

NOVO MEIO LÍQUIDO AUTOCLAVÁVEL ISENTO DE SANGUE, PARA ISOLAMENTO PRIMÁRIO DE LEISHMANIAS DE LESÕES TEGUMENTARES: I – SUA POTENCIALIDADE NO ESTUDO DA BIOLOGIA DOS TRIPANOSOMATÍDEOS *

William Barbosa ** Ana Cândido Czerewuta *** Osvaldira Seabra Oliveira ***
Raquel Lopes de Oliveira ****

RESUMO

Novo meio, inicialmente denominado, BHYMI (Brain-heart-yeast-meat infusion) logo Rq., constante basicamente de extrato de cérebro, extrato de coração, extrato de carne, extrato de levedura, mais glicose, cloreto de sódio e água, é meio monofásico de baixo custo, disponível no comércio ou facilmente preparado com matérias primas locais, no laboratório, de fácil esterilização, claro, facilitando a coleta e contagem dos organismos cultivados; foi usado, inicialmente, como a fase líquida dos meios difásicos NNN ou Ducrey, logo como meio de cultura único (exclusivo) para cultivo de leishmanias.

É capaz de isolar primariamente leishmania de lesões, em proporção bastante razoáveis, manter cepas isoladas e de funcionar mesmo após ser guardado por 12 meses à temperatura ambiente, como líquido ou por mais tempo quando liofilizado. Seu pH ótimo é de 7.4 a 7.6.

Quando enriquecido com soro fetal bovino (S. F. B) na proporção de 5, 10, 20 e/ou 30% potencia o crescimento das cepas de leishmanias e permite o cultivo de *Trypanosomas sp*; usado em temperatura mais elevada condiciona o aparecimento de formas amastigotas dos tripanosomatídeos.

Quando associado a soro de pato e/ou na presença de cloridrato de tetraciclina estimula a metaciclogênese do *Trypanosoma cruzi*.

Associado ao sangue (plasma e/ou soro) de galinha estimula a transformação de promastigota de leishmania sp para amastigota em temperatura adequada (35°C).

Enriquecido com carvão de sangue de feto bovino, de bovino adulto e de pato ("Charcoal" – sangue dissecado pelo calor lento e permanente, desidratado ou não, previamente, a vácuo, e moído finamente, para se transformar em pó) – permite o crescimento exuberante de *Trypanosomatídeos* e mantém os atributos que soros e plasmas frescos ou conservados conferem ao meio, sendo muito bom para manutenção e crescimento de *Trypanosoma cruzi*.

Este meio pode ser usado como difásico sendo incorporado à peptona ou ágar, como base, tendo como meio líquido o próprio meio, soros conservados de boi, SFB ou soro de pato, meio 199, meio de Grace ou suplemento líquido de Hanks, dependendo da finalidade do cultivo.

A associação de extrato de flebotomíneos ou de triatomíneos ao meio permitiu também crescimento aumentado das leishmanias.

* – Trabalho do Departamento de Medicina Tropical (Unidade de Investigação Gaspar Viana – UIGV) IPT/UFG com ajuda parcial do CNPq

** – Professor Titular do Departamento de Medicina Tropical - Chefe da Unidade de Investigação Gaspar Viana.

*** – Professoras Assistentes do Departamento de Medicina Tropical

**** – Técnica de Laboratório do Departamento de Medicina Tropical.

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. & OLIVEIRA, R.L.: Novo meio líquido autoclavável, isento de sangue, para isolamento primário de *Leishmanias de lesões tegumentares: I - sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos*. Rev. Pat. Trop. 13(1): 9-24, jan./abr. 1984.

INTRODUÇÃO:

O isolamento das leishmanias reponsáveis pela etiologia de lesões tegumentares é a única maneira possível de se dispor delas, para sua análise taxonômica correta. Fonte de conhecimento indispensável aos estudos epidemiológicos, clínico-imunológicos e imunopatológicos, capazes de trazer contribuições concretas ao esclarecimento de diversas dúvidas conceituais no campo da terapêutica e da imunoprofilaxia destas importantes doenças.

Até há pouco tempo todavia, meados da década de 1970, eram escassos os progressos no campo do isolamento de *Leishmanias sp*, de lesões tegumentares, mantendo via de regra os laboratórios a clássica rotina do meio NNN, reminiscência dos trabalhos de NICOLLE em 1908, a que se acrescentava, aqui e ali, algumas modificações, principalmente, substituição de água do líquido de condensação mudada por vários autores para glicose, solução de Locke, de Hanks ou outras misturas de cultura de tecidos (DULBECCO, PARKER 199 etc).

Também foi observado pro WALTON e cols (1977), interferência no crescimento de leishmania de uma mesma cepa, em função do nutriente agar, da parte sólida do meio NNN - quando se usava o agar Oxoid 2.8g% ou Difco C47 4.0g%.

