

## UM NOVO MEIO DE TRANSPORTE E CULTIVO PARA *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). I: DIAS DE VIABILIDADE DOS PARASITOS

LEILA MARIA SILVA LOPES<sup>1</sup>  
HÉLIO GUSTAVO GUIDA<sup>2</sup>  
NICOLAU MAUÉS SERRA-FREIRE<sup>3</sup>  
VERA LÚCIA TEIXEIRA DE JESUS<sup>4</sup>  
VÂNIA LUCIA BAETA DE ANDRADE<sup>5</sup>  
ELIZABETH BASTOS BALESTEIROS PEREIRA<sup>6</sup>

LOPES, L.M.S.; GUIDA, H.G.; SERRA-FREIRE, N.M.; JESUS, V.L.T. de; ANDRADE, V.L.B. de; PEREIRA, E.B.  
Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). I: Dias de viabilidade dos parasitos. **Semina: Ci. Biol./Saúde**, Londrina, v. 16, n. 2, p. 260-263, jun. 1995.

**RESUMO:** Objetivando o desenvolvimento de um meio de transporte e cultivo simples e de baixo custo, utilizou-se peptona bacteriológica em diferentes proporções adicionada a 40 g de leite em pó; na mistura foi acrescentado um grama de penicilina; diluiu-se 0,5 g do meio em 10,0 ml de solução salina e nesses meios líquidos inocularam-se amostras de *Tritrichomonas foetus* isoladas de animais procedentes de vários municípios do Estado do Rio de Janeiro. Durante no mínimo dez dias, procederam-se observações diárias dos cultivos com auxílio de microscópio. Analisados estatisticamente os resultados obtidos, concluiu-se que a dose de oito gramas de peptona sustentava por mais tempo a fase de multiplicação dos *T. foetus*, com período médio de 12 dias.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Tritrichomonas foetus*; meio de transporte; meio de cultura; peptona.

### INTRODUÇÃO

O controle da Tricomonose Bovina depende fundamentalmente do preciso diagnóstico da presença de *T. foetus* no bovino; o êxito do programa só acontece com a detecção oportuna desse protozoário no rebanho. É necessário o uso de metodologia apropriada tanto para a colheita como o transporte do material com o emprego de meios que possam garantir a sobrevivência dos protozoários até o diagnóstico laboratorial.

O primeiro sucesso no isolamento de *T. foetus* foi de WITTE (1933), que conseguiu a cultura livre de contaminação bacteriana utilizando o caldo peptonado com 5 a 10% de sangue desfibrinado; o autor constatou motilidade dos tricomonas até o décimo dia de cultivo, mas a fase de crescimento durou apenas três dias em temperatura de 37°C.

RIEDMULLER (1936) enfatizou que estes flagelados poderiam sobreviver três a quatro dias no soro peptonado enriquecido com soro de equino, de bovino ou de ovino. FITZGERALD (1986) observou que as amostras deveriam ser mantidas refrigeradas, evitando-se o

congelamento, nos casos em que houvesse demora para se realizar o diagnóstico. O autor ainda destacou que o material poderia ser centrifugado e o sedimento examinado ao microscópio, recorrendo-se ao cultivo nos casos da não visualização do flagelado ou para facilitar a distinção de outros protozoários presentes no prepúcio.

Mesmo com tantos estudos realizados sobre Tricomonose Bovina, ainda persistem dificuldades no diagnóstico principalmente pelos requisitos básicos para manutenção da viabilidade dos *T. foetus* entre a coleta e o processamento laboratorial para diagnóstico. Para suprir esta lacuna, esse experimento foi desenvolvido objetivando a identificação de um meio simples, prático e de baixo custo, capaz de manter *T. foetus* viável e com potencial de multiplicação em laboratório para facilitar seu diagnóstico.

### MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração do meio para transporte de *T. foetus* passou pelo método de tentativas quando utilizaram-se séries de frascos contendo de 1,0 a 10,0 gramas de

1 - Médica Veterinária - UFRRJ - Instituto de Biologia/Departamento de Parasitologia Animal - Km 47 - Antiga Rodovia Rio/SP - Seropédica - 23851-970 - Itaguaí/RJ.

2 - Pesquisador aposentado EMBRAPA/NPSA.

3 - Professor Titular em Parasitologia Veterinária - UFRRJ/DPA.

4 - Médico Veterinário - FIPRA.

5 - Pesquisador EMBRAPA/NPSA.

6 - Professor Adjunto Departamento de Matemática/UFRRJ.

peptona, mantendo-se constante o substrato de 40,0 gramas de leite em pó integral (Ninho, Nestlé) e um grama de penicilina (Pentabiótico Veterinário G.A., Lab. Fontoura WYETH). Do preparado tiram-se alíquotas de 0,5 g diluindo-se em 10,0 ml de solução salina a 0,85%. A seguir inoculou-se uma gota (0,03 ml) de amostras de *T. foetus* isolado de bovinos provenientes de vários municípios do Estado do Rio de Janeiro, e que estavam mantidas em laboratório por repiques sucessivos em meio à base de hidrolizado de fígado (Meio-Merck, MERCK). Estas culturas utilizadas eram padronizadas com 48 horas de cultivo, apresentando crescimento homogêneo. Cada amostra foi inoculada dez vezes para cada série.

