

## Algunas características de cultivo de una cepa costarricense de *Leishmania braziliensis* (O-CR)\*

por

Norma Rivero\*\*

y

Rodrigo Zeledón\*\*

(Recibido para su publicación el 5 de setiembre de 1966)

Desde que el agente del Kala-Azar, *L. donovani*, fue cultivado *in vitro* por ROGERS en 1904 (16), una serie de medios han sido propuestos para el crecimiento de leishmanias y otros hemoflagelados. Según PESSOA y BARRETO (13), Lindenberg en 1906 fue el primero en cultivar *L. braziliensis* en Brasil, pero sus datos no fueron publicados. PEDROSO y DA SILVA en 1911 (12), en el mismo país, obtuvieron su multiplicación, a partir de nódulos cutáneos humanos en medio de N.N.N. preparado según NICOLLE (11). Además de este medio otros como el difásico de RUGAI (17) y el de SENEKJIE (19) se han usado con éxito. Algunos otros, semejantes o más simples que los anteriores, han indicado que *L. braziliensis* es más exigente que *L. tropica* para su crecimiento *in vitro* (RAY, 14, CITRI y GROSSOWICZ, 4).

La única especie de leishmania que se ha logrado adaptar a un medio sintético es *L. tarentolae* (TRAGER, 21). TOBIE (22) ha revisado recientemente estos problemas. En el presente trabajo se estudia la influencia de algunos agentes físicos y químicos sobre el crecimiento de una cepa costarricense de *L. braziliensis*. Una nota previa sobre el tema ya había sido publicada (26).

### MATERIAL Y METODOS

Se usó la cepa O-CR de *Leishmania braziliensis*, aislada de un paciente en el Hospital San Juan de Dios por el Dr. Alfonso Trejos en 1957 y mantenida desde entonces en medio de SENEKJIE (19) con solución de Locke según TOBIE y REES (23). Se cultivó en el mismo medio, en erlenmeyers de 50 ml de

\* Con la ayuda parcial de una subvención económica del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, N.I.H., N.I.A.I.D (Grant AI 03304-05).

\*\* Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica.

capacidad, conteniendo 5 ml de la base con sangre, suero, suero con hematina o hematoporfirina —según el caso— y 5 ml de solución de Locke como sobrenadante, adicionada de 100 U y 0,125 mg/ml de Penicilina y Estreptomina respectivamente.

Con fines comparativos, además de erlenmeyers, se usaron en algunos casos tubos de 25 × 200 mm en posición vertical con las mismas cantidades de medio base inclinado y de solución de Locke. Cuando se requirió agitación constante de los frascos, se usó un agitador eléctrico de rotación. Por regla general se usó una mezcla de sangre desfibrinada, del mismo día, de tres animales de la misma especie o de tres personas. Cuando se usó suero, éste fue obtenido por punción cardíaca de 5 conejos adultos, con jeringas cuyas paredes internas habían sido recubiertas con aceite mineral estéril (Nujol) para reducir al mínimo la hemólisis.

La mezcla de sueros fue esterilizada por filtración en filtros Seitz, y usada al día siguiente, salvo en los casos en que se requirió envejecimiento de la misma. La hematina y hematoporfirina se prepararon en NaOH 0.01 N a una concentración de 300 mg por ciento y se esterilizaron en autoclave. Antes de agregar la sangre o el suero —a una concentración final de 10 % excepto en los casos en que se especifica lo contrario— la base de agar se mantuvo en baño-maría aproximadamente a 50°C. Previa prueba de esterilidad a 37°C por 24 horas, los frascos fueron inoculados por triplicado e incubados a  $26,5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$  C, salvo que otra temperatura fuera requerida. La cantidad de inóculo fue en general de 0.1 ml de un cultivo con buen crecimiento. Al usar medios con suero, o suero más hematina o hematoporfirina, los flagelados fueron lavados por centrifugación por tres veces consecutivas en solución de Locke. Para evitar la evaporación, la boca del frasco fue recubierta con papel de parafina (Parafilm). Los recuentos se efectuaron en triplicado con ayuda del hemocitómetro, previa dilución de 0,1 ml de cada frasco, en caso necesario, agitando los frascos antes por rotación manual durante dos minutos. En los experimentos tendientes a observar el efecto del CO<sub>2</sub> se usaron frascos de Florence con un brazo lateral conectado al cuello del mismo. En dicho brazo se colocó 1 ml de KOH al 10 %, o bien 1 ml de agua destilada (testigos) ambos estériles con un papel de filtro plegado, de 2 cm<sup>2</sup> de área. El medio base y el líquido sobrenadante, en cantidades de 12,5 ml, se inocularon con 0,25 ml de cultivo.

Los recuentos se hicieron utilizando cada vez un frasco de cada una de las dos series. Todas las experiencias aquí relatadas se repitieron de 2 a 8 veces.

## RESULTADOS

Como se aprecia en el cuadro 1, se obtuvo un crecimiento máximo a los 5 ó 6 días, no encontrándose relación entre el máximo de leptomonas y la cantidad inoculada.