Recentemente o meio líquido bifásico composto de infusão de cérebro-coração suplementado com 3% de sangue de coelho desfibrinado tem sido usado com sucesso no cultivo de *L. tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. enrietti* (Maue Tropical Diseases Research

Titisee, Fed. Rep. of Germany 4-8, oct 1978) 1979.

Mais recentemente, então, meios monofásicos semi-definidos têm sido desenvolvidos contendo vários sais, glicose, amino ácidos e fontes de proteínas. Estes nutrientes têm sido adicionados em forma de lactalbumina (hidrolizado) extrato de sangue e soro fetal bovino, que, presumivelmente, contém fatores para ótimos crescimentos e também meios específicos para crescimento de células de mamíferos ou insetos e até meios quimicamente definidos têm sido usados com sucesso. DWYER (1972), MANSOUR e cols (1972), STEIGER & STEIGER (1976), BERENS' e cols (1976), HENDRIKS (1975-78) VASSAL e cols (1974), SCHILDS e cols (1978).

Toda esta evolução ao longo da década de 1970, resultou no conhecimento de um maior número de espécies ou sub-espécies de leishmanias e foi coincidente com um sólido avanço no campo da imunologia e da tecnologia relacionada com as técnicas taxonômicas, como o estudo das enzimas, da densidade flutuante do DNA do Núcleo e Cinetoplasto, com o aperfeiçoamento das técnicas de preservação das leishmanias pelo frio e mais recentemente, mais e mais, o isolamento de novos estoques de leishmanias para processamento taxonômico, o que em última instância há de diferenciar de uma vez, esse intrigante protozoário; tornando conhecido sua correta distribuição geográfica nos Continentes, nos Países e nos Estados, sua natureza real, sua patogenicidade e em contrapartida estabelecer metodologia adequada ao seu controle.

Este trabalho se baseia na observação de que a substituição da fase líquida

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. & OLIVEIRA, R.L.: Novo meio líquido autoclavável, isento de sangue, para isolamento primário de *Leishmanias de lesões tegumentares: I - sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos*. Rev. Pat. Trop. 13(1): 9-24, jan./abr. 1984.

do meio Ducrey, (meio constituído de 60% de extrato de batata, com 40ml de glicerina, 2.5 gramas de ágar, 10 gramas de peptona e 5 gramas de cloreto de sódio, associado ao sangue de coelho desfibrinado, mais ou menos 3%) - por meio líquido constituído de extrato de cérebro-coração 37 gramas, extrato de carne 5 gramas, extrato de levedura 5 gramas, glicose 2 gramas, cloreto de sódio 4 gramas, em 1.000ml de água permitiu não só crescimento muito bom de *Leishmanias sp* mantidas em nosso laboratório, como isolamento primário e manutenção de cepas por mais de 60 dias.

Em vista disto o meio foi observado, isoladamente, inicialmente como meio líquido monofásico, também como difásico, usando ágar ou peptona como base e posteriormente em diversas investigações enriquecidas com outros meios, soros de animais, plasmas e extrato de insetos.

MATERIAL E MÉTODOS:

O novo meio, substancialmente se constitui em um meio líquido monofásico, isento de sangue, esterilizável por autoclavagem ou filtração em Milipore cuja a fórmula é a seguinte: Extrato de cérebro-coração (Difco), 37 gramas; Extrato de carne (Difco), 5 gramas; Extrato de levedura (Difco), 5 gramas; Glicose (Merck), 2 gramas; Cloreto de sódio (Merck), 4 gramas e Água (q. s. p) 1.000ml.

O estudo da potencialidade deste meio foi dirigido às seguintes finalidades:

1 - ISOLAMENTO PRIMÁRIO DE LEISHMANIAS DE LESÕES RECENTES E ANTI-

GAS, INCLUSIVE METASTÁTICAS TARDIAS.

Para o isolamento de leishmanias tegumentares, recentes ou tardias, o material foi colhido de todos os pacientes com o diagnóstico suspeito de leishmaniose que compareceram ao serviço durante o período pré-estabelecido de 24 meses. O material foi colhido por meio de raspado das bordas das lesões, por biópsia por "punch" ou por injeção de soro e aspiração com seringas de 1ml e agulha intradérmica descartável. Concomitantemente, se fazia esfregaços em lâminas e biópsias para exame histopatológico e para pesquisa de leishmania. O material era inoculado então em pelo menos 3 meios de cultura - NNN, 199 mais soro fetal bovino ou Shneider e o novo meio que estava sendo provado. O material era examinado nos 7 primeiros dias e depois até 21 dias quando era desprezado.

2 - CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE MASSA DE LEISHMANIAS PARA OBTENÇÃO DE ANTIGENOS SOLÚVEIS E PARTICULADOS.

