

Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). V. Lactopep como meio de cultivo. A new transfer and culture medium of *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). V. Lactopep as a culture medium

Leila Maria Silva Lopes¹., Nicolau Maués Serra-Freire²., Vera Lúcia Teixeira de Jesus³., Hélio Gustavo Guida⁴., Vania Lúcia Baeta Andrade⁵ e Elizabeth Bastos Ballesteros Pereira⁶.

Resumo

Para o diagnóstico da tricomonose bovina, o meio Lactopep foi testado para o transporte de amostras de lavado prepucial e de muco vaginal de bovinos infectados com *Tritrichomonas foetus*.

A metodologia de colheita do material foi descrita por Lopes et al. (1994), utilizando o meio Guida-Kupferberg como testemunho. Os meios foram mantidos em temperatura ambiente e analisados após 24 horas. Pela análise de variação com delineamento inteiramente casualizado, avaliou-se o dia de máxima eficiência. Com Lactopep obteve-se a média de 9,8 dias e com Guida-Kupferberg, 9,2 dias, com material proveniente de machos naturalmente infectados; as médias das culturas para material proveniente de fêmeas foi 7,1 dias para o Lactopep, e de 7,5 para o Guida-Kupferberg. A estatística demonstrou que os meios são eficientes para o transporte e cultivo de *T. foetus*, mas o meio Lactopep é de mais fácil preparo e de baixo custo.

Na segunda etapa do experimento, adicionou-se ao Lactopep a fração de 10% de soro fetal bovino para manutenção de *T. foetus* por repiques sucessivos em laboratório, comparando-se ao de Hanks. Os dois meios permitem curva de crescimento em torno de sete dias, quando a fase de esgotamento chega aos valores mais baixos mas ainda viáveis. O Lactopep modificado para laboratório também mantém acentuada correlação negativa com o tempo de cultivo e pode ser indicado para a manutenção de *T. foetus*.

Palavras Chave: *Tritrichomonas foetus*; meio de cultura, meio de transporte, meio Lactopep; meio Hanks; meio Guida-Kupferberg.

Introdução

T. foetus (Riedmuller, 1928) pode ser isolado de bovinos com distúrbios reprodutivos, e é considerado

um importante agente causador de abortos, repetições de cio, piometras e outras patologias do sistema genital feminino. Para o seu diagnóstico é necessário a utilização de meios que possam estimular a sua multiplicação, pois a concentração do parasita é reduzida no material colhido do hospedeiro.

Amelingmeir (1981) afirmou que, normalmente, os touros possuem um número mais reduzido de tricomonas do que as vacas, especialmente se permanecerem em serviço de monta. Soma-se a este fato a intercorrência de outros protozoários flagelados saprófitas que também podem ser encontrados em uma amostra prepucial, sendo necessário diferenciá-los do *T. foetus* (Morgan & Nolan, 1943).

Lopes et al. (1994), considerando a pouca eficiência dos meios de transporte e cultivo, até então utilizados no diagnóstico da tricomonose bovina, elaboraram um meio simples, econômico, de fácil manuseio e capaz de transportar *T. foetus* do campo ao laboratório, mantendo a sua viabilidade por um período médio de 16,88 dias.

O presente trabalho objetivou testar o meio composto por peptona bacteriológica, leite em pó e antibióticos, denominado Lactopep, para a avaliação do dia de crescimento máximo de parasitos colhidos de bovinos machos e fêmeas naturalmente infectados. Da mesma forma, em uma segunda etapa, foi feita uma simples modificação do meio visando utilizá-lo na manutenção dos protozoários em laboratório.

Material e Métodos

Para avaliação do meio Lactopep no seu dia de leitura máxima, foram utilizadas amostras prepuciais de 26 touros e muco vaginal de 30 vacas naturalmente infectados.