Del cuadro 2, y de las figuras 1 a 6, se desprende que los inóculos tomados en las fases de crecimiento logarítmico o de declíneo producen curvas semejantes. La fase "lag" es más prolongada cuando se usan organismos en fase

## CUADRO 1

*Crecimiento de la cepa de Leishmania braziliensis O-CR en función del inóculo en igualdad de condiciones (sangre de conejo al 10 % y temperatura de  $26,5 \pm 5^{\circ} \text{C}$ ). Todos los cultivos usados como inóculo estaban en fase de crecimiento logarítmico excepto los usados en los experimentos 1, 2, 13 y 15*

Exp. N°	Recuento del Inóculo (millones/ml)	Día del máximo crecimiento	Número máximo promedio de leptomonas (millones/ml)
1	2.5	5	72
2	3.5	6	102
3	4	5	110
4	7	5	86
5	8.5	5	126
6	11	5	66
7	11	6	98
8	25	5	80
9	28	5	106
10	30	6	102
11	30	6	96
12	30	6	101
13	32	6	130
14	33	6	131
15	34	4	68
16	35	5	72
17	37	5	65
18	40	5	90

de decrecimiento. Si el inóculo es suficientemente alto, la fase "lag" es prácticamente inexistente cuando se parte de cultivos en fase logarítmica de crecimiento. El cuadro 3 muestra que el crecimiento es mayor en los frascos de Erlenmeyer, sobre todo si los mismos se someten a una constante agitación. En este caso, las leptomonas son más largas y menos móviles. Es digno de notar también que el medio de los frascos agitados mantiene su color rojo característico, mientras que el de los otros se oscurece tempranamente. La figura 7 corresponde al segundo experimento de esta serie.

En relación con la influencia de la temperatura, la figura 8 muestra que la más favorable es la de  $26,5^{\circ} \text{C}$  A  $37^{\circ} \text{C}$  no se observó crecimiento, y lo mismo ocurrió a  $31^{\circ} \text{C}$ , habiendo sobrevivido las leptomonas por escasas 48 horas a esta última temperatura.

El uso de diferentes concentraciones de sangre de conejo no influyó en el crecimiento, y el empleo de frascos con tapa de rosca es equivalente al uso de papel de parafina para evitar la evaporación (figura 9).

Como se muestra en los cuadros 4 y 5, los mejores crecimientos se obtuvieron en presencia de sangre de cobayo y conejo. Las de gallina y hombre

## CUADRO 2

*Efecto de la fase de crecimiento de Leishmania braziliensis (O-CR). Inóculo de medio difásico con sangre de conejo al 10 %*

Exp. N°	Fase	Recuento de Inóculo (millones/ml)	Número máximo promedio de leptomonas (millones/ml)
1	C. I.	55	112
	D.	55	109
	C. I.	5.5	94
	D.	5.5	103
2	C. I.	146	146
	D.	136	130
	C. I.	14.6	79.6
	D.	13.6	79
3	C. I.	30	191
	D.	43	200
	C. I.	3.0	56.6
	D.	4.3	54.6
4	C. I.	92	109
	D.	99	100
	C. I.	9.2	84
	D.	9.9	91

C.I.: crecimiento logarítmico; D.: decrecimiento.

## CUADRO 3

*Efecto del tipo de recipiente y de la agitación en el crecimiento de L. braziliensis O-CR. Todos los recipientes fueron tapados con papel de parafina (Parafilm)*

Cultivo en	Concentración máxima promedio de leptomas (millones/ml)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Tubos de 50 ml en posición vertical	47	29	29.5
Erlenmeyers de 50 ml sin agitación	86	65	98
Erlenmeyers de 50 ml en agitación constante (80 rev./min.)	120	241	133

se mostraron inferiores en este aspecto (figuras 10 y 11).

En los experimentos en que se usó sangre hemolisada por congelación y descongelación, y sangre envejecida por refrigeración prolongada, se notó un efecto perjudicial por parte de la hemoglobina (cuadro 6), mientras que la

sangre envejecida, hasta por un mes, permitió un crecimiento prácticamente igual al de los testigos (cuadro 7). Esto mismo se observó con medios previamente preparados y envejecidos en refrigeración (cuadro 8). El cuadro 9 y las figuras 12 y 13 muestran que la cepa fue incapaz de crecer en medio preparado con suero fresco de conejo, libre de hemoglobina. La adición de hematina o hematóporfirina en concentraciones de 0,75 a 3 mg % produjo un estímulo ligeramente menor al obtenido con sangre total. Concentraciones de hematina más bajas a las anteriores son insuficientes.

El suero, sometido a diferentes temperaturas pierde su capacidad durante el almacenamiento, y este proceso se acelera a temperatura de refrigeración, y más aún a temperatura ambiente (cuadro 10, figura 14).

En los frascos en que el CO<sub>2</sub> del aire fue absorbido, se notó una disminución del crecimiento (cuadro 11).

