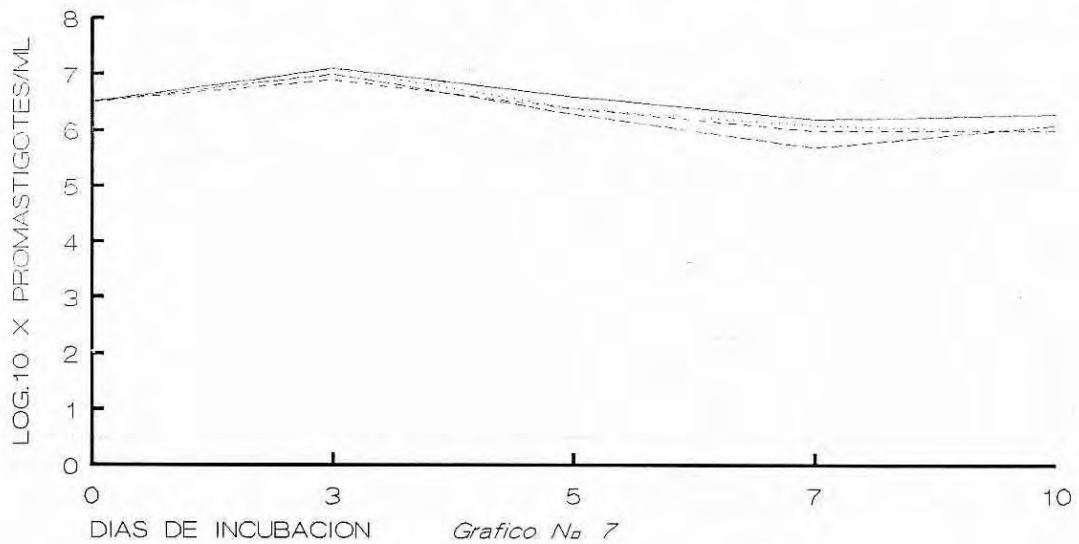
LEISHMANIA MEXICANA AMAZONENSIS AMPICILINA

— 0 ugr/ml - - - 100 ugr/ml - - - 300 ugr/ml ····· 500 ugr/ml



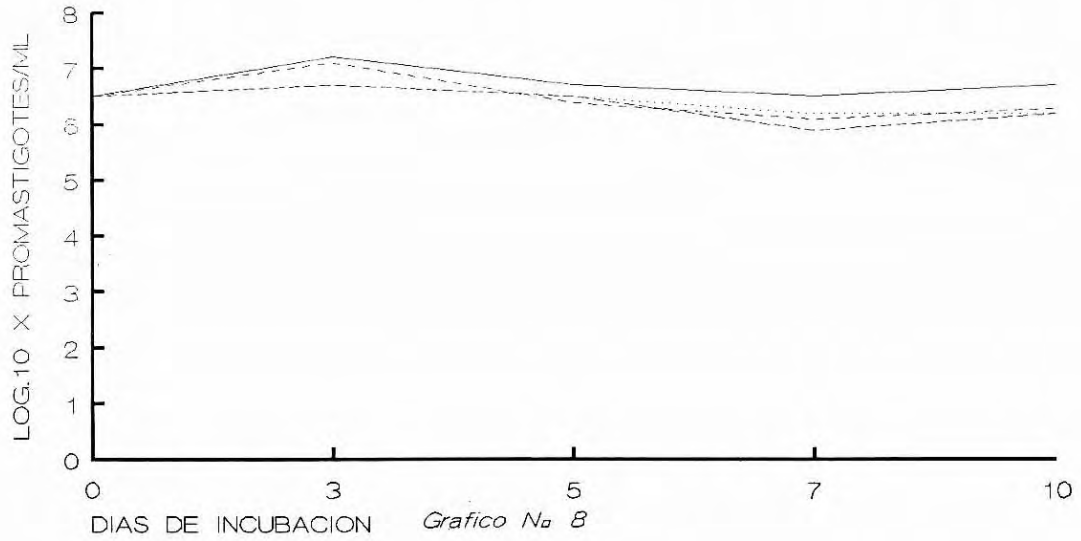