A metodologia empregada para a colheita do material foi a descrita em Lopes et al. (1994) e o teste de eficiência foi feito por comparação, utilizando-se como

¹ - Leila Maria Silva Lopes - Médica-Veterinária, Núcleo Experimental de Iguaba/UFRJ - Cx: Postal 113614 - 28.960-000

² - Nicolau Maués SERRA-FREIRE - Prof. Titular Parasitologia Veterinária DPA/UFRJ - Km 47 - Seropédica - 23.851-970

³ - Vera Lúcia Teixeira de Jesus - Pesquisadora da ENGOPA - Cx. Postal 49 - Goiânia - Goiás

⁴ - Hélio Gustavo Guida - Pesquisador UFRJ - Km 47 - Seropédica - 23.851-970 - NPSA/EMBRAPA

⁵ - Vânia Lúcia Baeta Andrade - Pesquisadora UFRJ - Km 47 - Seropédica - 23.851-970 - NPSA/EMBRAPA

⁶ - Elisabeth Bastos Ballesteros Pereira - Prof. Adjunto - Dept^o Matemática/UFRJ - Km 47 - Seropédica 23.851-970

parâmetro o meio de cultura Guida-Kupferberg (Passos, 1977), que era comumente empregado pela equipe do Laboratório de Patologia de Reprodução-UPSNA-EMBRAPA-Seropédica-RJ.

Após a inoculação do lavado prepucial ou do muco vaginal nos meios distintos, os mesmos foram mantidos em temperatura ambiente e analisados após 24 horas, colocando-se 0,03 ml do meio entre lâmina e lamínula e contando-se diariamente 30 campos consecutivos até a não visualização do protozoário, quando, então, centrifugava-se o material a 3000 RPM por 15 minutos e observa-se o sedimento ao microscópio para a confirmação da ausência de protozoários.

A análise de variância entre os meios foi feita através do modelo matemático $Y = u + t_i + e_{ij}$, pelo delineamento inteiramente casualizado, considerando-se o dia de leitura máxima do *T. foetus*.

As amostras positivas dos bovinos analisados foram posteriormente inoculadas em meios de cultivo específicos para *Trichomonas sp.* e, em seguida, utilizados em testes com o Lactopep modificado para laboratório que passou a apresentar a seguinte composição:

Leite em pó ¹	- 40 g
Peptona bacteriológica ²	- 8,0 g
Pentabiótico veterinário ³	- 1,0 g
NaCl	- 8,5 g
Soro bovino	- 100 ml
Água destilada	- 900 ml

Desta fórmula, frações de 10 ml foram acondicionadas em tubos de ensaio previamente esterilizados; nestes inoculou-se 0,03 ml das amostras positivas para

T. foetus contendo em média de 200 a 300 protozoários, e adicionou-se 0,5 ml de vaselina líquida estéril na superfície das culturas para garantir a anaerobiose das mesmas.

Para a comparação com o Lactopep, empregou-se a mesma metodologia no de Hanks (Passos, 1977), que serviria como testemunho do experimento, realizando-se 26 repetições com cada meio.

As culturas foram mantidas em estufa bacteriológica em temperatura controlada de 36°C e analisadas após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas de cultivo; para tanto tomavam-se 0,03 ml do meio, que era colocado entre lâmina e lamínula e observavam-se 30 campos consecutivos ao microscópico com aumento de 100x e com o auxílio de um hemocítmetro a fim de avaliar-se a multiplicação progressiva do protozoário.

As médias das repetições obtidas nesta segunda fase do experimento foram analisadas através da curva de tendência e da correlação entre o tempo de cultivo e o número de protozoários vivos, representando-se graficamente o fenômeno.

Resultados

A análise da amostras provenientes de fêmeas naturalmente infectada mostrou que a média do dia de leitura máxima para o meio Lactopep foi de 7,1 enquanto que para o de Guida-Kupferberg foi de 7,5. A análise da variância demonstrou que houve diferença não significativa entre os dois meios (Tabela 1), quando submetidos ao teste "F" caracterizando que ambos são igualmente eficientes na multiplicação do protozoário.