#### CUADRO 4

*Efecto de tres tipos de sangre (10%) en el crecimiento de Leishmania braziliensis O-CR. Inóculo de medio difásico con sangre de conejo al 10 %*

Exp. N°	Fases del Inóculo	Recuento del Inóculo millones/ml	Crecimiento máximo promedio de leptomonas (millones/ml) en sangre de		
			Conejo	Cobayo	Hombre
1	Decrecimiento	2.5	74	76	9
2	"	3.5	102	148	16
3	"	32	130	121	16
4	"	34	68	78	45
5	Crecimiento Lóg.	3	125	121	109
6	"	28	106	97	16
7	"	35	72	129	70
Promedio		—	96.7	110.0	40.1

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las experiencias que se anotan en los cuadros 1 y 2 muestran una diferencia en cuanto a que, en el primer caso, no se encontró ninguna relación entre el máximo de leptomas obtenido y la cantidad de ellas inoculadas, mientras que en el segundo caso sí parece haberla. Es posible que las diluciones para obtener los inóculos menores del último, así como los recuentos realizados a intervalos muy cortos, deben haber afectado el crecimiento produciendo la diferencia anotada. La fase "lag" fue afectada por aquella en que se encontraban los flagelados del inóculo y por la cantidad del mismo, como se desprende de las figuras del

CUADRO 5

Efecto de dos tipos de sangre (10 %) en el crecimiento de *L. braziliensis* O-CR.  
Inóculo de medio difásico con sangre de conejo al 10 %

Exp. N°	Recuento del Inóculo (millones/ml)	Crecimiento máximo promedio de leptomonas (millones/ml) En sangre de	
		Conejo	Gallina
1	25	80	2
2	30	102	27
Promedio		91.3	14.6

CUADRO 6

Efectos de la sangre hemolisada en diferentes concentraciones en el crecimiento de *Leishmania braziliensis* (O-CR). Los números representan millones /ml.

Exp. N°	Recuento del Inóculo	Testigo sangre al 10 %	Sangre hemo-	Sangre hemo-	Sangre hemo-
			lisada al 10 % (Hemoglobina: 0.63 gramos %)	lisada al 20 % (Hemoglobina: 1.45 gramos %)	lisada al 30 % (Hemoglobina: 2.10 gramos %)
1	6	51	46	39	49
2	14	96	67	67	63
3	40	117	76	81	77

CUADRO 7

Efecto de la sangre envejecida en refrigeración (5°C) en el crecimiento de *Leishmania braziliensis* O-CR

Exp. N°	Recuento del Inóculo (millones/ml)	Crecimiento máximo promedio de leptomonas (millones/ml) y edad de la sangre en días entre paréntesis			
		1	20	91 (29)	95 (14)
2	12	58 (29)	65 (14)	64 (7)	63 (1)*

\* Testigos.

CUADRO 8

Efecto del envejecimiento del medio de cultivo en refrigeración, sobre el crecimiento de una cepa costarricense de *L. braziliensis* O-CR

Exp. N°	Recuento del Inóculo (millones/ml)	Crecimiento máximo promedio de leptomonas (millones/ml) y edad del medio en días entre paréntesis			
		1	25	113 (54)	116 (40)
2	15	94 (115)	90 (104)	79 (98)	106 (1)

CUADRO 9

*Efecto de hematina y hematoporfirina en el crecimiento de Leishmania braziliensis (O-CR)*

Exp. N°	Recuento del Inóculo (millones/ml)	Testigo suero 10%	Testigo sangre 10%	Hematina 3 mg %	Hematopor. 3 mg %	Hematina 0,75 mg %	Hematopor. 0,75 mg %	Hematina 0,60 mg %	Hematina 0,40 mg %	Hematina 0,30 mg %	Hematina 0,06 mg %
1	9	12	86	78	57	80	57	—	—	—	—
2	11	3	65	66	62	52	—	—	—	—	—
3	11	3,6	72,6	—	—	20,6	—	10,5	3,0	—	—
4	12	1,7	105	—	—	98	70	—	—	1,6	1,3
5	12	1,2	92	—	—	63	—	18	2,2	—	—
6	26	2	—	—	—	66	18	—	—	0,9	0,9
7	30	4	101	79	81	57	78	—	—	—	—
8		4	131	126	—	131	—	—	—	—	—
<b>Promedios</b>	33	3,9	93,2	87,3	66,6	70,9	55,8	14,3	2,6	1,3	1,1

CUADRO 10

*Efectos del almacenamiento del suero a diversas temperaturas en el crecimiento de Leishmania braziliensis (O-CR)*  
*En todos los casos se agregó hematina (3 mg %)*

Exp. N°	Recuento del Inóculo (millones/ml)	Crecimiento máximo promedio de leptomonas (millones/ml) y edad del suero en días entre paréntesis				
		Temperatura congelación (- 5° C)	Temperatura refrigeración (+ 5° C)	Temperatura ambiente (Máx. = 22.7° C Mín. = 18.5° C)	Testigo suero	Testigo sangre
1	50	76 (8)	55 (8)	49 (8)	10 (1)	114 (1)
2	5	34 (22)	29 (22)	12 (22)	5 (1)	84 (1)
3	25	83 (15)	10 (119)	8 (15)	1,1 (1)	—
4	40	33 (35)	23 (97)	21 (44)	—	90 (1)
5	50	95 (1)	42 (106)	63 (1)	4 (1)	—
		66 (38)				

Máx: Promedio de máximos

Mín: Promedio de mínimos



CUADRO 11

Efecto de la absorción del  $\text{CO}_2$  del frasco de cultivo en la curva de crecimiento de *L. braziliensis* O-CR. Todos los recipientes fueron tapados con papel parafina (parafilm)

Cultivo en matraz con brazo lateral	Concentración máxima promedio de leptomonas (millones/ml)			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio
con KOH	44	78	50	57,3
Sin KOH	83	102	85	90,0

1 a 6. HERBERT (6) observó que los cultivos de *Trypanosoma theileri* muestran fase "lag" sólo cuando se siembran con organismos en fase de diclíneo.