LEISHMANIA BRAZILIENSIS BRAZILIENSIS KANAMICINA

— 0 ugr/ml - - - 50 ugr/ml - - - 100 ugr/ml ····· 200 ugr/ml



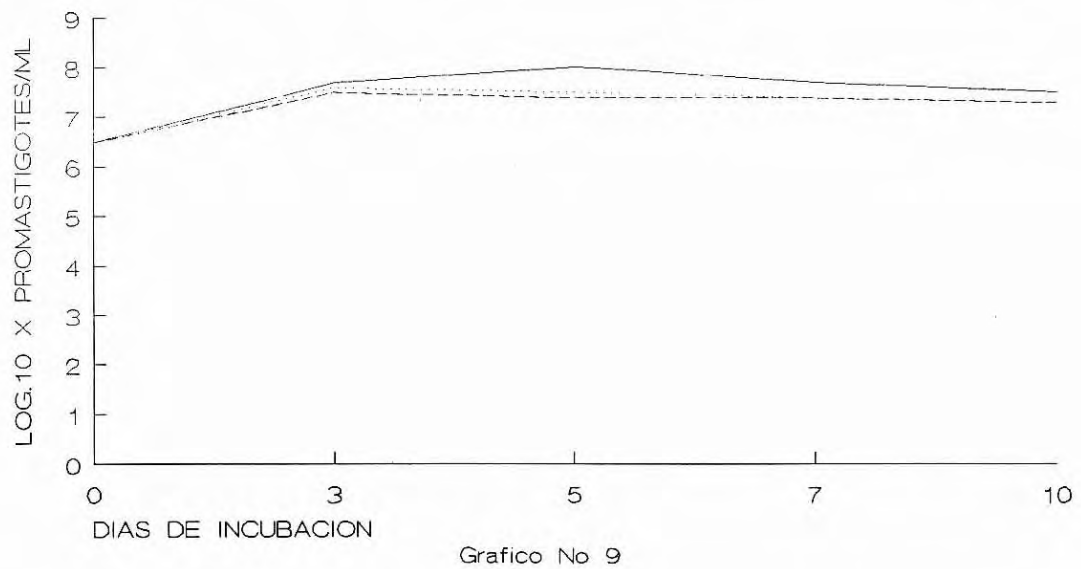
LEISHMANIA DONOVANI CHAGASI KANAMICINA

— 0 ugr/ml - - - 50 ugr/ml - - - 100 ugr/ml ····· 200 ugr/ml