A capacidade de produção de massa de leishmania para obtenção de antígenos solúveis e particulados, foi realizado através de determinação de curvas de crescimento, de estoques, ou cepas de leishmanias estabilizadas, inicialmente, no novo meio, sozinho e logo com ele enriquecido com soro fetal bovino, meios de cultivo de células de mamíferos, de inseto, extrato de inseto, soro de bovino adulto e sangue ou plasma de aves, ou o seu "Charcoal".

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. & OLIVEIRA, R.L.; *Novo meio líquido autoclavável, isento de sangue, para isolamento primário de Leishmanias de lesões tegumentares: I - sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos. Rev. Pat. Trop. 13(1): 9-24, jan./abr. 1984.*

3 - USO PARA MANUTENÇÃO DE CEPAS POR LONGOS PERÍODOS.

Para verificação de sua capacidade de manter cepas de leishmanias por longos períodos - várias cepas foram testadas por períodos variáveis de 60 a 360 dias ou mais em repiques sucessivos, quinzenais, ou durante períodos mais longos - 3 meses em geladeira.

4 - CAPACIDADE DE SER USADO A TEMPERATURAS ELEVADAS MAIORES QUE 32°C e 35°C, VISANDO A TRANSFORMAÇÃO DE PROMASTIGOTAS EM AMASTIGOTAS.

Verificando sua potencialidade em permitir a transformação de promastigotas de *Leishmania sp* para amastigota, e sua posterior reversão, o meio foi usado a temperatura elevada de 32°C - 35°C - 37°C, em que as amostras eram introduzidas diretamente sem adaptação prévia. Além do meio isoladamente, ele também foi usado associado ao soro fetal bovino S.F.B. e ao soro de pato e de galinha em percentagens variáveis de 5 a 30%. Estes experimentos foram comparados com outros meios.

5 - CAPACIDADE DE MANUTENÇÃO DA CARACTERÍSTICA DO ANTÍGENO PARTICULADO DAS FORMAS CRESCIDAS NELE EM TEMPERATURAS NORMAIS E "ANORMAIS" NOS TESTES DE OBTENÇÃO DE ANTICORPO IMUNOFLOUORESCENTE (IFI).

A característica do antígeno particulado promastigota e amastigota e amastigoide desenvolvido no meio em temperatura normal 24-25°C e temperaturas elevadas 32 - 35°C foram comparadas com outros meios como o LIT e o 199 mais soro fetal bovino, quanto à sensibilidade, tipo de coloração e distribuição da fluorescência na membrana celular, no núcleo ou no cinetoplasto.

6 - CAPACIDADE DE MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE DOS PARASITAS EM MEIO DE CULTURA, DOS ORGANISMOS CRESCIDOS EM TEMPERATURAS NORMAIS E ANORMAIS.

A viabilidade dos organismos crescidos neste meio de cultura a temperaturas normais de 24-25°C e "anormais" de 34-35°C foi avaliada pela sua capacidade de desenvolvimento continuado no próprio meio ou em outros meios de cultura.

7 - CAPACIDADE DE MANUTENÇÃO DE "INFECTIVIDADE" PARA MACRÓFAGOS CRESCIDOS NO MEIO, A DIVERSAS TEMPERATURAS.

A capacidade de infectividade para macrófagos de peritônio de camundongos e dos organismos crescidos em temperaturas diversas, foi verificada qualitativamente e quantitativamente.

8 - CAPACIDADE DO MEIO SE MANTER VIÁVEL, EM NATUREZA, OU LIOFILIZADO,

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. & OLIVEIRA, R.L.; *Novo meio líquido autoclavável, isento de sangue, para isolamento primário de Leishmanias de lesões tegumentares: I - sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos. Rev. Pat. Trop. 13(1): 9-24, jan./abr. 1984.*

PARA SER USADO POR PRAZOS IGUAIS OU SUPERIORES A 1 ANO :

O meio foi mantido a temperatura ambiente, envazado em tubos (vidros) usados na comercialização de penicilina, com tampa de borracha, naturalmente como líquido ou liofilizado, e depois usado em prazos variáveis superiores até a 1 ano.

9 - USO DO MEIO NO ESTUDO DA BIOLOGIA DE TRYPANOSOMATÍDEOS EM GERAL, ISOLADAMENTE, E QUANDO ACRESCENTADO DE SORO FETAL BOVINO, SOROS DE AVES (GALINHA-PATO) SORO DE BOVINO (ADULTO) E ANTIBIÓTICOS.