As séries com concentração de 1,0 a 10,0 g de peptona/40 g de leite em pó + 1 g penicilina inoculadas com *T. foetus* foram mantidas em temperatura ambiente e analisadas a cada intervalo de 24 horas pós-inoculação, por um período mínimo de 10 dias. Para análise retirava-se uma gota da cultura que era colocada entre lâmina e lamínula e examinada ao microscópio com aumento de 100 vezes. No exame diário escolhi-

am-se trinta campos em cada lâmina para a contagem até a não visualização dos protozoários; então centrifugava-se o material a 3.000 RPM por 15 minutos e observava-se o sedimento ao microscópio para maior segurança da não existência de *T. foetus*.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo modelo matemático  $y = \mu + t_i + e_{ij}$ , onde  $\mu$  = média geral,  $t_i$  = efeito das doses,  $e_{ij}$  = efeito do erro, pelo delineamento inteiramente casualizado para análise individual de cada amostra considerando-se o número de dias de leitura. As médias foram submetidas ao teste de Tukey e, para saber-se o efeito das doses e das amostras realizou-se uma análise conjunta. Os quadros e gráficos foram submetidos à análise estatística através de computador utilizando-se o programa statworks.

## RESULTADOS

A média do número de dias de leitura com encontro de *T. foetus* vivo nas diversas amostras para o meio com diferentes doses de peptona variou de 11,1 a 14,3

**TABELA 1 - MÉDIA DO NÚMERO DE DIAS DE LEITURA COM REGISTRO DE *Tritrichomonas foetus* VIVOS EM DEZ DIFERENTES DOSES DE PEPTONA NO PREPARO DO MEIO LACTOPEP PARA DEZ DIFERENTES AMOSTRAS DO FLAGELADO MANTIDO EM CULTURA**

Amostras	Doses de peptona										Média geral das amostras
	1g	2g	3g	4g	5g	6g	7g	8g	9g	10g	
PTF	15,1	14,2	13,9	14,2	11,7	14,4	12,8	16,7	14,2	15,5	14,3
ITAM	11,8	11,6	12,0	11,9	13,9	14,0	14,2	18,0	14,3	11,6	13,3
SCF	12,3	11,7	10,6	13,7	13,1	11,6	13,1	19,6	14,2	12,0	13,2
PP	11,1	12,7	12,5	12,6	12,9	10,6	14,6	18,0	13,9	12,6	13,2
RCF	12,5	12,2	11,2	11,7	11,4	10,9	12,2	16,3	13,8	11,2	12,3
TRF	13,3	12,3	9,0	14,3	13,8	11,4	12,1	15,9	10,5	10,6	12,3
RZF	10,3	11,6	12,5	10,7	12,1	12,0	11,8	15,5	13,3	11,1	12,1
RFP	11,2	10,3	10,7	10,5	13,0	11,6	11,6	16,0	11,6	10,3	11,7
SSA	12,6	12,9	13,5	13,2	13,4	13,1	12,2	16,3	12,1	12,0	13,1
VAS	9,2	10,3	7,4	13,1	9,0	9,3	14,1	16,8	10,6	10,7	11,1
Média geral das doses	11,9	12,0	11,3	12,6	12,4	11,9	12,9	16,9	12,9	11,8	

**TABELA 2 - RESULTADO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA CONJUNTA DO NÚMERO DE DIAS DE LEITURA COM REGISTRO DE *Tritrichomonas foetus* VIVOS EM DEZ DIFERENTES DOSES DE PEPTONA NO PREPARO DO MEIO LACTOPEP E AS REPETIÇÕES DAS AMOSTRAS ESTUDADAS DO FLAGELADO MANTIDO EM CULTURA**

F.V.	G.L.	Q.M.	F
Amostras	9	87,53	5,52**
Doses	9	148,37	15,65**
Amostras x Doses	81	14,55	0,92 NS

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste "F" de Snedecor

NS = Não significativo pelo teste "F" de Snedecor

dias (Tab. 1). Esse meio foi denominado LACTOPEP e foi testado com as amostras PTF (Passa Três Fêmea), ITAM (Itaboraí Macho), SCF (Santa Cruz Fêmea), PP (Papucaia), RCF (Rio Claro Fêmea), TRF (Três Rios Fêmea), RZF (Resende Fêmea), RO (Rio das Ostras), SSA (São Sebastião do Alto) e VAS (Vassouras) de *T. foetus*, todas mantidas por repiques sucessivos em meios de cultura na EMBRAPA/NPSA. Os resultados foram analisados conjuntamente para determinar a dose final de peptona a ser utilizada no meio de transporte. Dessa análise comprovou-se que a concentração de peptona melhor para o meio LACTOPEP de transporte é a de oito gramas (Tab. 1).

