

CULTURA DE LEISHMÂNIAS (*)

ETTORE RUGAI

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

A finalidade deste trabalho é propôr um meio e descrever a técnica que usamos para cultura de leishmânias patogênicas para o homem.

Os protozoários patogênicos para os animais, quando fóra do organismo hospedeiro, exigem, para subsistir, condições muito mais precisas do que as bactérias. Porisso, sua cultura IN VITRO é sempre mais difícil.

Em 1904, Rogers, pela primeira vez, obteve cultura de leishmânias partindo de material obtido por punção do baço de doentes de kala-azar.

O meio era constituído pelo próprio sangue resultante da punção, adicionado de citrato de sódio como anti-coagulante. Resultados inconstantes e sub-culturas negativas. Posteriormente, acidificando o meio com ácido cítrico e determinando a temperatura ótima para desenvolvimento (22°C.), Rogers conseguiu culturas com mais facilidade. Christophers, Chatterjee, MacKenzie, Leishman e Stathan confirmam os trabalhos de Rogers.

Nicolle, em 1908, estudando o kala-azar, empregou o meio que Novy e Novy e McNeal empregavam para a cultura de tripanosomas (agar nutritivo com um terço de sangue). Os resultados foram superiores aos de Rogers. Sub-culturas positivas.

Eliminando a carne e a peptona do meio de Novy e McNeal, Nicolle, em estudos ulteriores, preparou um meio que, pela sua simplicidade e eficiência chegou incólume até nossos dias. Este meio, conhecido universalmente como meio N. N. N., é largamente empregado em primo-culturas, conservação e estudos biológicos das diversas espécies de leishmânias.

Com a dupla finalidade de fixar os elementos constituintes e afastar contaminações eventuais, Mathis propôs o aquecimento do

(*) Este trabalho foi realizado com raças de leishmânias fornecidas pelo Dr. Luis de Sales Gomes.

meio. Legroux, Salle e Schmidt, Berrebi e nossas próprias pesquisas demonstraram a nocividade do aquecimento.

Parrot e Donatien, Nattan e Grimard, adicionando solução isotônica de cloreto de sódio à água de condensação do meio de Nicolle, conseguem aumentar a longevidade das culturas. Este fato também constatamos.

Kliger, substituindo o soro do meio de Noguchi (para leptospira) por sangue desfibrinado de coelho, obteve bons resultados em primo-culturas. Usa o meio de Noguchi original para conservação, obtendo repiques positivos mesmo depois de seis meses, cobrindo o meio com parafina líquida. Noguchi, Noguchi e Lindenberg, Buss, confirmam os trabalhos de Kliger.

Os meios acima mencionados, satisfatório para primo-culturas e entretenimento das espécies, não o são para produção de abundantes culturas como é necessário para a preparação de grandes quantidades de antígenos e vacinas. Para preencher a lacuna e para estudos bio-morfológicos, muitos meios foram propostos. Alguns líquidos: Laveran e Pettit, Row, Salle, Salle e Schmidt, Lwoff. Outros sólidos: Tanabe, Mayer e Ray, Row, Senekje, Salle, Noeller.

Bianchi, Berrebi, Anderson, tentaram culturas em soro-leite com resultados negativos. O leite, segundo Barraud, Christophers e Barraud, Anderson, por si só ou como substituto do sangue na base N. N. N. é medíocre. Entretanto, segundo Bianchi, Laurin-sich, é de valor como adjuvante nos meios com sangue.

Dos trabalhos consultados deduz-se que o sangue total é imprescindível para se conseguirem culturas abundantes. Qualquer elemento do sangue, isoladamente empregado, é inútil. A riqueza das culturas aumenta proporcionalmente à porcentagem do sangue. Entretanto, há um limite que varia, segundo os autores, entre 15 e 30% — Pedroso, Salle, Salle e Schmidt. Estes últimos autores concluem que acima de 15% as culturas empobrecem e que o impedimento corre por conta do soro.

Ray, Leiva, constataram que a porcentagem ótima de sangue varia com a concentração do agar. Assim, com 0,5% de gelose o ótimo de sangue é 5% e com 2% de gelose é necessário aumentar o sangue para 25%.

Ray, Kliger, Salle e Schmidt, Lwoff, Senekje, estabeleceram o pH ótimo entre 7,0 e 7,4. Derrebi entre 6,0 e 6,5. Napier estabeleceu 5,7 como ótimo na zona ácida e 7,3 na alcalina e sugere o

uso do meio N.N.N. com pH 5,7 como seletivo para isolamento de leishmânias, uma vez que sejam feitos estudos de confirmação.