Tabela 1 - Análise da variação do dia de leitura máxima para cultivo de *Tritrichomonas* colhidos de fêmeas bovinas naturalmente infectadas, considerando-se os meios Lactopep e Guida-Kupferberg

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	"F"	
Meios	1	2.814450	0,78	NS
Resíduo	58	3.609760		

Coefficiente de variação = 26,0861%

NS: não significativo pelo teste "F"

Com relação às amostras provenientes de bovinos machos, verificou-se que os meios Lactopep e Guida-Kupferberg apresentaram média de máxima leitura de 9,8 dias e 9,6, respectivamente. A análise de variância revelou que houve diferença não significativa entre os dois meios estudados (Tabela 2). Ambos são eficien-

tes para a multiplicação de *T. foetus*, obtendo ótimos índices no pique máximo de desenvolvimento do parasito.

¹ - Marca NINHO-NESTLÉ

² - Lab. MERCK

³ - Lab. FONTOURA WYETH - Pentabiótico Vet. pequeno porte

Tabela 2 - Análise de variância do dia de leitura máxima para cultivo de *Tritrichomonas foetus* colhidos de bovinos machos naturalmente infectados, considerando-se os meios Lactopep e Guida-Kupferberg

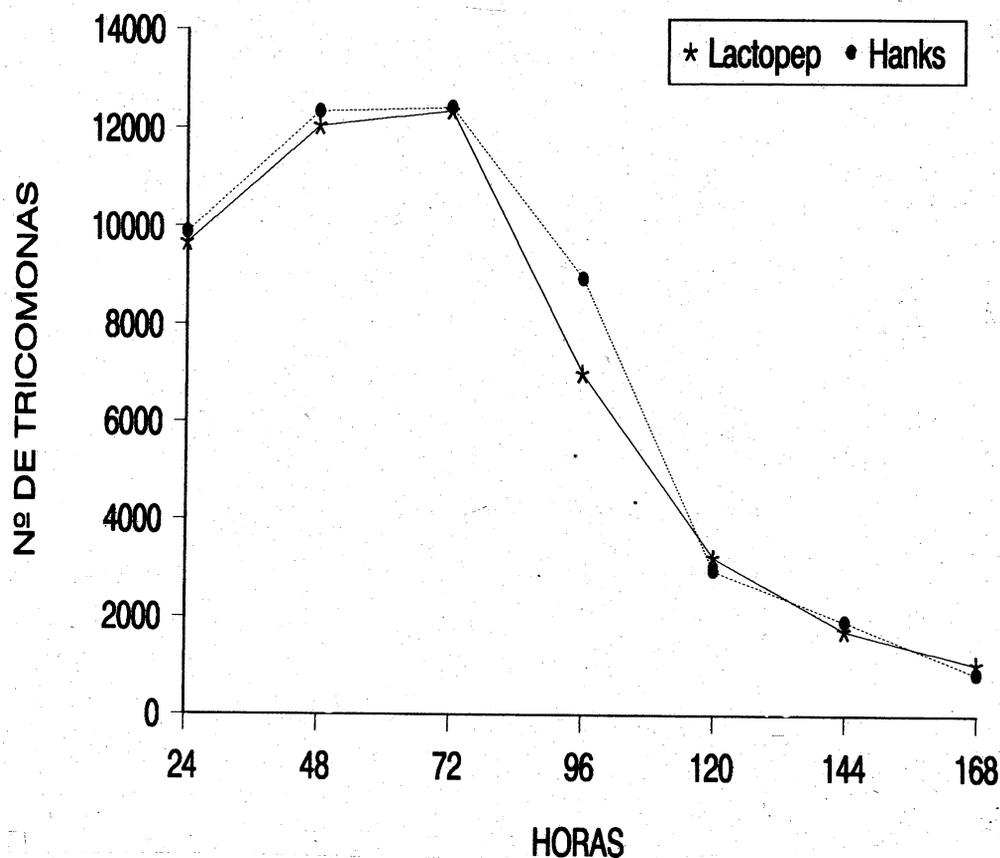
Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	"F"	
Meios	1	0.481934	0,07	NS
Resíduo	50	6.483850		

Coeficiente de variação = 26,2197%

NS: não significativo pelo teste "F"

A média das 26 observações feitas com os meios Lactopep e Hanks revelou que ambos favorecem consideravelmente a multiplicação do protozoário durante os primeiros dias de incubação. Evidenciou-se que as fases de crescimento exponencial e de estabilização são idênticas nos dois meios, que iniciam a fase de declínio com 72 horas de repicados (Figura 1). Esta

fase de declínio é mais pronunciada no cultivo com meio Lactopep, mas a fase de esgotamento do meio é mais marcante no cultivo com meio Hanks. O crescimento de *T. foetus* nestes dois meios tem acentuada correlação negativa com o tempo (Figura 2), sendo a inversão da proporcionalidade mais forte para o cultivo com o meio Hanks.