O meio foi usado, isoladamente, para suporte do crescimento dos diversos *Trypanosomatídeos* - *T. cruzi*, *H. pessoai* (*Leptomonas pessoai*) - *Tripanosoma de morcego hastatus hastatus* (*T. marinkelli*). *Leishmanias sp* várias, e também enriquecido com soro fetal bovino, e outros suplementos como soros de aves (galinha-pato), antibióticos, meios de cultura de células, extrato de insetos com a finalidade de se verificar alterações morfológicas, susceptíveis de serem usadas como antígeno ou se constituir em modelos para "Screening" de drogas, eventualmente.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS:

Os resultados encontram-se resumidos neste capítulo; alguns deles serão motivo de futuras publicações, isoladas, quando serão explorados mais amplamente.

1 - Quanto ao isolamento primário de *Leishmanias* de lesões recentes e antigas, inclusive metastáticas tardias, foram cultivados de material colhido em 63 pacientes suspeitos de leishmaniose. Destes, foram comprovados parasitologicamente 17 casos através do exame direto e obteve-se cultivos de 11 destes casos, além de 3 que eram negativos ao exame direto.

Destes isolados, 14 cultivados, mais de 50%, 8 casos, o foram pelo meio Rq - além de outros meios. Tabela 1.

2 - O meio monofásico líquido, realmente, não é muito bom para produção de massa de leishmanias, todavia quando usado como meio bifásico, tendo por base extrato de cérebro-coração (BHI) 38,5g mais Bacto-agar 19g em 1.000ml de água e como fase líquida o meio estudado, observou-se grande produção de organismos. Houve também acentuado incremento na produção de parasitas quando o meio monofásico ou bifásico se associou ao soro fetal bovino (SFB) em várias concentrações, com um ótimo de 10 a 30% para partidas diferentes de SFB; também o mesmo foi observado quando se usou extrato de "flebotomíneo", Tabela 2 e 3, em proporções tão baixas quanto 2.5% e equivalente, até 75% dele.

Curvas de crescimento, comparativas usando os meios 199 + SFB e Ducrey + Rq e Rq sozinho, feitas com a *Leishmania Mt* isolada em 1975, a *Leishmania donovani* e *Leishmania M (misteriosa)* "espécie" de leishmania isolada por nós, ainda não bem identificada. Tabela 4. Finalmente, leishmanias mais antigas, inclusive a *Leishmania L¹*, que depois foi conhecida como cepa Maria, provida de um paciente com espondia e estudada por

BARRAL e Cols., *Leishmania pifanoi*, l. Alceu (cepa antiga do Inst. Adolfo Lutz de São Paulo) e *L. donovani*, todas

creceram relativamente bem alcançando ao fim da curva de estabilização o crescimento máximo de 2×10^7 . Tabela 5.

TABELA 1 - Isolamento de *Leishmanias* no Meio Rq.

ANO	TOTAL DE CASOS EXAMINADOS	TOTAL DE POSITIVOS AO EXAME DIRETO	CRESCIMENTO EM MEIOS DIVERSOS: 1, 2, 3, 4, 5.
1980-1984	063	017	1, 2, 3 x 4 1, 2 x 4 14 1, 5 x 2 1, 3 x 2 1, 3, 4 1, 3

1 = LIT

2 = Rq

3 = RPMI + SFB

4 = 199 + SFB

5 = NNN

TABELA 2 – Crescimento de *L. Mt* (= Eva), recém isolada, no meio Rq + SFB 30% e várias porcentagens de extrato de “flebotomíneo” e em extrato de flebotomíneos isoladamente.

MEIOS	DIA	MÁXIMO DE CRESCIMENTO	
		Log 10	Parasitas/ml x 10 ⁷
Extrato de Flebotomíneo (EF)	8º	6.46	0.2
Rq + SFB 30%	8º	7.09	1.2
Rq + EF 75%	8º	7.23	1.7
Rq + EF 50%	9º	7.21	1.6
Rq + EF 37.5%	9º	7.17	1.5
Rq + EF 25%	9º	7.13	1.3
Rq + EF 12.5%	8º	7.13	1.3
Rq + EF 5%	8º	7.13	1.3
Rq + EF 2.5%	9º	7.14	1.4

TABELA 3 – Crescimento de *Leishmania* Mt no meio Rq associado ao extrato de triatomíneo (ET) 28°C – 0,2ml de 1.48×10^6

MEIOS	DIA	MÁXIMO DE CRESCIMENTO	
		Log 10	Parasitas/ml $\times 10^6$
E.T 100%	10 ^o	6.77	6.0
Rq + E.T. 1%	11 ^o	6.77	6.0
Rq + E.T. 2%	11 ^o	6.77	6.0
Rq + E.T. 5%	11 ^o	6.77	6.0
Rq + E.T. 10%	11 ^o	6.86	7.4
Rq + E.T. 20%	11 ^o	6.91	8.6
Rq + E.T. 50%	11 ^o	6.94	8.8
Rq 100%	11 ^o	6.6	4.4

TABELA 4 – Crescimento de várias Leishmanias – comportamento em Rq monofásico ou Rq como fase líquida do Ducrey ou meio 199 + SFB.

