

## MEIO DE CULTURA LÍQUIDO ESTERILIZÁVEL PELO CALOR PARA *TRYPANOSOMA CRUZI*

A LIQUID AND HEATED MEDIUM FOR *TRYPANOSOMA CRUZI* (a)

OCTAVIO BARACCHINI (b)

### SUMMARY

A liquid and heated medium for *Trypanosoma cruzi*, without red cells and protein precipitates, that gives 300 mg of dry *Trypanosoma cruzi* per 1 000 c.c., is described.

### INTRODUÇÃO

O largo emprégo da reação de GUERREIRO & MACHADO<sup>1</sup>, na rotina sorológica dos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo, trouxe, como conseqüência, a necessidade de maiores quantidades de *Trypanosoma cruzi* para o preparo de antígeno para a referida reação, o que nos levou a apresentar este trabalho. Os meios de cultura mais comumente usados para o cultivo desse protozoário são os meios difásicos (NOVY & McNEAL<sup>2</sup>, BONACCI<sup>3</sup>, SENEKJIE<sup>4</sup>, CHANG<sup>5</sup>) e várias modificações desses meios. A necessidade da incorporação de sôro ou sangue total, que contém os fatores essenciais para o cultivo do *T. cruzi* "in vitro" torna os meios de cultura citados pouco práticos, pois exige operações que não raro contribuem para a contaminação dessas preparações. Os referidos meios são, na verdade, excelentes para a conservação das culturas; porém, o mesmo não acontece para o estudo químico dos tripanosomas, devido aos precipitados de proteínas, hemácias etc.

Foram LITTLE & SUBBAROW<sup>6</sup> (1945) e SAMPATH & LITTLE<sup>7</sup> os primeiros a mostrar que as hemácias incorporadas aos meios de cultura para o *T. cruzi* podiam ser aquecidas sem que o rendimento da cultura fôsse prejudica-

do. Posteriormente, novos meios foram descritos: LITTLE & OLESON<sup>8</sup>, CITRI & GROSSOWICZ<sup>9</sup>, WARREN<sup>10</sup>, BONÉ & PARENT<sup>11</sup> e NEAL & MILES<sup>12</sup>. Dêsses meios, os de Citri e Parent, são os de composição menos complexa e quase quimicamente definidos.

O meio de cultura que ora apresentamos é um meio complexo, pois na sua fórmula entram sangue, cérebro, coração e fermentos; é, porém, um meio prático, esterilizável pelo calor e que proporciona a obtenção de quantidade apreciáveis de *T. cruzi*.

### MATERIAL E MÉTODOS

*Preparação do meio básico* — Colocar 750 cm<sup>3</sup> de água destilada no copo de um liquidificador. Acionar o aparelho e, aos poucos, adicionar 100 g de coágulos de sangue humano, previamente colocados sobre uma folha de papel filtro. Deixar funcionar o aparelho durante 2 minutos. A seguir, adicionar o conteúdo de um ôvo de galinha à mistura de sangue e ligar o aparelho por mais 2 minutos. Passar o líquido para um balão de vidro de dois litros e autoclavar a 115°C, durante 15 minutos (não prolongar este aquecimento). Após a autoclavagem, filtrar a quente em papel<sup>1</sup> e refiltrar as pri-

(a) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Ribeirão Preto).

(b) Do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Ribeirão Preto).

meiras porções até a obtenção de um líquido pardo-avermelhado, transparente e sem depósito.

*Meio de cultura* — Meio básico: 1 000 cm<sup>3</sup>; infusão de cérebro e coração (Oxoid ou Difco): 37 g; extração de levedura (Oxoid ou Difco): 5g. Deixar em repouso durante 10 minutos; agitar para dissolver. Distribuir em balões ou vidros em quantidades não superiores à metade da capacidade dos recipientes. Tamponar com algodão e autoclavar a 115°C, durante 15 minutos (não prolongar este aquecimento). O pH deverá ser de 7.2 a 7.6. Usando-se produtos Oxoid ou Difco, não será necessário acertar o pH.

*Amostras de T. cruzi utilizadas* — Amostras B.T. e M.P.P., gentilmente cedidas pelo Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; amostras n.º 34, n.º 5 e n.º 15 e Y, fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Central).

*Técnica de cultivo* — Repicar o conteúdo de um tubo de cultura de qualquer meio difásico para cada 100 cm<sup>3</sup> do meio descrito. Incubar em estufa a 28°C, durante 10 dias, agitando diariamente os recipientes. O repique de meio líquido para meio líquido deverá ser de 10 em 10 dias, na proporção de 10%.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio descrito permite um rendimento médio de 300 mg de pó seco de *T. cruzi* por 1 000 cm<sup>3</sup>, após 10 dias de incubação, em estufa a 28°C. Todas as amostras de *T. cruzi* utilizadas neste trabalho apresentaram o mesmo rendimento, com exceção da amostra Y que sempre apresentou média de rendimento inferior a 300 mg por 1 000 cm<sup>3</sup>. Sendo líquido e esterilizável pelo calor, pode ser empregado em grandes volumes, o que facilita a obtenção de grandes quantidades de *T. cruzi*.

Não foi nosso objetivo proceder a um estudo comparativo entre o meio descrito e os já publicados. O nosso interesse foi a obtenção de um meio de cultura para o *T. cruzi*, de preparo simples,

esterilizável pelo calor, utilizável em grandes volumes e que fôsse livre de precipitados de proteínas e de hemácias.

#### RESUMO

É descrito um meio de cultura líquido, esterilizável pelo calor, isento de hemácias e precipitados de proteínas, permitindo um rendimento médio de 300 mg de pó seco de *T. cruzi* por 1 000 cm<sup>3</sup>.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Bras. Méd. 27:225-226, 1913.
2. NOVY, F. G. & McNEAL, W. J. — On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J. Infect. Dis. 1:1-30, 1904.
3. BONACCI, H. — Nuevo medio de cultivo para el *Trypanosoma cruzi*. Chagas, 1909. Rev. Inst. Bacteriol. 6:242-247, 1934.
4. SENEKJIE, H. A. — Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. Amer. J. Trop. Med. 23:523-531, 1943.
5. CHANG, S. L. — Studies of haemoflagellates. I. A semi-solid medium and fluid medium with a solid for growing various species of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 80:164, 1947.
6. LITTLE, P. A. & SUBBAROW, Y. — A practical liquid medium for cultivation of *Trypanosoma cruzi* in large volumes. J. Bact. 50:57-60, 1945.
7. SAMPATH, A. & LITTLE, P. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in liquid media. J. Bact. 57:265, 1949.
8. LITTLE, P. A. & OLESON, J. J. — The cultivation of *Trypanosoma cruzi*. J. Bact. 61:709-714, 1951.
9. CITRI, N. & GROSSOWICZ, N. — A partially defined culture medium for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 13:273-278, 1955.
10. WARREN, L. G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. J. Parasit. 46:529, 1960.
11. BONÉ, G. J. & PARENT, G. — Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 31:261-266, 1963.
12. NEAL, R. A. & MILES, A. R. — Heated blood agar medium for the growth of *Trypanosoma cruzi* and some species of *Leishmania*. Nature (London) 198:210-211, 1963.