**Figura 1** - Crescimento de *Tritrichomonas foetus* com relação aos meios de cultivo Lactopep e Hanks, durante 168 horas, sob temperatura de 36°C

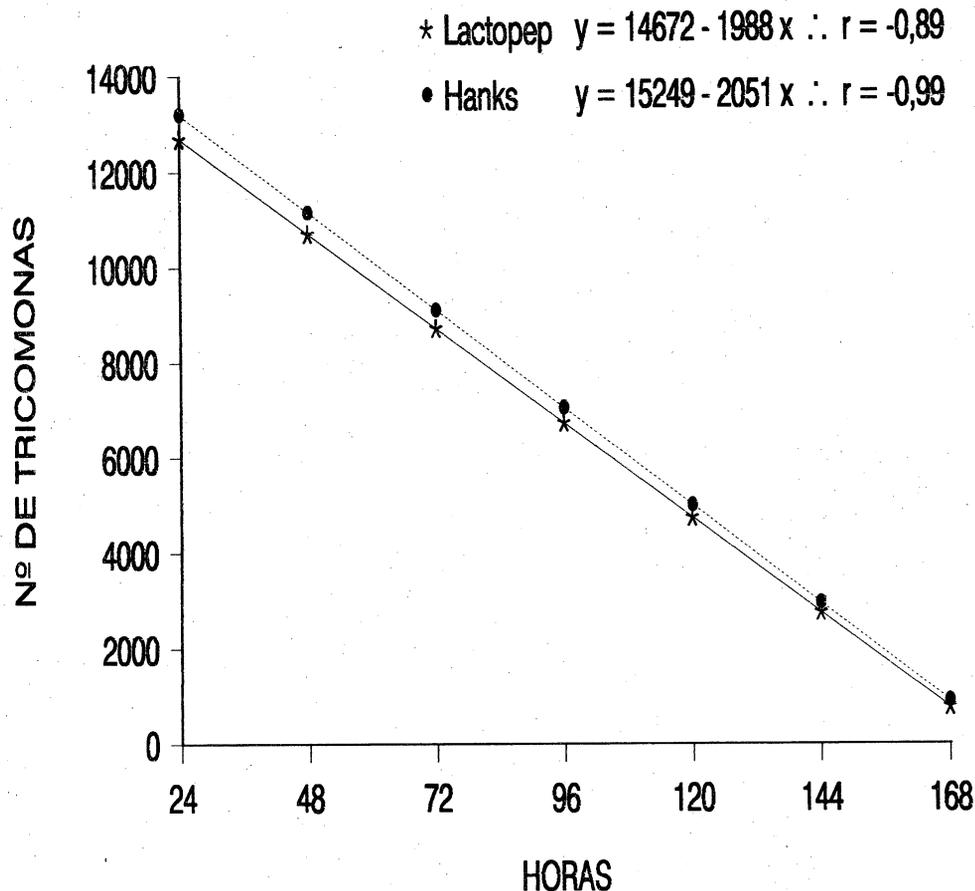


Figura 2 - Crescimento de *Trichostrongylus colubriformis* em função do tempo (horas)

Discussão e Conclusão

A extensão territorial do País, com muitas propriedades rurais em regiões de difícil acesso, não proporciona condições favoráveis para a colheita do material e para a realização imediata dos exames, objetivando o diagnóstico da tricomonose bovina.

Poucos meios de transporte apresentam facilidade de uso e resultados satisfatórios como o Lactopep, conforme já salientado por Lopes et al. (1994).

A peptona, princípio básico deste meio, já foi utilizada para o transporte de *T. foetus* e para o cultivo em laboratório (Witte, 1933; Plastringe, 1943; Rieck, 1953; Muller, 1965; Lopes et al. 1994), por ter na composição peptídeos, aminoácidos e outros fatores essenciais ao crescimento de diversos microorganismos patogênicos.