CEPAS	MEIO	DIA	MÁXIMO DE CRESCIMENTO	
			Log 10	Parasitas/mlx 10 ⁶
L. donovani chagasi	Rq	10º	6.17	1.5
	199 + SFB 30%	10º	6.47	3.0
	Ducrey + Rq	9º	6.30	2.0
L. M	199 + SFB	11º	6.00	1.0
L. Mt	Rq	10º	6.30	2.1
	199 + SFB 30%	10º	6.55	4.5
	Ducrey + Rq	10º	6.53	3.4

TABELA 4a – Curva de crescimento de Leishmanias Mt, L. chagasi e Leishmania mexicana amazonensis – inóculo de 8×10^5 /ml 0,5ml.

CEPAS	MEIO	DIA	MÁXIMO DE CRESCIMENTO	
			Log 10	Parasitas/mlx 10^7
L. Mt	Ducrey + 199	11º	6.4	4.4
	Rq	9º	6.53	3.4
L. d. chagasi	Ducrey + 199	10º	6.47	3.00
	Rq	9º	6.30	2.00
L. mexicana amazonensis	Ducrey + 199	9º	6.07	1.2
	Rq	10º	6.39	2.5

TABELA 4b – Estudo comparativo do crescimento de *Leishmania* Mt, *L. donovani* chagasi e *L. m. amazonensis* crescidas comparativamente em meio de Ducrey enriquecido com fase líquida do meio 199 e meio Rq. Inóculo 8×10^7 /ml – (0,5ml/4ml de meio) – 28°C.

CEPAS	MEIO	DIA	MÁXIMO DE CRESCIMENTO		
			Log 10	Parasitas/ml $\times 10^7$	$\cdot 10^8$
L. Mt	Ducrey + 199	8º	7.60	4.0	-
	Rq	8º	7.47	3.0	-
L. chagasi	Ducrey + 199	10º	8.47	-	3.0
	Rq	9º	8.30	-	2.0
L.m.amazonensis	Ducrey + 199	11º	8.17	-	1.5
	Rq	9º	8.39	-	2.5

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. & OLIVEIRA, R.L.; Novo meio líquido autoclavável, isento de sangue, para isolamento primário de *Leishmanias* de lesões tegumentares: I – sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos. Rev. Pat. Trop. 13(1): 9-24, jan./abr. 1984.

TABELA 5 – Máximo de crescimento de promastigotas de várias cepas de *Leishmanias* no meio Rq.

DIA	INÓCULO		2 x 10 ⁶		8 x 10 ⁶		2 x 10 ⁶		0 x 10 ⁶		1 x 10 ⁶		8 x 10 ⁶	
	CEPA	<i>Leishmania</i> Mt	ALCEU	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi	L. d. chagasi
19		50	14	16	18	22	20							
29		72	24	28	20	25								
39		88	45	40	50	50								
49		110	80	54	70	86								
59		130	70	60	105	98								
69		140	105	80	125	140								
79		160	120	90	140	156								
89		180	142	130	170	178								
99		196	158	164	184	190								
109		220	170	170	210	240								
119		220	195	170	270	275								
129		220	208	180	270	280								

3 – O meio se mostrou capaz de sustentar por períodos tão longos quanto 18 meses leishmanias de diversas cepas, principalmente, do complexo mexicano, em passagens sucessivas, notando-se o prolongamento da fase log, até por 12 dias.

4 – O meio foi capaz de sustentar o crescimento de leishmania spp a 35°C ($\pm 0,5$) quando houve transformação de promastigota em amastigota, tanto no meio estudado isoladamente, quanto com o meio enriquecido com SFB, o soro de galinha, em várias proporções com viragem de até 70% das formas promastigotas e amastigotas; um pouco menos que o obtido com os meios RPMI e 199 mais soro fetal bovino.

5 – A potencialidade dos promastigotas mantidos em meio Rq, em ser usado como antígeno particulado para RIFI foi comparado com parasitas da mesma cepa mantidos em LIT, 199, RPMI, NNN e Rq difásico. Observamos que há uma ligeira diferença na resposta quanto ao local de fluorescência, intensidade da fluorescência e títulos da reação.

Houve uma aparente gradação em relação à intensidade de fluorescência de formas promastigotas usadas como antígeno, crescida em diferentes meios a temperatura normal e usados quando estabilizados no 10º dia de cultivo, momento em que acreditamos, as reações foram melhores e os títulos mais altos.