Com relação à pressão osmótica do meio Barraud, Christophers e Barraud, Pedroso, são partidários da hipotonia. Berrebi conclue, contrariamente, que a hipertonia é favorável, apontando 15_{0/00} como porcentagem ótima de NaCl. Este autor, porém, não fez estudos com porcentagens de NaCl entre 7,5 e 15 _{0/00}.

PARTE TÉCNICA. MEIO DE CULTURA

Constituintes:

1 — Infusão de carne	250 cc.
2 — Extrato de batatas	80 cc.
3 — Cloreto de sódio	12,0 grms.
4 — Agar	25,0 grms.
5 — Água destilada	1000 cc.
6 — Sangue desfibrinado de coelho	
7 — Sol. de cloreto de sódio a 1.2 0/00, esteril.	

I — *Preparação da infusão de carne:*

Carne de vaca sem gordura	1.000,0 grms.
Água destilada aquecida a 80°C.	1.000 cc.

Passar a carne na máquina, ajuntar a água e agitar imediatamente. Deixar em contacto durante 3 a 4 horas agitando várias vezes. Decantar, espremer o resíduo. Reunir os líquidos, ferver 10 minutos, filtrar e completar o volume de 1.000 cc.. Distribuir em balões e esterilizar a 110°C se não fôr usado no mesmo dia.

II — *Preparação de extrato de batatas:*

Batatas	500,0 grms.
Água destilada	1.000 cc.

Descascar as batatas, cortá-las em fatias de 3 a 4 mm. de espessura, ajuntar a água. Autoclavar 20 minutos a 110°C.. Decantar, lavar o resíduo com água suficiente para completar 1.000 cc. com o primeiro líquido. Filtrar enquanto quente. Distribuir em balões e esterilizar a 110°C. 20 minutos para guardar em estoque.

III — Fundir o agar com a água a 121°C. 20 minutos. Ajustar a infusão de carne, extrato de batatas e o cloreto de sódio. Ajustar ao pH 6,6 a 6,8. Não é necessário filtrar.

Distribuir 100 cc. em cada frasco de Roux de 1.000 cc. (ou em balões com 1 litro para guardar em estoque). Esterilizar a 110°C. 20 minutos.

Esfriar os frascos a 58°C.. Colocar em cada um 18 a 20 cc. de sangue. Agitar sem fazer bolhas. Deitar os frascos e deixar em repouso durante 24 horas. Em seguida, colocar em cada frasco 20 cc. de solução de cloreto de sódio a 12 o/100 (Bloch citado por Zdrodowski e Woskressenski). Deixar em repouso mais 24 horas antes de fazer a sementeira.

IV — *Sementeira*: Os próprios frascos de Roux podem fornecer culturas para as sucessivas sementeiras. Entretanto, para maior comodidade e para diminuir as contaminações, é preferível seguir a seguinte técnica:

Em balões de Erlenmeyer de 100 cc., colocar 10 a 12 cc. do meio acima descrito. Deixar 24 horas em repouso. Em seguida colocar 6 cc. de solução de cloreto de sódio a 12 o/100. Deixar em repouso mais 24 horas. Inocular e incubar a 22°C.. Após uma semana, a cultura está suficientemente desenvolvida. Com uma pipeta de 10 cc., colocar em cada balão 5 cc. de sol. de cloreto de sódio a 12 o/100, agitar, aspirar todo o líquido e transportá-lo para um frasco de Roux. Incubar a 22°C. conservando os frascos em posição horizontal. Com 24 horas de incubação, já se podem observar numerosas granulações flutuando na massa líquida, constituídas de leishmânias.

Entre 10 e 15 dias pode-se fazer a colheita. Para isso, remover a parte líquida, lavar a superfície do meio duas ou três vezes com solução fisiológica, reunir os líquidos e centrifugar. As leishmânias, de mistura com algumas hemátias e detritos do meio, podem ser separadas por centrifugação e filtração e algodão esteril.

OBSERVAÇÕES:

O pH da base oscila entre 6,6 e 6,8. Depois de adicionado o sangue, sobe a 7,2 — 7,3. A solução de cloreto de sódio adicionada, uma vez estabelecido o equilíbrio físico-químico, tem a mesma concentração hidrogeniônica da parte sólida. Este fato vem facilitar muito a determinação do pH do meio depois de preparado. Napier determina colorimetricamente o pH do meio de N. N. N., dializando a água de condensação em solução fisiológica neutra na qual faz as

pesquisas. Dispensámos a diálise e dosámos diretamente o líquido ao potenciômetro ou colorimetricamente, pois apresenta-se fracamente colorido.