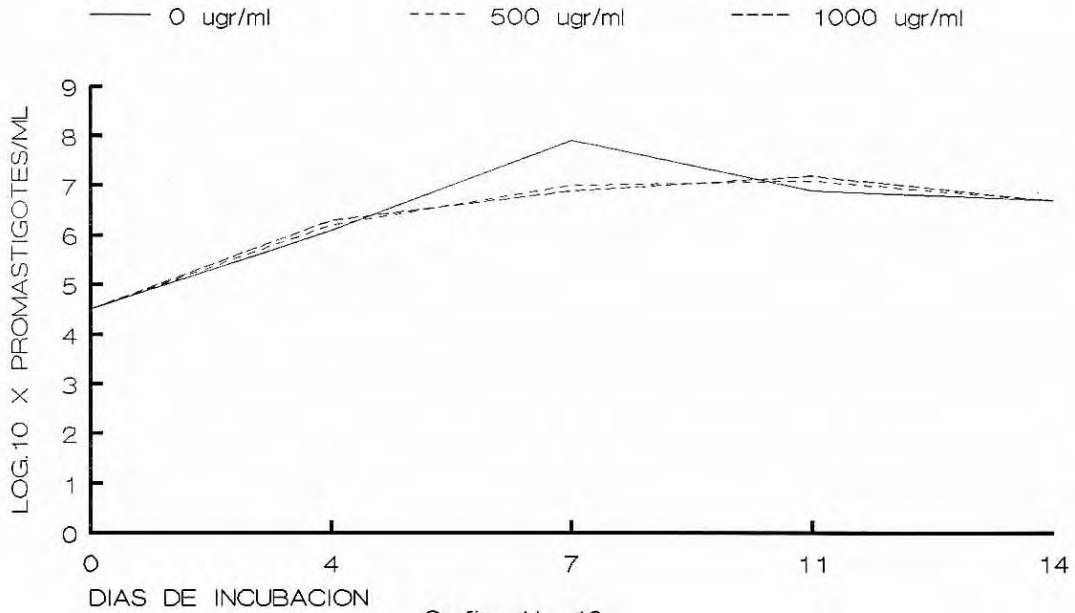


LEISHMANIA MEXICANA AMAZONENSIS KANAMICINA

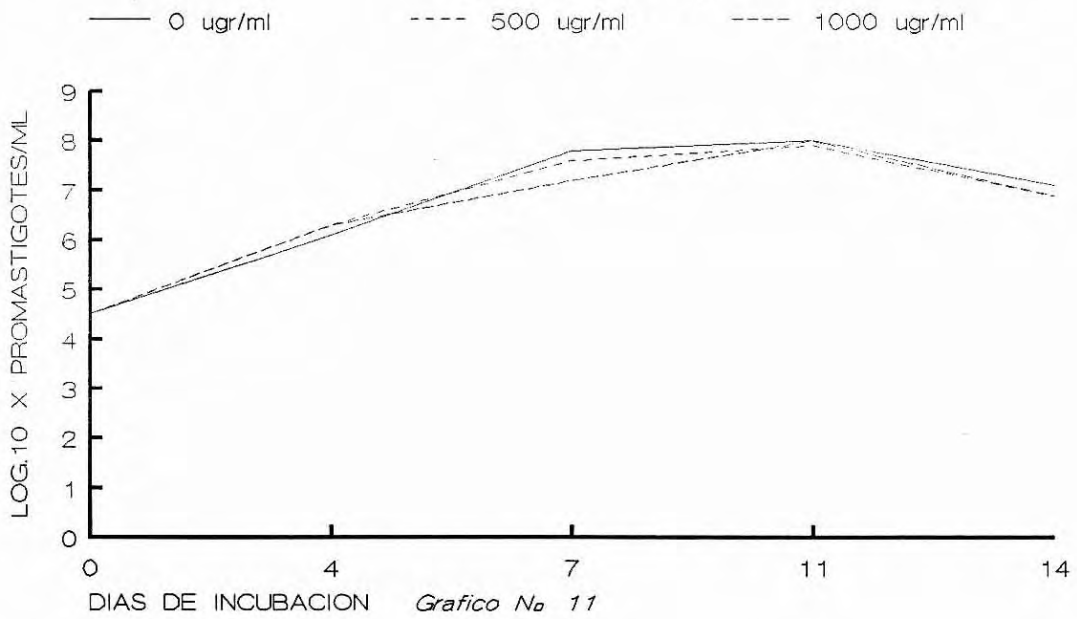
— 0 ugr/ml - - - 50 ugr/ml - - - 100 ugr/ml ····· 200 ugr/ml