Outros meios pesquisados requeriam componentes e equipamentos sofisticados para o manuseio, além da conservação em temperatura controlada (Witte, 1933; Plastringe, 1943; Rieck, 1953; Muller, 1965; Kimsey et al., 1980; Martinez et al., 1985; Ferber et al., 1985; Skirrow et al., 1985). Por exemplo, o meio utilizado por Mundt (1958) exigiu além da peptona ou-

tros componentes como fosfato de sódio, glutamina, glicose, sulfato de estreptomina e solução de Ringer modificada, além da incubação a 37°C requerendo, portanto, maior elaboração no seu preparo, encarecendo e dificultando o diagnóstico. O meio liofilizado utilizado por Gualandi & Zanella (1959), constituído por peptona, L-cisteína, levedura autolizada, tioglicolato de sódio e ágar, foi diluído em outras proporções de peptona, levedura autolizada, glicose e ácido para-aminobenzóico em 100 ml de água, sendo assim, mais complexo de ser preparado quando comparado com o meio Lactopep, que utiliza três componentes simples e solução salina suficiente para a multiplicação do protozoário. No Lactopep para laboratório, o soro bovino enriquece substancialmente o meio de cultura.

Consideradas as observações de Fernandez & Dutra (1979) de que o melhor desenvolvimento do *T. foetus* ocorria quando o meio de cultura era colocado a 37°C por 48 horas, confirmou-se que o melhor crescimento no meio Lactopep em laboratório ocorreu a 72 horas do cultivo em temperatura de 36°C (Figura 1).

O Lactopep, por ser um meio seco, supera o de Guida-Kupferberg no baixo custo e fácil preparo. Ade-

mais, pode ser manuseado com segurança, sendo recomendado mesmo quando acontece contaminação por fezes, urina, sangue ou outros produtos orgânicos. No entanto, o seu preparo deve ser realizado em dias de baixa unidade relativa ou em capela com esta característica e asséptica, pois a peptona e o leite em pó possuem alto índice higroscópico, podendo provocar floculação do meio.

A média de crescimento de *T. foetus* obtida pelo Lactopep em laboratório a 36°C durante sete dias foi considerada satisfatória em comparação com o tradicional meio de Hanks (Figuras 1-2), tornando o Lactopep apropriado não só para o diagnóstico da tricomonose bovina como também para a manutenção das cepas de *T. foetus* em laboratório.

Abstract

A new transfer and culture medium to *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). V: Lactopep as a culture medium.

Lactopep medium efficacy for transport of *Tritrichomonas foetus* was checked in sample obtained from preputials washing of bulls and vaginal mucus of cows knowghy *T. foetus* positive, and compared to Guida-Kupferberg medium.

Samples were obtained from bulls or cows with 0,85% saline solution and, half part of sample received three grams Lactopep; to the other half part, three grams of Guida-Kupferberg medium were added. Both groups were kept at environmental temperature and daily examined under microscopy. The results were statistically analysed by a variance analysis for casualised entirely delineation surveying the efficient maximum day. The Lactopep medium and Guida-Kupferberg medium mean proceeded 9.8 day and 9.2 day respectively, with material from bulls, and 7.1 day and 7.5 day, respectively, with material from cows, and the conclusion is that both media are efficient for *T. foetus* maintenance but Lactopep medium has the advantage of the easy preparation and is produced at lower cost.

In second stage to experiment to added in Lactopep medium the fraction of 10% bovine serum for maintainance to *T. foetus* by sucessive tollings in laboratory; the medium was compared with the Hanks medium. The results showed the both media allowed a line around the seven days at the declive but further practicable. The Lactopep medium modiflicated for laboratory also conserve accentuated inversion correlation with the time cultivation, but it is indicat for maintaince of *T. foetus* in laboratory.

Key Words: *Tritrichomonas foetus*, transport and culture medium, Lactopep medium, Guida-Kupferberg medium, Hanks medium.

