

MEIO DE CULTURA PARA *TRYPANOSOMA CRUZI* ESTERILIZÁVEL PELO CALOR (1)

A HEAT STERILIZABLE CULTURE MEDIUM FOR *TRYPANOSOMA CRUZI*

ETTORE RUGAI (2)
RACHEL TEIXEIRA RUGAI (2)

SUMMARY

A heat sterilizable culture medium for *Trypanosoma cruzi* is described. The transfers from medium to medium give positive cultures indefinitely. The production of trypanosomes per ml of medium is 40×10^6 as an average.

INTRODUÇÃO

Meios de cultura esterilizáveis pelo calor foram descritos por LITTLE & SUBBARROW⁶, SAMPATH & LITTLE⁸, LITTLE & OLESON⁷, FREITAS & HAUSMANN⁴ e BONÉ³. Esses meios porém, não dão rendimento satisfatório. Os meios de WARREN⁹ e BARACCHINI¹, com solução extrativa de sangue, complementada com caldo desidratado de coração e cérebro (3), dão bom rendimento, porém, dependem da importação dêste caldo, que, além do alto custo, freqüentemente não é encontrado a venda no Brasil.

Baseados no uso do sangue coagulado preconizado por LITTLE & SUBBARROW⁶ e na observação de FREITAS & HAUSMANN⁴ sobre a importância do pH na eluição do fator ou fatôres de crescimento, procuramos preparar um meio com as seguintes qualidades: a) produzir culturas ricas e repiques indefinidamente; b) ser esterilizável pelo calor; c) ser limpo e não dar precipitação com o desenvolvimento dos tripanossomos; d) produzir culturas com poder antigênico; e) dar repiques com pequeno volume de inóculo; f) conservar a viabilidade da cultura durante longo tempo;

g) ser de custo relativamente baixo e preparo e reprodução fáceis; h) para determinados fins, produzir culturas sem formar agrupamentos; i) conservar suas propriedades durante longo tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

Meio de cultura

a) Baço de boi	300,0	g
Figado de boi	100,0	g
Cérebro de boi	100,0	g
PO ₄ HNa ₂ 12H ₂ O	5,0	g
PO ₄ Na ₃ 12H ₂ O (4)	8,0	g
CaCl ₂ .6H ₂ O (4)	7,0	g
NaCl	3,5	g
KCL	0,4	g
Glicose	2,0	g
Proteose-Peptona n. ^o 3		
Difco (5)	10,0	g
Água destilada	1000,0	ml
b) Hemácias desnaturadas	10,0	g

(1) Trabalho realizado na Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Difco ou Oxoid.

(4) Eliminado sob a forma de fosfato tricálcico, tendo como finalidade a clarificação do meio em pH alcalino.

(5) Podem ser empregadas outras peptonas desde que testadas.

Método de preparação

a) Retirar a membrana e a gordura do baço e a cápsula do fígado. Moer o baço, o fígado e o cérebro. Adicionar o fosfato disódico e a água. Levar à fervura durante cinco minutos, com agitação freqüente. Retirar do fogo e adicionar o fosfato trissódico. Agitar e adicionar o cloreto de cálcio, previamente dissolvido em 50 ml de água. Ajustar ao pH 7,8 e levar à fervura durante cinco minutos. Filtrar em papel. Lavar o precipitado colocando água destilada sobre a massa, no funil, até completar 1 100 ml de caldo. Nestes 1 100 ml de caldo adicionar a peptona, o cloreto de sódio, o cloreto de potássio e a glicose. Aquecer à fervura. Ajustar ao pH 7,6. Filtrar em papel e completar, se necessário, 1 000 ml com água destilada.

b) Hemácias desnaturadas

Sangue humano sem plasma (*)	100 ml
Álcool 99° Gl	200 ml

Adicionar o álcool ao sangue, aos poucos, agitando sempre. Deixar em repouso aproximadamente 12 horas. Colocar a massa em funil Büchner, sobre papel de filtro e fazer o vácuo para eliminar o álcool. Pulverizar o bloco formado e terminar a secagem, ao ar livre, em camadas finas. Quando completamente secas, conservam-se em temperatura ambiente sem perder a eficiência, durante mais de 6 meses.

Distribuição

a) Para conservação das culturas — Em tubos de 20 x 200 mm, colocar 0,1 g de hemácias desnaturadas e 10 ml do meio líquido.

b) Para produção do antígeno — Em balões de fundo chato de dois litros, colocar 10 g de hemácias desnaturadas e 1 litro do meio líquido.