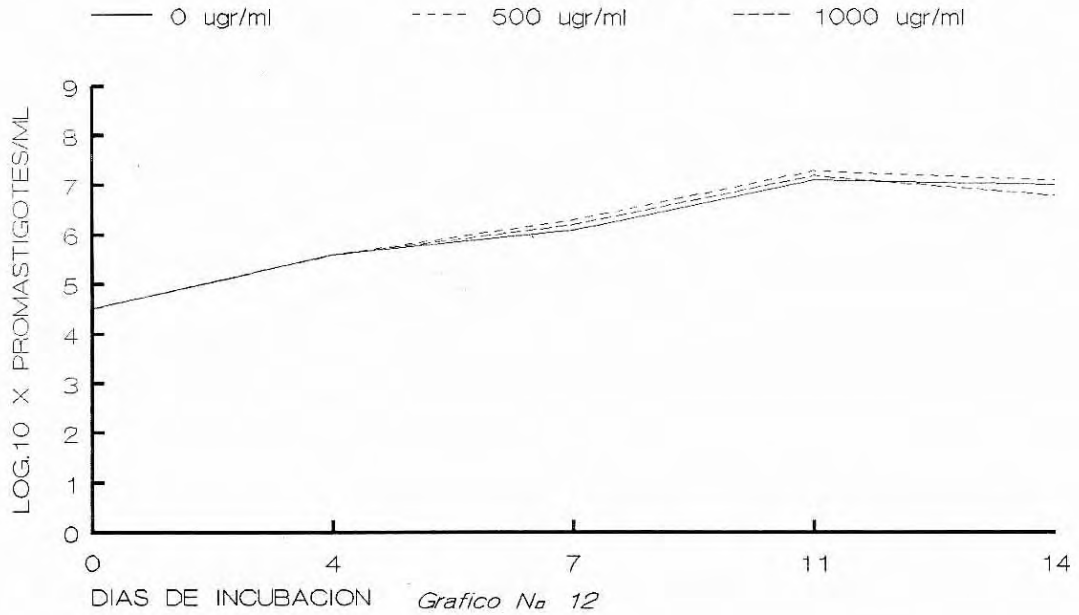
LEISHMANIA BRAZILIENSIS BRAZILIENSIS PENICILINA G



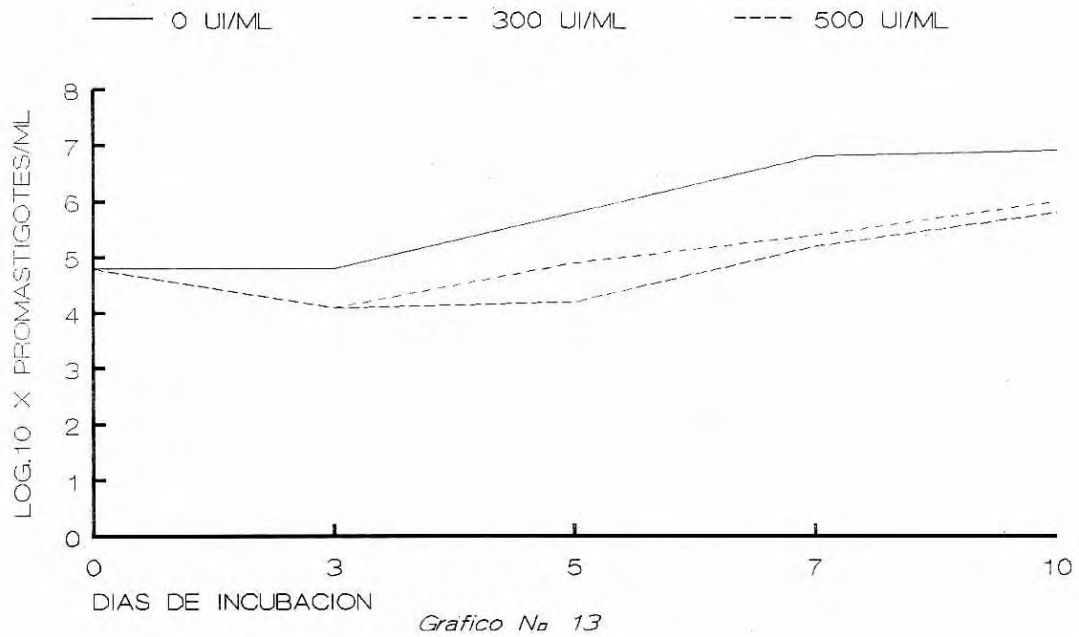
LEISHMANIA DONOVANI CHAGASI PENICILINA G



LEISHMANIA MEXICANA AMAZONENSIS PENICILINA G

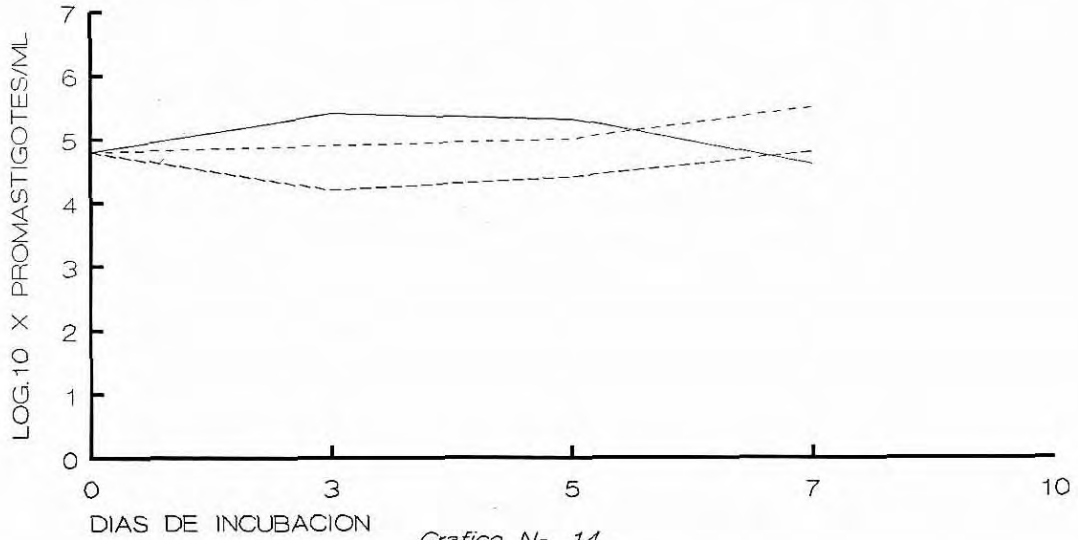


LEISHMANIA BRAZILIENSIS BRAZILIENSIS POLIMIXINA



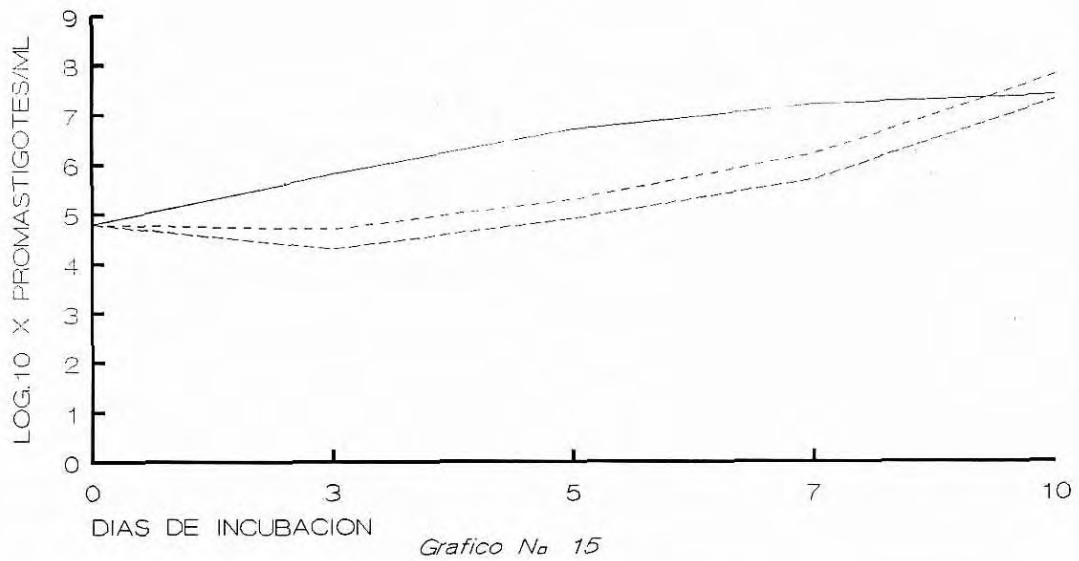
LEISHMANIA DONOVANI CHAGASI POLIMIXINA

— 0 UI/ML - - - 300 UI/ML - - - 500 UI/ML



LEISHMANIA MEXICANA AMAZONENSIS POLIMIXINA

— 0 UI/ML - - - 300 UI/ML - - - 500 UI/ML



DISCUSION

El incremento poblacional de promastigotes de *Leishmania* en cultivo, en contacto con antimicrobianos y en distintas concentraciones del mismo, varía según el tipo de antimicrobiano utilizado y la cepa de *Leishmania* cultivada.