Os promastigotas crescidos nos meios LIT e 199 mostraram resposta antigênica, reprodutível em 100% dos experimentos, com resposta homogênea, uniforme e regular com soros homólogos ou heterólogos; os meio Rq e NNN, também foram bons em relação à sensibilidade, contudo apresentam 2 resultados

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. & OLIVEIRA, R.L.; Novo meio líquido autoclavável, isento de sangue, para isolamento primário de *Leishmanias* de lesões tegumentares: I – sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos. Rev. Pat. Trop. 13(1): 9-24, jan./abr. 1984.

diferentes, no curso de cada 10 experimentos consecutivos; os meios RPMI e Rq difásico deram reação em torno de duas diluições mais baixas, e apresentaram reações predominantes ao nível do núcleo e cinetoplasto, e mais fracas na superfície do parasita.

A comparação entre estes promastigotas crescidos à temperatura normal 24-25°C e formas amastigotas, amastigoides crescidas em Rq isoladamente ou suplementada com SFB ou soro de galinha com temperaturas mais elevadas demonstrou reações de títulos idênticos.

6 – Os parasitas crescidos neste meio em temperatura normal 24-25°C e temperaturas mais elevadas até 35°C mantiveram-se por passagens sucessivas por igual período com as mesmas características morfológicas e tintoriais primitivas após o 2º repique e desenvolveram curvas de crescimento com piques máximos muito próximos.

7 – A capacidade de infectividade para o macrófago de camundongos mostrou-se diferente de espécie para espécie, não parecendo haver modificação da capacidade de penetrar os macrófagos em função do crescimento no meio Rq. Tanto os promastigotas cultivados em temperaturas normal 24-25°C quanto os amastigotas e amastigoides – mantidos a temperaturas maiores ou iguais a 32°C, ambos continuaram em função da espécie de *Leishmania* penetrando os macrófagos na mesma proporção que os crescidos em outros como RPMI e 199.

8 – O novo meio foi capaz de se manter “usável” isto é, compatível com o crescimento de leishmanias, após períodos, tão longos quanto 18 meses, mesmo guardados à temperatura ambiente. (24-25°C), em natureza líquido ou quando

liofilizado, o que se observa, também a temperaturas de 6-10°C.

9 – O uso do meio com a finalidade de suportar o crescimento de Trypanosomatídeos de uma maneira geral – como *Leishmania* spp, *Trypanosoma cruzi* e *cruzi* “like”; *Trypanosomatídeos monoxênicos* como *Herpetomonas pessoai* (*Leptomonas pessoai*) foi também observado – verificando-se crescimento de todos eles. O meio quando associado ao SFB ao soro de galinha, ao soro de pato, ao soro bovino – ou ao “carvão” do sangue destes animais permitiu o estudo de variações do crescimento e morfologia de algumas espécies. Observou-se por exemplo metaciclo-gênese em torno de 50 a 80% do *Trypanosoma cruzi* e de *Trypanosoma de morcego hastatus hastatus*, observou-se também transformação de promastigota para amastigota e vice-versa, de leishmanias de várias espécies em função da temperatura normal 24-25°C e elevadas 32 a 35°C; verificou-se também que associação de extrato de flebotomíneo ou de triatomíneos potencia intensamente o crescimento de Trypanosomatídeos.

SUMMARY:

A new autoclavable culture medium, devoid of blood for isolation of leishmania from skin lesion: I – Its potentiality in the study of the biology of trypanosomatidae.

A new culture medium, first called BHYMI (Brain heart-yeast-meat infusion) then simply called Rq, consisting basically of brain extract, heart extract, meat extract, yeast extract glucose, sodium chloride and water is an inexpensive mo-

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. & OLIVEIRA, R.L.: *Novo meio líquido autoclavável, isento de sangue, para isolamento primário de Leishmanias de lesões tegumentares: I - sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos. Rev. Pat. Trop. 13(1): 9-24, jan./abr. 1984.*

nophasic medium commercially available, easy to prepare and to sterilize. It was used first as the liquid phase of the diphasic media NNN or Ducrey and then as an exclusive culture medium for leishmania.

It allows the isolation of leishmania from lesions and the maintenance of isolated strains. It is stable for 12 months at room temperature in the liquid state. Its optimal pH is 7.4 to 7.6.

When enriched with fetal bovine serum in the proportion of 5, 10, 20 and or 30%, it increases growth of strains of leishmania and allows cultivation of *Trypanosoma* sp; when used at higher temperatures it leads to the appearance of amastigote forms of *Trypanosomes*.

When associated with ducle serum and/or in the presence of tetracycline hydrochloride, metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* is stimulated.

When it is associated with chicken blood (plasma and/or serum) it stimulates transformation of promastigotes of leishmania sp to amastigotes at proper temperature (35°C).

Enriched with charcoal from fetal or adult bovine blood, and from ducle blood if leads to profuse growth of *Trypanosome* and is very good for isolation maintenance and growth of *Trypanosoma cruzi*.

This medium can also be used as a diphasic medium incorporated to peptone or agar and having as a liquid medium the medium itself, bovine serum, fetal bovine serum or ducle serum, medium 199, medium of Grace or liquid supplement of Hanks, according to the purpose of cultivation.