Como quedó dicho, la agitación favoreció notablemente el crecimiento y creemos que una mayor oxigenación es la responsable. Esto se comprueba por la diferencia de color de los medios, ya que los frascos agitados conservan el color de la oxihemoglobina. En estas condiciones quizás haya un mayor acúmulo de sustancia celular, produciéndose células mayores, con un desgaste mínimo de energía para el movimiento, que pareciera hacerse menos necesario. RISTIC y TRAGER (15) no encontraron ventaja alguna en la agitación de los frascos para el aislamiento primario de *T. theileri*.

Las experiencias mostraron que esta leishmania es sensible a temperaturas relativamente bajas como 31° C. RAY (14) afirma que la temperatura óptima para *L. braziliensis* es de 22° C, y AMARAL (2) dice que el mejor crecimiento se obtiene entre 20° C y 28° C, y que la máxima soportada por ella es 30° C.

CHANG y NEGERBON (5) encontraron que las leishmanias humanas crecen entre 22,5° C y 32° C, siendo ésta última la óptima para *L. braziliensis*.

KRASSNER (8) obtuvo un mejor crecimiento de *L. tarentolae* a 28° C que a 33° C, pero ninguno a 37° C. Lo mismo había sido observado por TRAGER (20) para *L. donovani*.

LEMMA y SCHILLER (9) encontraron que *L. tropica*, *L. braziliensis* y *L. donovani* crecían mal a 32° C, pero que a través de sucesivos pases era posible adaptarlas a esta temperatura, y hasta aclimatarlas posteriormente a 34° C.

El comportamiento de la cepa usada por nosotros guarda relación con los hallazgos de ZELEDÓN y BLANCO (25), quienes han demostrado que esta cepa es altamente infectante para hamsters, pero sólo en aquellas áreas de la piel con temperaturas relativamente bajas.

En relación a la cantidad de sangre empleada en el medio, SALLE y SCHMIDT (18) afirman que, con más del 15 % de sangre de conejo, el creci-

miento de *L. tropica* es pobre. RUGAI (17), usando sangre del mismo animal al 10, 15, 20 y 25 %, encontró que cuanto mayor es la concentración de ella, mayor es el número de leptomonas obtenidas.

La cepa aquí empleada mostró crecimientos semejantes en presencia de concentraciones variadas de sangre. Del empleo de diferentes mezclas de ésta, se desprende que las sangres de hombre y gallina son inferiores a las otras.

RAY (14) usando sangres de hombre, cobayo, caballo, carnero y conejo con *L. tropica*, *L. donovani* y *L. braziliensis*, afirma que todas ellas son satisfactorias, siendo mejor la de hombre y luego las de conejo, cobayo y caballo, e inferior a éstas la de carnero.

RUGAI (17) asegura que la sangre de gato, carnero, gallo y perro pueden sustituir a la del conejo en el cultivo de leishmanias. HEYNEMAN y MANSOUR (7) señalan que las de asno, carnero y cobayo tienen un efecto equivalente a la de conejo en el cultivo de las mismas tres especies humanas de leishmanias.

Sin embargo, en ninguno de los trabajos mencionados se presentan datos cuantitativos suficientes para compararlos con los nuestros.

Las experiencias con sangre hemolisada confirman la suposición de RAY (14) de que la hemoglobina en la fase líquida produce cultivos más pobres. Lo mismo fue observado por RUGAI (17) y por VIVES SABATER y SOLER DURALL (24).

El crecimiento en medios con sangre envejecida en refrigeración, o en medios envejecidos previamente, contrasta con el obtenido en presencia de suero envejecido; este último parece sufrir alteraciones que se traducen en una multiplicación más pobre. Es muy posible que los cambios del suero se deban a efectos de reducción enzimática sobre factores de crecimiento, que se mantienen inalterados por más tiempo cuando los glóbulos rojos están presentes, y por consiguiente hay oxígeno ligado a ellos. Como es de esperar, la temperatura de congelación disminuye este proceso de alteración del suero, pero no es suficiente para evitarlo totalmente.

El requerimiento de hematina por parte de los hemoflagelados es bien conocido desde hace algunos años (ver literatura en LWOFF, 10). En nuestro caso se demostró la necesidad de ésta molécula por parte de la cepa usada, así como también su aparente capacidad para introducir el hierro en la molécula de hemoporfirina. En términos generales el crecimiento en presencia de esta última sustancia es algo más pobre que la de hematina, lo cual se explicaría por la mayor dificultad que tienen las células de usar la hemoporfirina en forma directa.

El trabajo de ADLER (1), quien asegura haber mantenido por muchos años varias especies de leishmanias y trypanosomas en medio de suero sin hemoglobina, podría explicarse por la presencia de trazas suficientes de ella en los sueros, o bien por selección o adaptación de cepas que llegan a requerir muy poca cantidad del hem. En relación a esto debemos decir que mutantes de *Haemophilus influenzae*, que no requieren hematina, han sido dados a conocer en la literatura (BUTLER, 3). La disminución del crecimiento en condiciones en que el CO<sub>2</sub> fue absorbido no puede sorprendernos, puesto que el mismo es un

factor estimulante del metabolismo celular. HERBERT (6), usando un 10 % de CO<sub>2</sub> en los cultivos de *T. theileri*, observó un definido estímulo.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la señora Lic. Eugénie de Monge la revisión del manuscrito.