El ácido nalidíxico en concentraciones de 20 - 50 ug/ml impide el crecimiento de muchos bacilos Gram-negativos (7) y no sería conveniente emplearlo en cultivo de *L. b. braziliensis* debido a que disminuye notoriamente el número de promastigotes de la especie. Sin embargo, podría utilizarse en cultivos de *L. d. chagasi* y *L. m. amazonensis* en un rango de concentración de 30 - 100 ug/ml y 30 - 50 ug/ml respectivamente favoreciendo así la no contaminación de los cultivos de estas cepas o la posible eliminación de bacilos Gram-negativos de las mismas.

En la concentración de 100 ug/ml la fase logarítmica de la cepa *L. m. amazonensis* se observó ligeramente inhibida hasta el día séptimo y a partir del cual recuperó su crecimiento comportándose similarmente al control. Este incremento poblacional podría deberse a la pérdida de actividad del bactericida y al crecimiento exuberante que *L. m. amazonensis* siempre presenta en cultivo.

La ampicilina es efectiva contra cocos y bacilos Gram-negativos en concentraciones de 3 - 6 ug/ml y 0.02 - 1.6 ug/ml respectivamente (7) y no presenta efecto desfavorable en el aumento de la población de promastigotes utilizando concentraciones tan altas como 100, 200 y 300 ug/ml en ninguna de las tres especies de *Leishmania* estudiadas, lo cual permite su uso con confiabilidad en cultivos.

La disminución en la población de promastigotes en *L. b. braziliensis* en presencia de ampicilina 100 ug/ml pudo deberse no a la concentración del antimicrobiano en sí, sino a la contaminación accidental con hongos que se presentó en el cultivo. Caso semejante ocurrió en el cultivo control de la cepa de *L. d. chagasi* a partir del día quinto.

La kanamicina es muy activa en concentraciones de 0.4 - 4.0 ug/ml contra estafilococos (7). Sigma ha utilizado este antibiótico contra

bacterias Gram-positivas en cultivo celular sugiriendo concentraciones de trabajo de 10ml/L y 2ml/L si se emplea la kanamicina de 10 mg/ml solución y 50 mg/ml solución respectivamente. La kanamicina podría ser empleada en concentraciones de 50 - 200 ug/ml en cultivo de *L. b. braziliensis*, *L. d. chagasi* y *L. m. amazonensis* sin que se altere la población de éstas y además se favorece el cultivo de una contaminación por estafilococos o bacterias Gram-positivas. La disminución en el crecimiento de parásitos se produce a partir del día tercero y los promastigotes aún se encuentran en fase logarítmica de crecimiento lo cual es una ventaja. Se recomienda el uso de kanamicina en cualquiera de las concentraciones usadas en las tres cepas de *Leishmania* experimentada. Sin embargo, sería preferible utilizar las concentraciones menores del antimicrobiano.

La penicilina G es muy efectiva contra todos los bacilos Gram-positivos y muchos bacilos Gram-negativos (7). Esta ha sido adicionada en cultivo de *Leishmania* en concentraciones de 50 - 300 UI/ml (8, 9, 10, 11) y de 10.000 UI/5ml (12) para eliminar gérmenes. En nuestro estudio el emplear penicilina G hasta concentraciones de 1000 ug/ml permitió conocer que éste por su gran espectro antimicrobiano puede ser utilizado en cualquier cultivo de *Leishmania* sin alterar el crecimiento de los parásitos.

La polimixina B es utilizada algunas veces contra bacilos Gram-negativos (7). El número de flagelados en todas las cepas de *Leishmania* presentó una reducción muy notoria hasta el día tercero de incubación del cultivo y luego un incremento progresivo de parásitos. Tal comportamiento nos permite inferir que la polimixina B ejerce un efecto adverso en el aumento del número de promastigotes *in vitro* en los primeros días del cultivo y el cual no puede continuar quizás a una posible inactivación rápida del antimicrobiano.

