

Estimativa do número mínimo de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* necessário para a proliferação em sistema de cultivo em microplacas

Estimated minimum number of promastigotes of Leishmania (Viannia) braziliensis necessary for proliferation in a culture system in microplates

Alessandra Gutierrez;^{1*} Luis Felipe Cantini Tolezano;¹ Elizabeth Visone Nunes Westphalen;¹
II Roberto Mitsuyoshi Hiramoto; Jeffrey Jon Shaw;^{II} José Eduardo Tolezan^I

^INúcleo de Parasitoses Sistêmicas. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretariade Estado da Saúde de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil
^{II}Instituto de Ciências Biomédicas.

^{II}Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

O diagnóstico de certeza da leishmaniose cutânea depende do encontro do agente etiológico. A técnica tradicional de cultura (TTC) realizada em tubos demanda prolongada incubação, grande volume de meio de cultivo e de amostra. A técnica de microcultura (TMC) realizada em placas de 96 poços utiliza pequeno volume de meio de cultivo e de amostra, possibilitando realizar diversos inóculos por amostra examinada. O crescimento de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/84/LTB300) foi realizado nas duas técnicas objetivando determinar o número mínimo de parasitas necessários para a proliferação. A partir de diluições seriadas de suspensão com *L. (V.) braziliensis*, foram obtidos inóculos em concentrações de 1×10^0 até 1×10^3 para o cultivo. Na concentração de 1×10^3 foi observada proliferação parasitária a partir de 48 horas do cultivo. Um único parasita (1×10^0) foi suficiente para permitir a proliferação nas duas técnicas. No inóculo de concentração 1×10^1 a TTC atingiu 1×10^8 parasitas, porém a proliferação foi observada primeiramente na TMC. Na concentração de 1×10^3 a TMC atingiu 2×10^8 parasitas. Concluiu-se que a TMC é uma estratégia que permitiu o cultivo a partir de uma única forma flagelada. Novos estudos estão sendo realizados para avaliar a viabilidade da TMC na utilização como método diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVE: Microcultivo. *L. (V.) braziliensis*. Proliferação in vitro. Leishmania. Diagnóstico parasitológico.

ABSTRACT

The definitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis depends on meeting of etiopathological agents. The traditional culture technique (TCT) is developed in tubes demand prolonged incubation, large volume of the cultivation medium and sample. The microculture technique (MCT) developed in 96 well culture plates use low volume of the cultivation medium and the sample, possible to introduce different inocula per sample examined. The growing of *L. (V.) braziliensis* (MHOM/84/LTB300) was achieved in the two techniques to determine the minimum number of the parasites necessary for proliferation. From serial dilutions with *L. (V.) braziliensis*, inoculations were obtained at concentrations of 1×10^0 to 1×10^3 for cultivation. In concentration of 1×10^3 was observed parasite proliferation since 48 hours of cultivation. A single parasite (1×10^0) was sufficient to allow the proliferation in both techniques. In the inoculum concentration 1×10^1 a TTC reached 1×10^8 parasites, but the proliferation was first observed in the MCT. In concentration of 1×10^3 the MCT reached 2×10^8 parasites. It was concluded that MCT is a strategy what allowed the cultivation since a single flagellate form and further studies are being conducted to assess feasibility of MCT use as a diagnostic method.

KEYWORDS: Microcultivation. *L. (V.) braziliensis*. Proliferation in vitro. Leishmania. Parasitological diagnosis.

INTRODUÇÃO

Sob a denominação de leishmanioses inclui-se um grupo de doenças clinicamente heterogêneas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*.¹ Caracterizam-se por diferentes apresentações de formas clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral, dependendo da espécie envolvida e da resposta imune do hospedeiro.²

A leishmaniose cutânea é o maior problema em vários países tropicais e subtropicais, atingindo de 1 milhão a 1,5 milhão de pessoas anualmente.^{3,4} *Leishmania (Viannia)*

braziliensis é o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea no Brasil.