Dada a ampla superfície de contacto com o meio sólido, a parte líquida recebe facilmente, por difusão, as substâncias nutritivas e, distendendo-se em fina camada, oferece condições ótimas para a multiplicação das leishmânias.

A prática mostrou-nos que os meios recentemente preparados produzem culturas mais ricas. Porisso, preferimos semear os frascos sem prévio controle de esterilidade, que exige pelo menos 48 horas de estufa a 37°C.. Quando o líquido superficial fica muito avermelhado, as culturas são mais pobres. Parece que a hemoglobina em excesso é tóxica. Recomendamos, portanto, afastar todas as causas que provocam a lise das hemátias.

Usámos 10, 15, 20 e 25% de sangue. As culturas enriquecem com o aumento do sangue.

O sangue, de gato, carneiro, galo e cão podem substituir o de coelho.

Uma leve hipertonia favorece a cultura.

A batata foi incluída no meio, porque revelou-se precioso elemento. Estimula a multiplicação, aumentando consideravelmente a riqueza das culturas.

A Comissão de estudos da Leishmaniose, eficientemente dirigida pelo prof. Dr. Samuel B. Pessôa e Dr. Bruno Rangel Pestana, usa rotineiramente o meio acima descrito, para preparar vacinas e antígenos empregados nos trabalhos de combate a essa endemia.

Os resultados, segundo a referida Comissão, são grandemente superiores aos obtidos com o meio N. N. N., inicialmente usado.

RESUMO

Foi descrito um meio e a técnica para cultura de leishmânias. O método produz culturas abundantes para preparação de antígenos e vacinas.

O pH do meio concluído pode ser determinado por intermédio da parte líquida do meio.

A batata estimula o crescimento.

SUMMARY

In the present paper a medium and the technic for the culture of leishmania are described.

This method gives abundant cultures for the preparation of vaccines and antigens.

The pH of the finished medium may be determined by means of the liquid part.

The potato stimulates de growth.

ZUSAMMENFASSUNG

Man hat einen Nährboden und die Technik für die Kultur von Leishmanie beschrieben.

Die Methode liefert üppige Kulturen für die Vorbereitung von Antigene und Vakzine.

Das pH des fertigen Nährbodens kann durch den flüssigen Teil bestimmt werden.

Die Kartoffel beschleunigt das Wachstum.

* * *

Externamos, aquí, os nossos reconhecimentos ao Snr. Dr. Bruno Rangel Pestana, pelo apoio que nos deu para a realização deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- ADLER, S. — 1934 — *Trns. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 28, 201 (ref. no Central Blatt — 1935 — 116, 174).
- ANDERSON, C. — 1935 — *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, 24, 130.
- ANDERSON, C. — 1933 — *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 21, 294.
- ARCHETTI, I. — 1938 — *Arch. f. Schiffs-Trop-Hyg.*, 42, 547.
- BANERJEE, D. N. — 1923 — *Calcutta Med. Journ.* 18, 417.
- BARRAUD, J. P. — 1925 — *Ind. Jour. Res.* 13, 177.
- BERREBI, J. — 1936 — *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, 25, 89.
- BIANCHI, L. — 1936 — *Arch. f. Schiffs-Trop-Hyg.*, 40, 146.
- BUSS, G. — 1929 — *Arch. f. Schiffs-Trop.Hyg.*, 33, 65.
- CHATTERJEE, G. C. — 1905 — *The Lancet*, Janeiro, 16.
- CHRISTOPHERS, S. R. — 1905 — *Scien. Mem. Gov. of. Ind.*, n.º 15.
- CHRISTOPHERS, S. R. e BARRAUD, J. P. — 1925 — *The Ind. Jour. Med. Res.*, 13, 176.
- CRISTINA, G. e CANNATA, S. — *VTVJ — Gazz. Osp. Clin.* 48 (ref. no Bull. Inst. Pasteur 1910, 8, 682).
- FRANCHINI, G. — 1922 — *Bull. Soc. Path. Ex.*, 15, 551.
- HOFFMANN, J. M. e SCHULTZ, Th. W. — 1931 — *Arch. f. Schiffs-Trop-Hyg.*, 35, 700.
- KLIGER, J. I. — 1924 — *Am. Jour. Trop. Med.*, 4, 69.
- LAURINSICH, A. — 1937 — *Pediatrics* 45, 857 (ref. no Bull. Inst. Pasteur 1939).
- LAVERAN, A. e PETTIT — 1910 — *C. R. Soc. Biol.*, 68, 114.