## RESUMEN

Los autores observaron las características del crecimiento de una cepa costarricense de *L. braziliensis* (O-CR), en un medio difásico y bajo diversas condiciones.

El máximo número de leptomonas fue obtenido al quinto o sexto día, no encontrándose relación entre dicho número y la magnitud del inóculo. Este, en fase de crecimiento o de declíneo, produjo curvas semejantes; pero la fase "lag" sí fue afectada por la del inóculo y por la cantidad del mismo. Sin embargo, diluciones 10 veces menores del cultivo, en fase exponencial o de declíneo, produjeron curvas más bajas que las obtenidas con los mismos cultivos sin diluir.

La agitación circular de los cultivos favoreció el crecimiento, y frascos de erlenmeyer resultaron más favorables que tubos verticales con la misma cantidad de medio. La temperatura de 26,5° C fue mejor que las de 29° C y ambiente; a 31° C y 37° C el flagelado no creció. Diversas concentraciones de sangre de conejo incorporadas en el medio no produjeron diferencias, y las sangres de éste y de cobayo fueron mejores que las de gallina y hombre. La sangre hemolisada mostró cierta inhibición del crecimiento, y la envejecida en refrigerador por un mes, o los medios previamente envejecidos por períodos hasta de dos meses no alteraron su capacidad. Esta fue, sin embargo, notablemente afectada en medios preparados con suero envejecido y hematina. La pérdida de la potencia del suero ocurre lentamente a temperatura de congelación, y se acelera en refrigeración y aún más a temperatura ambiente. El flagelado fue incapaz de crecer en medios con suero fresco de conejo libre de hemoglobina, siendo el crecimiento restaurado por la adición de hematina o hematóporfirina. La absorción del CO<sub>2</sub> del aire trajo como consecuencia una disminución de un 25 a un 50 % en el número de leptomonas.

## SUMMARY

Growth characteristics of a Costa Rican strain of *Leishmania braziliensis* (O-CR) are described, in a diphasic medium and under diverse conditions. The maximum number of leptomonads was obtained on the 5th. or 6th. day, there being no relation between this number and the size of the inoculum. The latter, whether in growth or decline phase, gave similar growth curves; the lag phase, however, was influenced by the phase and quantity of the inoculum. Cultures

in exponential or declining phases diluted 1:10 gave lower curves than the same undiluted cultures.

Circular shaking of the cultures gave better growth, and erlenmeyer flasks proved better than vertical tubes with the same amount of medium. A temperature of 26.5°C was better than room temperature or 29° C. At 31° C and 37° C the flagellate failed to grow. Different concentrations of rabbit blood added to the medium caused no difference in the results. Rabbit and guinea pig blood proved better than chicken or human blood. Hemolysed blood inhibited growth slightly, and blood aged for a month in the refrigerator, or media previously aged up to 2 months, showed no alteration of capacity. Media prepared with aged serum and hematin, however, did lose their potency, slowly at freezing temperature and more rapidly under refrigeration or at room temperature. The flagellate proved unable to grow in fresh rabbit hemoglobin-free serum, growth being restored by the addition of hematin or hematoporphyrin. Absorption of CO<sub>2</sub> from the air resulted in a decrease of 25 to 50% in the number of leptomonads.

### REFERENCIAS

1. ADLER, S.  
1934. Culture of Leishmanias and other Trypanosomidae in hæmoglobin free media. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 28: 201-204.
2. AMARAL, A.D.F. DO,  
1940. Observações sobre a resistencia das culturas de *Leishmania brasiliensis* a varias temperaturas. *Arq. Inst. Biol.*, 11: 5-9.
3. BUTLER, L. O.  
1961. A hematin independent mutant of *Haemophilus influenzae*. *J. Gen. Microbiol.*, 29: 189-197.
4. CITRI, N., & N. GROSSOWICZ  
1965. Growth requirements of *Leishmania tropica* and other leishmanias. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.*, 49: 603-604.
5. CHANG, S. L., & W. O. NEGHERBON  
1947. Studies on haemoflagellates. II. A study of the growth rates of *Leishmania donovani*, *L. braziliensis*, *L. tropica* and *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Inf. Dis.*, 80: 172-184.
6. HERBERT, I. V.  
1965. Some observations on the isolation and *in vitro* culture of two mammalian trypanosomes, *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902, and *T. melophagium* Flu, 1908 with special reference to *T. theileri*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 59: 277-293.
7. HEYNEMAN, D., & N. S. MANSOUR  
1962. Leishmaniasis in the Sudan Republic. 7. Testing of various animal bloods and concentrations in cultures of *Leishmania* sp. with notes on leptomonad survival in chick embryo cultures. *J. Egyptian Pub. Health Ass.*, 37: 187-216 (In *Trop. Dis. Bull.*, 60: 605-700).
8. KRASSNER, S. M.  
1963. The effect of temperature and antibiotics on the growth of *Leishmania tarentolae* in a defined medium. *J. Protozool.*, 10 (Suppl.): 19.

