

PROBLEMAS EN EL CULTIVO DE LOS TRIPANOSOMÍDEOS, Y
PRESENTACION DE UN NUEVO MEDIO ESTERILIZABLE AL
AUTOCLAVE *

ENRIQUE BELTRÁN
Académico de número

El primer intento de cultivo de un tripanosomídeo que tuvo éxito fué realizado en 1903 por Novy y MacNeal, quienes lograron cultivar *Trypanosoma brucei* usando un medio de agar nutritivo adicionado con sangre desfibrinada de conejo.

Por su parte, Rogers (1904), empleando una solución citratada, pudo hacer cultivos de *Leishmania donovani*.

Posteriormente, Nicolle (1908) simplificó el medio de Novy y MacNeal usando agar simple en lugar de agar nutritivo, y lo empleó para el cultivo de leishmanias. Desde entonces este medio, conocido generalmente como NNN por las iniciales de los nombres de sus tres autores, ha sido el más ampliamente empleado para el cultivo de todos los tripanosomídeos, sea en su forma original o con diversas modificaciones de detalle.

Berrebbi (1935) publicó una excelente reseña histórica acerca de los problemas relacionados con el cultivo de las leishmanias, en el que analiza críticamente la acción de los diversos componentes del medio NNN y estudia diversas modificaciones que pueden introducirse en el mismo, tanto para mejorar su rendimiento como para estudiar experimentalmente determinados aspectos de la fisiología de los flagelados.

En su forma original, el medio NNN sólo utiliza el líquido de condensación que se desprende del agar al gelificarse éste, y que se acumula en la base de la inclinación. Desgraciadamente, su cantidad es muy pequeña, y los tubos se secan fácilmente. Sin embargo, se puede evitar este inconveniente cubriendo la inclinación con solución salina al 0.85 por ciento, lo que facilita mucho el empleo y conservación de los tubos. Esta modificación, según en-

* Trabajo reglamentario, leído en la sesión del 8 de octubre de 1952.

tendemos, fué introducida por Nattan-Larrier y Grimard Richard (1934) y da resultados excelentes.

El medio NNN ha sido rutinariamente empleado por nosotros durante diez años, tanto para el aislamiento original de cepas como para el mantenimiento de los cultivos, los cuales pueden conservarse vigorosos indefinidamente con resiembras mensuales. Los resultados favorables se han obtenido con varias cepas de las siguientes especies: *Leishmania tropica*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *Trypanosoma lewisi*, *T. rotatorium*, *Schizotrypanum cruzi* y *Herpetomonas* sp.

El rendimiento del medio ha sido excelente, tanto por la rapidez de crecimiento y abundancia de organismos en los cultivos, como por la duración de los mismos. Sin embargo, existe el inconveniente de que es imposible hacer una esterilización final del medio por el calor, lo que facilitaría su preparación y garantizaría la pureza de los tubos.

También nos hemos encontrado con la desagradable circunstancia, sobre todo cuando se trata de aislar cepas de *Leishmania braziliensis* o *L. donovani*, procedentes de lesiones abiertas, de que el inóculo viene contaminado de origen, con lo cual se establece un cultivo mixto de protozoarios y una mezcla de bacterias.

Según la mayoría de los autores, los tripanosómídeos son muy sensibles a estas contaminaciones bacterianas, y no prosperan en presencia de las mismas. Nuestra experiencia personal no ha confirmado tal cosa, pues hemos logrado mantener por años, con resiembras sucesivas, cultivos muy ricos de diversos tripanosómídeos, en unión de fuertes contaminaciones experimentales de bacterias.

Cierto es que estos cultivos contaminados, aunque demuestran la posibilidad de que crezcan juntos tripanosomas y bacterias, pierden toda su utilidad, y si la contaminación se realiza accidental en vez de experimentalmente, pueden originar la desaparición de cepas valiosas. Por tal motivo, en alguna ocasión (Beltrán, 1944) tratamos de ver si era posible limpiarlos alterando el pH del medio, y en otra (Beltrán y Larenas, 1944) experimentamos con diversas sulfamidas, sin que en uno u otro caso hubiésemos logrado el fin perseguido.

Posteriormente, siguiendo a otros autores, hemos venido utilizando rutinariamente, con resultados magníficos, primero penicilina y luego una combinación de ésta con estreptomícina, en concentraciones variables que pueden elevarse hasta 7 u 8,000 unidades de la primera y 0.07 ó 0.08 g. de la segunda, por tubo, sin que se afecte el crecimiento de los flagelados.

Gracias al empleo de tales antibióticos, se facilita notablemente el manejo de los cultivos, sin que por eso puedan eliminarse las precauciones extre-

madras que son necesarias en las etapas finales de la preparación del medio NNN para asegurar su esterilidad. En consecuencia, seguimos pensando en la conveniencia de disponer de un medio sencillo y seguro, que pudiera someterse a esterilización final en el autoclave.