Referências Bibliográficas

- AMELINGMEIER, R. Estudio preliminar de diagnosis de *Tritrichomonas foetus* en Costa Rica. *Ciênc. Vety.*, v.3 n.1, p. 25-35, 1981.
- FERBER, O., FABRELLO, N., FRANCO, M.A., LOVELY, L., BENITEZ MEABE, O. Presencia de trichomoniasis en el norte de la Provincia de Corrientes. *Vet. Arg.*, v. 2, n. 17, p. 636-638, 1985.
- FERNANDEZ, J.C.T., DUTRA, V. Conservação de *Trichomonas foetus* em líquido amniótico. *Arg. Fac. Vet. UFRGS*, v. 7, p. 145-148, 1979.
- GUALANDI, G., ZANELLA, A. Preparazione ed uso di un teneno liofilizzato per l'isolamento e coltura del *Trichomonas foetus*. *Atti della Soc. Ital. delle Sc. Vet.*, v. 134, p. 754-757, 1959.
- KIMSEY, P.B., DARIEN, B.J., KENDRICK, J.W., FRANTI, C.E. Bovine trichomoniasis: diagnosis and treatment. *J.A.V.M.A.*, v. 177, p. 616-619, 1980.
- LOPES, L.M.S., GUIDA, H.G., SERRA-FREIRE, N.M., JESUS, V.L.T., ANDRADE, V.L.B., PEREIRA, E.B.B. Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928), II Teste comparativo de eficiência na tricomonose em touros. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v. 1, n. 1, p. 13-15, set/dez, 1994.
- MARTINEZ, A.H., BARDON, J.C., NOSEDA, R.P., CORDEVIOLA, J.M. Diagnóstico de trichomoniasis en toros, Propuesta de um esquema de diagnóstico. *Vet. Arq.*, v. 2, n. 20, p. 966-977, 1985.
- MORGAN, B.B., NOLAN, L.E. Laboratory methods for differentiating *Trichomonas foetus* from other protozoa in the diagnosis of trichomoniasis in cattle. *J.A.V.M.A.*, v. 102, p. 11-15, 1943.
- MULLER, W.A. von. Beitrag zur Verbesserung Trichomonadendiagnostik. *Zent. fuer die Ges. Hyg.*, v. 11, p. 75-77, 1965.
- MUNDT, W. Ein Spülmadium zur Diagnostik für *Vibrio fetus* und *Trichomonas foetus*. *Prakt. Tierärz.*, v. 5, p. 140-148, 1958.
- PASSOS, J.J. *Contribuição ao diagnóstico da Tricomoníase Bovina*. Niterói, 1977. 47p. Tese (Mestrado). Faculdade de Veterinária, U.F.F.
- PLASTRIDGE, W. Cultivation of a bacterian free strain of *Trichomonas foetus*. *J. Bact.*, v. 45, p. 196-197, 1943.
- RIECK, G.W. Die Ascorbinsäure als Wachstumsfaktor für *Trichomonas genitalis* (Mazz, 1900) in flüssigen Kulturmedien. *Zent. Vet.*, v. 1, p. 204-213, 1953.

SKIRROW, S., BONDURANT, R. FARLEY, J.,
CORREA, L. Efficacy of ipronidazole against
trichomoniasis in beef bulls. *J.A.V.M.A.*, v. 187, n.
4, p. 405-407, 1985.

WITTE, J. 1933. Bacteria-free culture of trichomonads
from the uterus of cattle on simple media. *Zent. für
Bakt. Paras. Infek. und Hyg.*, v. 128, p. 188-195,
1933.



DYNALAB

Dynastia - Comércio e Representações Ltda.
(PRODUTOS E SERVIÇOS PARA LABORATÓRIOS E HOSPITALARES)

Representante Exclusivo da OXOID (Kits microbiológicos e meios de cultura)
API SYSTEMS (BIOMÉRIEUX) (Kits para identificação de bactérias)
Produtos Químicos, Ferragens e Equipamentos para Laboratórios

Praça Condessa Paulo de Frontin, 40 - Sala VI
CEP.: 20261-190 - Rio Comprido
Rio de Janeiro - RJ

Tel.: (021) 293-1021
FAX.: (021) 273-4771