Algunas veces puede observarse resistencia de los microorganismos contaminantes a los antimicrobianos utilizados durante los cultivos de *Leishmania*. Ello podría obviarse analizando el tipo de contaminante tan pronto se detecte la contaminación y utilizando el antimicrobiano apropiado. Además se sugiere comenzar la descontaminación con las concentraciones bajas de los bactericidas evaluados e

ir aumentando la concentración de éstos poco a poco hasta obtener una completa eliminación de los microorganismos. En aquellos casos donde se observe nuevamente resistencia se recomienda emplear cualquiera de los otros antibióticos evaluados en el presente trabajo como alternativas.

SUMMARY

The effect of several antibiotics (nalidixic acid, ampicillin, kanamycin, penicillin G and polymyxin B) concentrations was evaluated on promastigote growth of *Leishmania braziliensis braziliensis*, *Leishmania donovani chagasi*, and *Leishmania mexicana amazonensis* which had been maintenance *in vitro*. Penicillin G and ampicillin could be added until concentrations of 1000 ug/ml and 500 ug/ml, respectively, without any parasite alteration. Promastigote populations of all strains decreased after the addition of polymyxin B; consequently, this antibiotic is not recommended or useful in *Leishmania* cultures. Nalidixic acid and kanamycin may be added to *Leishmania* cultures, considering the particular *Leishmania* strain and the antimicrobial concentration chosen for it.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al Doctor Luis Carlos Orozco V., Jefe del Grupo de Micobacterias, por sus sugerencias en los aspectos bacteriológicos y estadísticos. Este trabajo se realizó con los auspicios del Instituto Nacional de Salud de Colombia y del Grant AI-2018 del National Institute of Health de Estados Unidos de América.

BIBLIOGRAFIA

1. **Evans DA.** Kinetoplastida. In: Taylor AER & Baker JR, eds. Methods of cultivating parasites *In vitro*. London: Academic Press Inc., 1978: 55-78 .
2. **Evans DA.** *Leishmania*. In: *In vitro* methods for parasite cultivation. London: Academic Press Inc., 1987: 1-36.
3. **Lamy L, Wonde T, Lamy H.** Activite de l'amphotericine B sur *Leishmania donovani* dans les macrophages de souris entretenus *in vitro*. Bull Soc Pathol Exotiq 1966; 59: 964-8.
4. **Jiménez G De, Ercoli N.** Effect of drugs on various *Leishmania* isolates and succinic dehydrogenase inhibition. Exp Parasitol 1965; 17: 302-8.
5. **Neal RA, Croft SL.** An *in vitro* system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. J Antimicrob Chemother 1984; 463-75.
6. **Duque S, Cáceres E, Corredor A.** Comportamiento de flagelados de la Familia Trypanosomatidae en dos medios de cultivo modificados. Biomédica 1988; 8: 21-7.
7. **Braude AI.** Antimicrobial drug therapy. Vol VIII. Philadelphia: WB Saunders, 1976: 1-218
8. **Ray R, Ghose AC.** Cultivation of *Leishmania donovani in vitro* in a high yielding liquid culture medium. Indian J Med Res 1980; 71: 203-6.
9. **Chaudhuri G, Chatterjee TK, Banerjee AB.** Growth factor requirements for *in vitro* growth of *Leishmania donovani*. Indian J Med Res 1982; 76: 157-63.
10. **Hockmeyer WT, Kager PA, Rees PH Hendricks LD.** The culture of *Leishmania donovani* in Schneider's insect medium: its value in the diagnosis and management of patients with visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75: 861-63.
11. **Rassam MB, Al-Mudhaffar SA.** The primary isolation of *Leishmania donovani* from Iraq on different culture media. Ann Trop Med Parasitol 1979; 73: 345-47.
12. **Neal RA.** *Leishmania major*: culture media, mouse strains, and promastigote virulence and infectivity. Exp Parasitol 1984; 57:269-73.