9. LEMMA, A., & E. L. SCHILLER  
1964. Extracellular cultivation of the leishmanial bodies of species belonging to the Protozoan Genus *Leishmania*. *Exptl. Parasitol.*, 15 (6): 503-513.
10. LWOFF, MARGUERITE  
1951. The nutrition of Parasite Flagellates (Trypanosomidae, Trichomonadinae). En Lwoff, A., *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. 1: 129-176. Academic Press.
11. NICOLLE, C.  
1908. Culture des corps de Leishman isolés de la rate dans trois cas d'anémie splénique infantile. *Bull. Sec. Path. Exot.*, 1: 121-126. (Citado en PESSOA y BARRETO, 1948).
12. PEDROSO, A. E., & P. D. SILVA  
1911. Botão de Oriente (Leishmaniose ulcerosa). Cultura da *Leishmania tropica* (*Leishmania wrightii*). *Arch. Soc. Med. Cir. S. Paulo*, 1: 305-314. (Citado en PESSOA y BARRETO, 1948).
13. PESSOA, S., & M. BARRETO  
1948. *Leishmaniose tegumentar americana*, 527 pp., Ministerio de Educação e Saude, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.
14. RAY, J. C.  
1932. Cultivation of various Leishmanias parasitic on solid medium. *Indian J. Med. Res.*, 20: 356-367.
15. RISTIC, M., & W. TRAGER  
1958. Cultivation at 37° C of a Trypanosome (*Trypanosoma theileri*) from cows with depressed milk production. *J. Protozool.*, 5: 146-148.
16. ROGERS, L.  
1904. Preliminary note on the development of trypanosoma in cultures of the Cunningham—Leishman Donovan bodies of cachexial fever and Kala-azar. *Lancet*, 2: 215-216. (Citado en PESSOA y BARRETO, 1948).
17. RUGAI, E.  
1941. Cultura de Leishmanias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1: 153-159.
18. SALLE, A. J., & C. L. A. SCHMIDT  
1928. The metabolism of *Leishmania tropica*. *J. Inf. Dis.*, 43: 378-384.
19. SENEKJIE, H. A.  
1943. Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med.*, 23: 523-531.
20. TRAGER, W.  
1953. The development of *Leishmania donovani* in vitro at 37° C. Effects of the kind of serum. *J. Exptl. Med.*, 97: 177-188.
21. TRAGER, W.  
1957. Nutrition of a hemoflagellate (*Leishmania tarentolae*) having an interchangeable requirement for choline or pyridoxal. *J. Protozool.*, 4: 269-276.

22. TOBIE, ELEANOR J.  
1964. Cultivation of mammalian trypanosomes. *J. Protozool.*, 11 (3): 418-422.
23. TOBIE, ELEANOR, & C. REES  
1948. The cultivation of *Trypanosoma cruzi* in dialysate medium. *J. Parasitol.*, 34: 162-163.
- 

## FIGURA 1:

- 1 = 3 tubos de 50 ml verticales.  
2 = 3 erlenmeyers de 50 ml.  
3 = 3 erlenmeyers de 50 ml en agitación (80 r.p.m.).  
Inóculo: 0,1 ml de cultivo con  $37 \times 10^6$  flag./ml.

## FIGURA 2:

- 1 = Cultivos a 29° C.  
2 = Cultivos a 26,5° C.  
3 = Cultivos a temperatura ambiente.  
(Promedio máximas: 23,1° C  
Promedio mínimas: 18,3° C).  
Inóculo: 0,1 ml de cultivo con  $30 \times 10^6$  flag./ml.

## FIGURA 3:

- 1 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de crecimiento logarítmico ( $30 \times 10^6$  flag./ml).  
2 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de decrecimiento ( $30 \times 10^6$  flag./ml).  
3 = Igual a 1 diluido el inóculo 1/10.  
4 = Igual a 2 diluido el inóculo 1/10.