Ensayamos con tal objeto el medio de Torres (1915) que llena estas condiciones, pero los resultados obtenidos con el mismo fueron mediocres; inferiores desde luego a los que se tienen con el medio Novy-McNeal-Nicolle.

En nuestros ensayos para encontrar nuevos medios, pudimos comprobar que era posible lograr buenos cultivos en uno excesivamente simple, que consistía tan sólo en solución salina al 0.85 por ciento adicionada de 10 por ciento de sangre desfibrinada de conejo. Los crecimientos no eran generalmente tan abundantes ni se conservaban por tanto tiempo como en el medio NNN. Además, este medio, como se comprende fácilmente, no podía soportar la esterilización final por el calor; pero lo mencionamos por su extremada simplicidad, que puede hacerlo conveniente en algunas ocasiones.

Después de múltiples ensayos logramos obtener un medio que es de sencilla preparación, que puede soportar una esterilización final por el calor, y cuyo rendimiento es en todos sentidos semejante, si no superior en riqueza de crecimiento, al que se obtiene con el medio NNN. Tenemos ya una experiencia de más de dos años en su empleo continuado, siempre con resultados excelentes, hasta el punto de que a la fecha lo utilizamos rutinariamente para el mantenimiento de nuestros cultivos, y el intento de aislamiento de nuevas cepas.

La base del medio se prepara en la misma forma que para el de Boeck y Drbohlav (1925) clásico en el cultivo de las amibas intestinales,¹ pero agregándole 10 por ciento de sangre de conejo desfibrinada, antes de poner a coagular las inclinaciones. Una vez solidificadas, se cubren con solución salina al 0.85 por ciento y se esterilizan los tubos al autoclave a 15 libras de presión, por veinte minutos. El medio se conserva por largo tiempo en el refrigerador sin perder sus propiedades. En nuestras experiencias, lo hemos mantenido así hasta por seis meses, pero posiblemente su conservación sea todavía mayor.

No intentamos reclamar una gran originalidad en la preparación de nuestro medio, ya que no hemos hecho sino utilizar la base del de Boeck y Drbohlav adicionada con sangre, en lugar del agar con sangre del me-

¹ Lávense cuidadosamente cuatro huevos de gallina, cepíllense con alcohol y rómpanse en un frasco de vidrio estéril con cuentas de vidrio; agréguese 50 c.c. de solución de Locke y 10 por ciento de sangre de conejo desfibrinada y agítese hasta obtener una mezcla homogénea, que se distribuye en los tubos para formar la inclinación.

dio NNN. Pero la gran ventaja que se introduce así al permitir su esterilización, y los excelentes resultados derivados de su uso, nos hacen pensar que es conveniente darlo a conocer, para que pueda ser utilizado por otros investigadores.

RESUMEN

El autor hace notar la inconveniencia del medio habitual NNN para el cultivo de tripanosómidos, ya que siempre tiene contaminación bacteriana y no puede ser esterilizado.

Propone una modificación del medio de Boeck y Drbohlav que no presenta dichos inconvenientes.

SUMMARY

This paper points out the flaws of the cultivation of *Trypanosoma* in the NNN medium, which cannot be sterilized and is therefore practically always contaminated.

The author proposes a variant of the Boeck-Drbohlav's culture medium, which avoids such inconveniences.

BIBLIOGRAFIA

- Beltrán, E., 1944: Acción de los cambios de pH sobre *Leishmania brasiliensis* y sus contaminaciones bacterianas. Rev. Inst. Salub. y Enf. Trops., 5: 97-100.
- Beltrán, E., y R. Larenas, 1944: Acción de algunas sulfamidas sobre *Leishmania brasiliensis* en cultivo y sus contaminaciones bacterianas. Rev. Inst. Salub. y Enf. Trops., 5: 53-57.
- Berrebbi, J., 1935: La culture des Leishmanies. Thèse. Univ. de Paris, 1-71.
- Boeck, W. C., y J. Drbohlav, 1925: The cultivation of *Endamoeba histolytica*. Am. J. Hyg., 5: 371-407.
- Nattan-LARRIER y L. Grimard-Richard, 1934: Cultures des Leishmanias sur le milieu NNN mouillé. Bull. Soc. Path. Exot., 27: 656-658.
- Nicolle, C., 1908: Culture du parasite du Bouton d'Orient. C. R. Acad. Sci., 146: 842-843.
- Novy, F. G., y W. J. MacNeal, 1903: On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J. Infect. Dis., 1: 1-30.
- Rogers, L., 1904: Preliminary note on the development of *Trypanosoma* in cultures of the Cunningham-Leishman-Donovan bodies. Lancet, 2: 215-216.
- Torres, M., 1915: Alguns fatos que interesam a epidemiologia da molestia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 7: 120-138.