O resultado da análise de variância conjunta do número de dias de leitura, das diferentes doses de peptona usada na composição do meio e das repetições das amostras estudadas demonstrou que houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidades pelo teste "F" de Snedecor para amostras e doses. A interação entre amostras e dose revelou que não houve significância entre as diferenças observadas (Tab. 2).

## DISCUSSÃO

Utilizando-se os meios de transporte para cultivo de *T. foetus* referidos na literatura consultada, verificou-se que, até o momento, nenhum deles apresentou eficiência segura para as condições do Rio de Janeiro, daí advindo a necessidade da pesquisa de novos meios que garantam a viabilidade do protozoário por um período mínimo necessário para a realização do diagnóstico. Como característica complementar este meio teria de

ser de fácil preparo e de baixo custo.

Classicamente a peptona vem sendo utilizada por muitos pesquisadores (WITTE, 1933; RIEDMULLER, 1936; GUIDA et al., 1960) em meios de cultivo de *T. foetus* em laboratório, o que comprovava ser um componente de enriquecimento para a manutenção de cepas do flagelado. É sabido que existem na sua composição elementos essenciais ao crescimento de diversos microorganismos patogênicos, mesmo assim a peptona é pouco usada como integrante de meios de transporte para o cultivo de *T. foetus*.

O leite em pó e antibióticos foram utilizados na formulação do meio LACTOPEP com base no meio de RIECK modificado (GUIDA et al., 1960), que enfatiza que o leite complementado com outras substâncias constitui excelente meio de crescimento; reafirmando esta postura estão os trabalhos de WOSU (1977) e de REECE et al. (1983).

Mesmo comprovando que as dez doses de peptona apresentaram boa média na conservação de *T. foetus*, com prazo médio de 12 dias (Tab. 1), a dose de oito gramas é recomendada para compor o meio LACTOPEP, por garantir por mais tempo a multiplicação dos protozoários, chegando a média geral de 16,9 dias. Somando-se a essa performance está o fato de que ao se realizar a contagem diária dos parasitos com uso de microscópio no laboratório, constatou-se que a dose de oito gramas de peptona em 40 g de leite em pó foi a que favoreceu a maior taxa de multiplicação, apresentando o maior número de formas do flagelado, tomando o meio ideal para o transporte e cultivo de *T. foetus*. Outra vantagem está no fácil manuseio e baixo custo de produ-

---

ção do meio, caracterizando o pleno alcance dos objetivos estabelecidos.

## CONCLUSÕES

1. O meio LACTOPEP é eficiente para o transpor-

te e cultivo de *Tritrichomonas foetus*.

2. O meio LACTOPEP é de fácil preparação, manuseio, conservação e de baixo custo.

3. O meio LACTOPEP pode ser utilizado como meio de rotina para repiques de cultivo de *T. foetus* em laboratório.

---

LOPES, Leila Maria Silva; GUIDA, Hélio Gustavo; SERRA-FREIRE, Nicolau Maués; JESUS, Vera Lúcia Teixeira de; ANDRADE, Vania Lucia Baeta de; PEREIRA, Elizabeth Bastos B. A new transfer and culture medium to *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). I. Number of days of reading. **Semina: Ci. Biol./Saúde**, Londrina, v. 16, n. 2, p. 260-263, Jun. 1995.

**ABSTRACT:** Aiming at the development of a simple and inexpensive transfer and culture medium, bacteriological peptone was diluted in powdered milk (40 g) and one grama an antibiotic agent was used; 0,5 g of the culture medium were diluted in 10,0 ml saline solution; samples of *Tritrichomonas foetus*, isolated from animals of several localities in the state of Rio de Janeiro, were inoculated in these media, which were observed daily, under light microscope for, at least, ten days. Statistical analysis of results revealed that a dose of 8 g of peptone was able to maintain the multiplication phase of *T. foetus* for a longer period in an average length of time of approximately 12 days.

**KEY-WORDS:** *Tritrichomonas foetus*, culture medium, transfer medium, peptone.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FITZGERALD, P.R. Bovine Trichomoniasis. *Vet. Clin. A. Am. Food. An. Pract.*, v. 2, n. 2, p. 277-282, 1986.

GUIDA, H.G.; MEDEIROS, P.M.; PIZELLI, G.N. Conservação de *Tricomonas foetus* no meio de Rieck modificado. *Pub. Inst. Zootec.*, v. 35, p. 3-7, 1960.

REECE, R.L.; DENNETT, D.P.; JOHNSON, R.H. Some observations on cultural and transport conditions for *Tritrichomonas foetus* var. brisbane. *Aust. Vet. J.*, v. 60, p. 62-63, 1983.

RIEDMULLER, L. Behaviour of *T. foetus*. *Zlb. Bakt. J.*, v. 137, p. 428-433, 1936.

WHITE, J. Bacteria-free culture of trichomonas from the uterus of cattle on simple media. *Zlb. Bakt. I.*, v. 128, p. 188-195, 1933.

WOSU, L.O. Improved cultural methods for *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Microbiol.*, v. 2, p. 89-93, 1977.