## FIGURA 4:

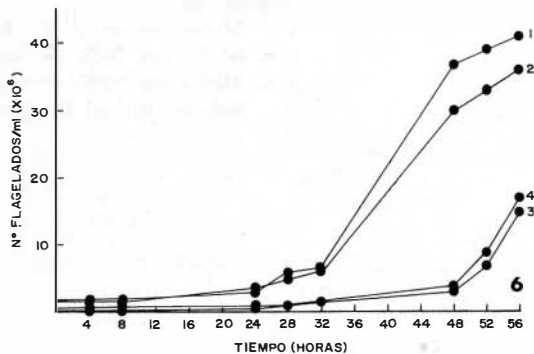
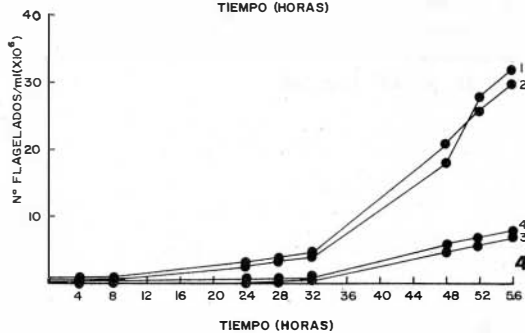
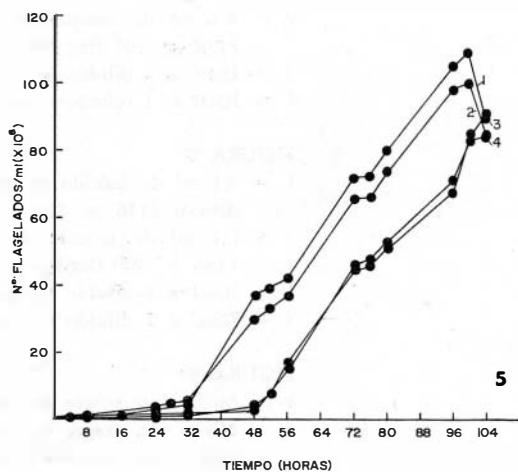
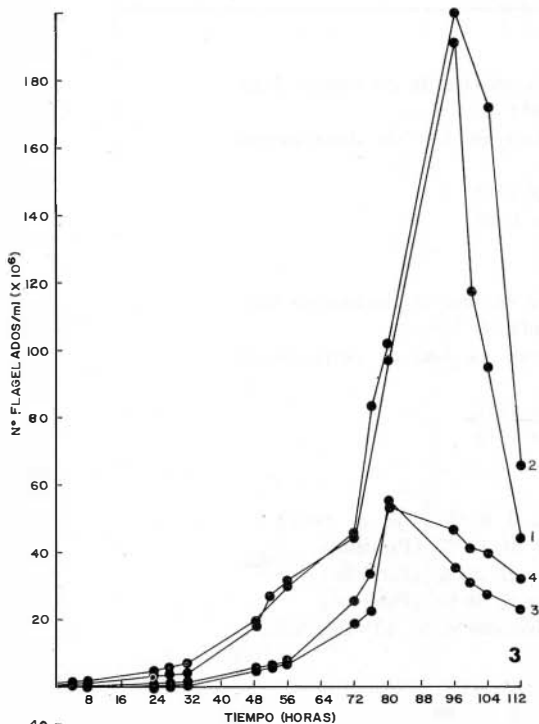
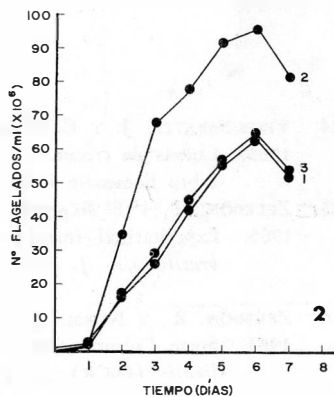
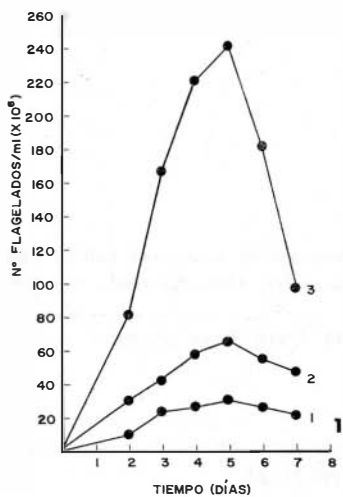
- 1 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de crecimiento logarítmico ( $30 \times 10^6$  flag./ml).  
2 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de decrecimiento ( $30 \times 10^6$  flag./ml).  
3 = Igual a 1 diluido el inóculo 1/10.  
4 = Igual a 2 diluido el inóculo 1/10.

## FIGURA 5:

- 1 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de crecimiento logarítmico ( $92 \times 10^6$  flag./ml).  
2 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de decrecimiento ( $92 \times 10^6$  flag./ml).  
3 = Igual a 1 diluido el inóculo 1/10.  
4 = Igual a 1 diluido el inóculo 1/10.

## FIGURA 6:

- 1 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de crecimiento logarítmico ( $92 \times 10^6$  flag./ml).  
2 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de decrecimiento ( $92 \times 10^6$  flag./ml).  
3 = Igual a 1 diluido el inóculo 1/10.  
4 = Igual a 2 diluido el inóculo 1/10.



24. VIVES-SABATER, J. Y C. SOLER-DURALL  
1965. Curvas de crecimiento de *Leishmania donovani* en medios de cultivo líquidos. Libro homenaje Prof. C. R. López Neyra. *Rev. Iber. Parasitol.*, 15: 509-518.
25. ZELEDÓN, R., Y E. BLANCO  
1965. Experimental infections in animals with Costa Rican strain of *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol.*, 51: 20-21.
26. ZELEDÓN, R., Y NORMA RIVERO  
1964. Some Cultural Characteristics of a Costa Rican Strain of *Leishmania braziliensis* (O-CR). *J. Parasitol.*, 50 (Suppl.): 21.
- 

## FIGURA 7:

- 1 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de crecimiento logarítmico ( $136 \times 10^6$  flag./ml).  
2 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de decrecimiento ( $136 \times 10^6$  flag./ml).  
3 = Igual a 1 diluido el inóculo 1/10.  
4 = Igual a 1 diluido el inóculo 1/10.

## FIGURA 8:

- 1 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de crecimiento logarítmico ( $136 \times 10^6$  flag./ml).  
2 = 0,1 ml de inóculo de cultivo en fase de decrecimiento ( $136 \times 10^6$  flag./ml).  
3 = Igual a 1 diluido el inóculo 1/10.  
4 = Igual a 2 diluido el inóculo 1/10.