The association of extract from Phlebotomidae pr troatp, odae tp tje media increased the growth of leishmania.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - AKIYAMA, H. J. & TAYLOR, J. C. - Effects of macrophage engulfment and temperature on the transformation process of *Leishmania donovani*. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 19:747-754, 1970.
- 02 - BARBOSA, W.; CZEREWUTA, C. A.; OLIVEIRA, O. S. & OLIVEIRA, R. L. - Notas sobre o comportamento do crescimento de leishmanias de várias espécies no meio de Ducrey usando como fase líquida meio 199 ou BHI mais extrato de carne. XVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - Caldas Novas Go., 1981.
- 03 - BARBOSA, W.; OLIVEIRA, R. L. & CZEREWUTA, A. C. - Novo meio de cultura monofásico, autoclavável, sem sangue, para cultura de leishmanias da Região Centro-oeste-Brasil. XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - Rio de Janeiro, 1983.
- 04 - BARBOSA, W.; SOUZA, M. C. M.; SOUZA, J. M. & RASSI, D. M. - Note on the classification of the *Leishmania* sp. responsible for cutaneous leishmaniasis in the East central Region of Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 70(4):8-12, 1976.
- 05 - BARBOSA, W.; TELLES FILHO, F. G.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S. & GRIMALDI FILHO, G. - A new species of leishmania responsible for cutaneous leishmaniasis in the west Central Region of Brazil - Congresso da Soc. Bras. de Parasitologia e 2º Congresso Latino Americano de Parasitologia, São Paulo, 1983.
- 06 - BARBOSA, W. CZEREWUTA, A. C.; OLIVEIRA, O. S.; OLIVEIRA, R. L. & GRIMALDI FILHO, G. - *Leishmania* M (misteriosa) provável nova espécie ocorrente em Goiás. XX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e I Congresso da Sociedade Latino-americana de Med. Tropical, Salvador, 1984.
- 07 - BERENS, R. L.; BRUN, R. & KRASNER, S. M. - A simple monophasic medium for Axenic culture of hemoflagellates. *Journal of Parasitology* 62 (3): 360-365, 1976.

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. & OLIVEIRA, R.L.: *Novo meio líquido autoclavável, isento de sangue, para isolamento primário de Leishmanias de lesões tegumentares: I - sua potencialidade no estudo da biologia dos tripanosomatídeos. Rev. Pat. Trop. 13(1): 9-24, jan./abr. 1984.*

- 08 - BERENS, R. L. & MARR, J. J. - An easily prepared defined medium for cultivation of leishmania donovani promastigotes. *Journal of Parasitology*, 64(1): 160, 1978.
- 09 - CASTILHO, H. J. A.; SANCHES, A. C.; GUTIERREZ, G. J. F.; GARCIA PEREZ, A.; CORTES CEBRIAN, A. - Estudio de cepas de leishmania donovani y *L. tropica* em diferentes medios de cultivo. *Rev. Iber. Parasitol.* 43 (3): 249-257, 1983.
- 10 - CHILDS, G. E.; FOSTER, K. A. & McROBERTS, J. M. - Insect cell culture media for cultivation of New World Leishmania. *Int. J. Parasitol.* 8(4): 255-258, 1978.
- 11 - DWYER, D. M. - A monophasic medium for cultivating leishmania donovani in large numbers. *Journal Parasitol.* 58: 847-898, 1972.
- 12 - ENDERS, B.; BRAUNDS, F. & ZWISLER, O. - Biochemical and technical considerations regarding the mass production of certain parasitic protozoa. *Bulletin of the World Organization*, 55 (2-3): 393-402, 1977.
- 13 - GILLIG III, C. J. - Adaptation of leishmania to in vitro cultivation at 37C. *J. Protozool.* 24(3): 406-411, 1977.
- 14 - GRIMALDI FILHO, G.; MACMAHON PRATT; TELLES FILHO, F. Q.; & BARBOSA, W. - Production of monoclonal antibodies to isolated in Brazil note reacting with available monoclonais specific for other New World leishmania. Congresso da Soc. Bras. de Parasitologia e 2º Congresso Latino americano de Parasitologia - São Paulo, 1983.
- 15 - HENDRICKS, L. D. - An in vitro drug screening system for *Leishmania* using axenically derived amastigotes. In: Fourth International Congress of Parasitology, Warsaw, 19-26. Agu. Abstracts, section D- 87-88, 1978.
- 16 - HENDRICKS, L. D. - Liquid media for the rapid and quantitative cultivation of leishmania. *American Society of Parasitologist. 50. th Annual Meeting*, 68, 1975.
- 17 - HENDRICKS, L. D. & CHILDS, G. E. - Present knowledge of the in vitro cultivation of leishmania. In: *The in vitro cultivation of the Pathogens of Tropical Diseases - Tropical Diseases Research series 3 - WHO*, 251-272, 1979.
- 18 - HENDRICKS, L.D.; WOOD, D. E. & HAJOUK, M. E. - Haemoflagellates: Commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology.* 76:309-316, 1978.
- 19 - HENDRICKS, L. D. & WRIGHT, N. - Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by vitro cultivation of saline aspirates in Schneider *Drosophila* medium. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 962-964, 1979.
- 20 - HINK, F. W. - A compilation of invertebrate cell lines and culture media. In: E. Kurstak and K. Margmorosh (Ed). *Invertebrate tissue culture: applications in medicine, biology and agriculture.* Academic Press. Inc. New York, p. 366, 1976.
- 21 - LAINSON, R. & SHAW, J. J. - Leishmaniasis and leishmaniasis of the New World. With particular referent to Brazil. *Bull. Pan. Am. Health Organ.* 7: 1-19, 1973.
- 22 - LEMMA, A. & SCHILLER, E. L. - Extracellular cultivation of the leishmanial bodies of species belonging to the protozoan genus leishmania. *Exper. Parasitol.*, 15: 503-513, 1964.
- 23 - LWOFF, M. - Comptes rendus hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, 206: 540-542, 1938. In: ENDERS, R. e col. - *Biochemical... Bulletin of the World Organization* 55(2-3): 393-402, 1977.
- 24 - MANSOUR, N.S.; HADY, J. & MACLENNOLL, E. - A modified liquid medium for leishmania. *Journal of Parasitology*, 59: 1088-1090, 1973.
- 25 - MATTOCK, N. M. & PETERS, W. - The experimental chemotherapy of leishmaniasis. I. Techniques for the study of drug action in tissue culture. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 69: 349-358, 1975.
- 26 - MAUEL, J. - Leishmaniasis³ In: *The membrane Pathobiology of Tropical Disease*