- LEGRAUX, R. — 1921 — C. R. Ac. Sci. 173, 1423.
- LEISHMAN, W. B. e STATHAN, J. C. B. — 1905 — Jour. R. Army Med. Sorps. (ref. no Bull. Inst. Pasteur, 367).
- LEIVA, L. — 1922 — The Philippine Jour. of. Scien. 20, 179.
- LWOFF, M. — 1939 — C. R. Soc. Biol., 130, 406.
- LWOFF, M. — 1933 — Ann. Inst. Pasteur, 51, 55.
- MATHIS, C. — 1911 — C. R. Soc. Biol., 71, 538.
- MACKENZIE, J. — 1905 — Jour. R. Arm. Med. Corps. 5, 628 (ref. no Bull. Inst. Pasteur, 1905).
- MATHIS, C. — 1906 — C. R. Soc. Biol., 61, 550.
- MAYER, M. e RAY, J. C. — 1928 — Arch. f. Schiffs-Trop-Hyg., 32, 277.
- NAPIER, L. E. — 1924 — Ind. Jour. Med. Res. 11, 733.
- NAPIER, L. E. e MURUGESAN, P. — 1924 — Ind. Jour. Med. Res., 11, 1219.
- NATHAN, L. e GRIMARD, L. — 1934 — Bull. Soc. Path. Ex., 27, 656.
- NICOLLE, C. — 1908 — Bull. Soc. Path. Ex., I, 121.
- NICOLLE, C. — 1908 — C. R. Ac. Sci., 140, 842 (ref. no Bull. Inst. Pasteur — 1908 — 6, 421).
- NICOLLE, C. e MANCEAUX, L. — C. R. Soc. Biol., 70, 712.
- NOGUCHI, H. — 1924 — Proc. int. Conf. on Health Problems in Trop. Am. 455 (ref. no Trop. Dis. Mull. 1925, 693).
- NOGUCHI, H. e LINDENBERG, A. — 1925 — Am. Jour. Trop. Med., 5, 63.
- NÖLLER, W. — 1917 — Arch. f. Schiffs-Trop-Hyg., 21, 53.
- NOVY, F. G. — 1903 — Contr. to Med. Res., pg. 549 (ref. no Bull. Inst. Pasteur 1903, pg. 602).
- NOVY, F. G. e MACNEAL, W. J. — 1904 — Jour. of. Am. Med. Ass., 21 novembro (ref. no Inst. Pasteur Paris, 1904, 60).
- NOVY, F. G. e MACNEAL, W. J. — 1904 — Jour. Inf. Dis., 1, 2 janeiro.
- NOVY, F. G. — 1905 — Jour. Inf. Dis., 2, 256.
- PESSOA, S. B. e PESTANA, B. R. — 1940 — S. Paulo Médico, vol. II ns. 5 e 6.
- PEDROSO, A. — 1923 — Am. Jour. Trop. Med., 3, 47.
- PARROT, L. e DONATIEN, A. — 1935 — Soc. Pathol. Ex., 28, 39.
- RAY, J. C. — 1932 — Ind. Jour. Med. Res., 20, 355.
- ROW, R. — 1912 — British Med. Jour., 1119.
- ROW, R. — 1930 — Ind. Med. Gaz., 65, 319.
- ROW, R. — 1935 — Bull. Soc. Path. Exo., 28, 269.
- ROGERS, L. — 1904 — The Lancet, 215.
- ROGERS, L. — 1905 — The Lancet, I, 1484.
- ROGERS, L. — 1906 — Roy. Soc., 57, 284 (ref. no Bull. Inst. Pasteur de Paris, 1906 — 4, 349).
- SALLE, A. J. e SCHMIDT, C. L. A. — 1928 — Jour. Inf. Dis., 43, 378.
- SALLE, A. J. — 1931 — Jour. Inf. Dis., 49, 473.
- SALLE, A. J. — 1931 — Jour. Inf. Dis., 49, 481.
- SAITO, Y. — 1937 — Jour. Orient. Med., 36, 9 (ref. no Bull. Inst. Pasteur 1938, 26, 1044).
- SENEKJE, H. A. — 1939 — Tr. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., 33, 267.
- SHORTT, H. E. — 1923 — Ind. Jour. Med. Res., 10, 1164.
- TANARE, M. — 1923 — Jour. of. Bact. Janeiro (ref. no Trop. Dis. Bull. pg. 723).
- YEN, A. C. H. e CHUNG — 1934 — Proc. Soc. Exp. Med., 30, 1258.
- ZDRODOWSKY, P. e WOSKRESSENSKI, B. — Bull. Soc. Path. Ex., 23, 1023.