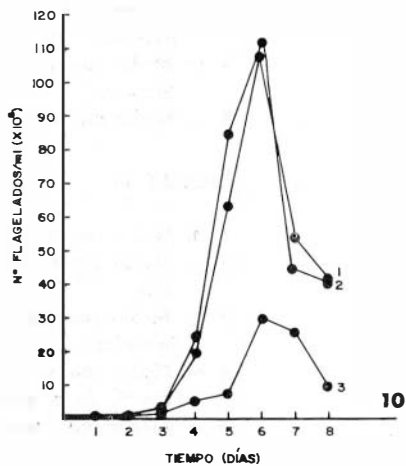
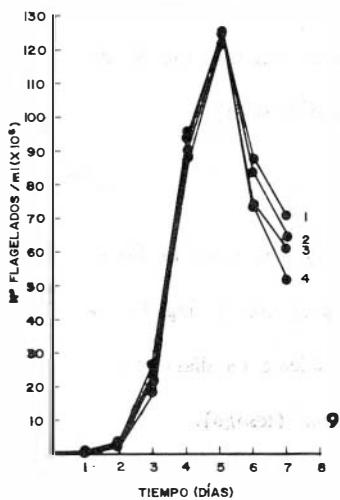
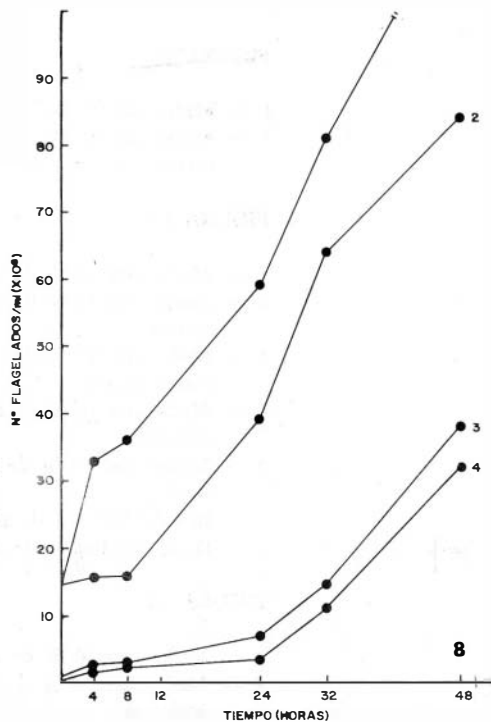
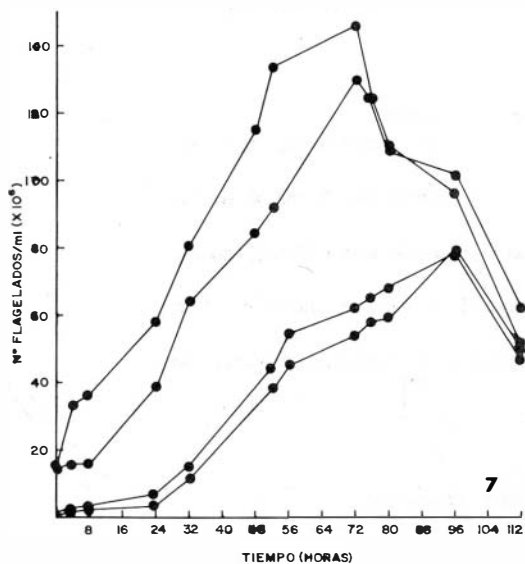
## FIGURA 9:

- 1 = Medio con sangre de conejo al 10 % (tapa de rosca).  
2 = Medio con sangre de conejo al 10 % (Parafilm).  
3 = Medio con sangre de conejo al 20 % (Parafilm).  
4 = Medio con sangre de conejo al 30 % (Parafilm).  
Inóculo: 0,1 ml de un cultivo con  $4 \times 10^6$  flag./ml.

## FIGURA 10:

- 1 = Medio con 20 % de sangre de cobayo.  
2 = Medio con 20 % de sangre de conejo.  
3 = Medio con 20 % de sangre de hombre.  
Inóculo: 0,1 ml de cultivo con  $32 \times 10^6$  flag./ml.





## FIGURA 11:

- 1 = Medio con 10 % de sangre de gallina.
  - 2 = Medio con 10 % de sangre de conejo.
- Inóculo: 0,1 ml de cultivo con  $30 \times 10^6$  flag./ml.

## FIGURA 12:

- 1 = Medio con 10 % de sangre de conejo.
  - 2 = Medio con 10 % de suero de conejo más 3 mg % de hematina.
  - 3 = Medio con 10 % de suero de conejo más 3 mg % de hematoporfirina.
  - 4 = Medio con 10 % de suero de conejo más 0,75 mg % de hematina.
  - 5 = Medio con 10 % de suero de conejo sin hematina (testigo).
- Inóculo: 0,1 ml de suspensión de leptomonas lavadas con  $11 \times 10^6$  flag./ml.

## FIGURA 13:

- 1 = Medio con 10 % de sangre de conejo.
- 2 = Medio con 10 % de suero de conejo más 0,75 mg % de hematina.
- 2 = Medio con 10 % de suero de conejo más 0,60 mg % de hematina.
- 4 = Medio con 10 % de suero de conejo más 0,40 mg % de hematina.
- 5 = Medio con 10 % de suero de conejo (testigo).

## FIGURA 14:

- 1 = Medio con sangre al 10 % (testigo).
- 2 = Medio con suero congelado (8 días) más 3 mg de hematina.
- 3 = Medio con suero refrigerado (8 días) más 3 mg % de hematina.
- 4 = Medio con suero a temperatura ambiente (8 días) más 3 mg % de hematina.
- 5 = Medio con suero fresco sin hematina (testigo).