Esterilização

Quando em tubos com 10 ml de meio, esterilizar a 115°C, durante 30 minutos. Quando em balões com 1 litro de meio, esterilizar a 115°C, durante 40 minutos.

Contrôle da esterilidade

Controlar a esterilidade durante 48 horas a 37°C e depois, 5 dias, em temperatura ambiente.

Semeadura

Usar culturas ricas e vigorosas. Para conservação das amostras de tripanossomos, semear 0,1% e para a produção de tripanossomos para antígeno ou outros fins, semear 1%. Para abreviar o tempo de incubação, semear 5% ou mais.

Incubação

Incubar a 28°C, durante 6 a 15 dias, agitando 2 a 3 vezes ao dia.

Colheita

Agitar o meio. Deixar em repouso durante 5 minutos para sedimentação das hemácias. Decantar. Centrifugar o sobrenadante a 3 000 rotações durante 20 minutos. Decantar. Suspender o sedimento em solução fisiológica na proporção de 10 ml por litro de meio centrifugado. Centrifugar a 1 000 rotações durante 1 minuto para sedimentação das hemácias ainda presentes. Decantar o sobrenadante que encerra só tripanossomos. Centrifugar e lavar mais duas vezes por centrifugação.

RESULTADOS

A eficiência do meio foi testada com as amostras de tripanossomos n.º 34, 15, 5, BT e Y. Estas amostras estão sendo mantidas neste meio há dois anos, com mais de 40 repiques sucessivos.

Este meio produz, em média 40×10^6 tripanossomos por ml, com turvação correspondente ao tubo n.º 4 da escala de sulfato de bário MacFarland. Dá culturas com inóculo de 0,01%. Conserva a viabilidade das culturas durante 60 dias, no mínimo, com inóculo de 0,1%. Os tripanossomos crescem dispersos. A massa de tripanossomos centrifugados apresenta côr acinzentada e livre de partículas estranhas.

(*) Obtido em Bancos de Sangue, que o rejeitam depois de aproveitar o plasma. A preferência é devida à facilidade com que pode ser obtido. Sangue de coelho ou de boi também pode ser empregado.

O meio produz culturas com poder anti-gênico que atinge, no mínimo, 1:80, tanto com o antígeno metílico, preparado segundo BARACCHINI², como com a suspensão de tripanossomos a 1:10. A técnica empregada nestas dosagens foi a de KOLMER⁵ (desvio do complemento).

De custo relativamente baixo, preparo e reprodução fáceis, este meio conserva suas propriedades durante meses, se protegido da evaporação.

RESUMO

Foi descrito um meio de cultura líquido para tripanossomos, esterilizável pelo calor.

O meio dá repiques indefinidamente. Produz em média 40×10^6 de tripanossomos por ml de meio.

Agradecimentos — Agradecemos ao Dr. Manoel de Britto e Silva pelas amostras de tripanossomos que nos forneceu. Ao Dr. Miécio de Azevedo, D. Altemízia e Sr. Antônio Amorosino pela colaboração que nos prestaram na titulação dos抗ígenos.

REFERÉNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARACCHINI, O. — Meio de cultura líquido esterilizável pelo calor. Rev. Inst. Adolfo Lutz 22/23:91-92, 1962/1963.
2. BARACCHINI, O.; COSTA, A & CARLONI, J. — Emprégo do calor e do metanol no preparo de antígeno de "Trypanosoma cruzi". Hospital (Rio) 68(6): 1318-19, 1965.
3. BONE, G. J. & PARENT, G. — Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 31(2):261-266, 1963.
4. FREITAS, G. & HAUSMANN, R. — Sobre o crescimento de *Schizotrypanum cruzi* em meios livres de proteinas nativas. An. Acad. Bras. Cienc. 26(1): 531-535, 1954.
5. KOLMER, J. A.; SPAULDING, E. H. & ROBINSON, H. W. — Approved laboratory technic. 5. ed. New York, Appleton, c1951. p. 814-820.
6. LITTLE, P. A. & SUBBAROW, Y. — A practical liquid medium for cultivation of *Trypanosoma cruzi* in large volumes. J. Bact. 50(1):57-60, 1945.
7. LITTLE, P. A. & OLESON, J. J. — The cultivation of *Trypanosoma cruzi*. J. Bact. 61(6):709-714, 1951.
8. SAMPATH, A. & LITTLE, P. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in liquid media. J. Bact. 57(2):265, 1949.
9. WARREN, L. G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. 1. Effect of culture age, and substrate concentration on respiratory rate. J. Parasit. 46(5): 529-539, 1960.

Recebido para publicação em 16 de Junho de 1966.