- ses. Tropical Diseases Research série 2 - WHO, 105-122, 1979.
- 27 - PALOMINO, J. C. - Peptone-yeast autolysate - Fetal Bovine serum 10, a simple, inexpensive liquid medium for cultivation of leishmania spp. Journal of clinical Microbiology 15(5): 949-950, 1982.
- 28 - PAN, C. T. - Cultivation of the leishmaniform stage of *Trypanosoma cruzi* in cell-free media at different temperatures. American Journal of Tropical Medicine, 17: 823-832, 1968.
- 29 - PAN, C. T. - Cultivation and morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* cell-free media. Proc. 2nd Internat. Cong. Parasitol., Washington, D. C. - J. Parasitol, 36: 48-54, 1970.
- 30 - PAN, C. T. - Cultivation and morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* in improved liquid media. Journal of Protozoology, 18: 556-560, 1971.
- 31 - SHAW, J. J. & LAISON, R. - A simply prepared amastigote leishmanial antigen for use in the indirect fluorescent antibody test for leishmaniasis. Journal of Parasitology, 63(2): 384-385, 1977.
- 32 - SCHAEFER, F. W.; BELL, E. J. & ETGES, F. J. - *Leishmania tropica*: Chemostatic cultivation. Experimental Parasitology, 28: 465-472, 1970.
- 33 - STEIGER, R. F. & BLACK, C. D. - Simplified defined media for cultivating leishmania donovani promastigotes. Acta Tropica, 37: 195-198, 1980.
- 34 - STEIGER, R. F. & STEIGER, E. - A defined medium for cultivating leishmania donovani and *L. braziliensis*. Journal of Parasitology, 62: 1010-1011, 1976.
- 35 - STEIGER, R. F. & STEIGER, E. - Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: Nutritional requirements. Journal of Protozoology, 24(3): 437-441, 1977.
- 36 - TRAGER, W. - The development of leishmania donovani in vitro at 37°C. Effects of the kind of serum. J. Exper. Med. 97: 177-188, 1953.
- 37 - TRAGER, W. - Nutrition and biosynthetic capabilities of flagellates: problems of in vitro cultivation and differentiation. In: Ciba Foundation Symposium 20 (New series). Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas Disease. Elsevier, Excerpta Medica, 225-254, 1974.
- 38 - VESSAL, M.; REZAI, H. R. & POKZAR, P. - *Leishmania* species fatty acid composition of promastigotes. Experimental Parasitology, 36: 455-461, 1974.
- 39 - WALTON, B. C. et al. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 21: 296-299, 1972.
- 40 - WALTON, B. C.; SHAW, J. J. & LAISON, R. - Observations on the in vitro cultivation of leishmania braziliensis. The Journal of Parasitology, 35: (6): 63, 1977.
- 41 - WONDE, T. & HONIGBERG, B. M. - Morphology and infectivity of leishmania donovani cultivated in nonliving media at Elevated Temperatures. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 20: 828-838, 1971.