O protozoário apresenta duas formas morfológicas principais: uma flagelada extracelular ou promastigota, encontrada no tubo digestivo da fêmea do flebotômio, que é o inseto vetor, e outra não flagelada intracelular ou amastigota, observada nos macrófagos dos hospedeiros vertebrados.^{5,6} Tanto as formas amastigotas quanto as promastigotas podem ser cultivadas *in vitro*, mas as formas promastigotas são as mais comumente utilizadas.⁷

O diagnóstico de certeza da leishmaniose cutânea depende do encontro do parasita.^{8,9} A demonstração do parasita ocorre pela observação de aspirado de tecidos, esfregaços, biopsias de espécimes ou cultivo desses espécimes.^{10,11,12} A sensibilidade obtida na microscopia de esfregaço ou biópsia de tecidos e cultivo de espécime é de 33-60% e 50%, respectivamente.^{13,3}

Para o crescimento primário dessas formas promastigotas de *Leishmania* em cultura são conhecidas diferentes formulações. Utiliza-se normalmente um meio bifásico contendo uma base de ágar e sangue desfibrinado como componentes essenciais do meio sólido, que pode ser o NNN (Nicolle's Novy e McNeal's) ou BAB (*blood agar base*) e como fase líquida pode-se utilizar MEM (*minimum essential medium*), EBLB, HOMEM, Schneider, meio 199, RPMI 1640 ou BHI (*brain heart infusion*), sendo possível ainda a adição de soro fetal bovino inativado ou urina humana estéril como complemento nutricional.¹⁴

A técnica tradicional de cultura (TTC) caracteriza-se por demandar prolongada incubação, grande quantidade de meio de cultivo e maior volume de amostra para que possa ser realizada repetidamente.¹⁵ A técnica de microcultura (TMC) realizada em placas utiliza uma pequena quantidade

de meio de cultivo e de amostra, possibilitando a realização de vários inóculos de cada amostra examinada. Além disso, em estudo anterior, esse sistema demonstrou-se viável na proliferação de *Leishmania spp* e *Trypanosoma cruzi*.¹⁶

Neste estudo, a TMC foi avaliada para crescimento primário de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em microplacas de 96 poços e estimado o número mínimo de parasitas necessários para a sua proliferação nessa microtécnica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Leishmania – Foram utilizadas amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/84/LTB300), mantidas em culturas por subpassagens, no sétimo dia de crescimento

Inóculo – A quantificação das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi realizada em câmara de Neubauer e ajustada com solução fisiológica 0,9%, obtendo-se uma suspensão na concentração final de 1×10^6 parasitas/ml. A partir de diluições seriadas dessa suspensão foram preparados inóculos com 1×10^0 , 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 parasitas (Quadro 1). Essas amostras com diferentes quantidades de parasitas foram inoculadas na TMC e na TTC.

Quadro 1. Descrição do preparo das amostras em diluição seriada para o ajuste das diferentes concentrações de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Flaconete	Conteúdo	Suspensão obtida	Quantidade de parasitas para o inóculo
Suspensão mãe	13 µl da cultura = 1×10^6 987 µl de solução salina 0,9%	1 ml contendo 1×10^6	–
1	100 µl da suspensão mãe = 1×10^5 1900 µl de solução salina 0,9%	2 ml contendo 1×10^5	20 µl = 1×10^4
2	100 µl do flaconete 1 = 1×10^4 1900 µl de solução salina 0,9%	2 ml contendo 1×10^4	20 µl = 1×10^2
3	100 µl do flaconete 2 = 1×10^3 1900 µl de solução salina 0,9%	2 ml contendo 1×10^3	20 µl = 1×10^1
4	100 µl do flaconete 3 = 1×10^2 1900 µl de solução salina 0,9%	2 ml contendo 1×10^2	20 µl = 1×10^0

TTC – Em tubos de vidro de 16x160mm foram distribuídos 7ml de BAB com 15% de sangue de coelho desfibrinado como fase sólida e como fase líquida, 2ml de RPMI suplementado com 200µl de soro fetal bovino inativado (SFB) + 1% de gentamicina. Os experimentos na TTC foram realizados em triplicata, sendo inoculados 300µl de cada uma das amostras nas concentrações de 1×10^0 , 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 parasitas. Os tubos foram mantidos a 25°C durante o experimento.

TMC – Em placas estéreis com tampa, fundo em U com 96 poços, foi distribuído 100µL de BAB com 15% de sangue de coelho desfibrinado e 50µL de RPMI suplementado com 5µL de SFB inativado + 1% gentamicina. Para cultivo foram utilizados 24 poços de cada microplaca (Figura 1). Os experimentos da TMC foram realizados em quadruplicatas de 3 poços com inóculo de 50µl por poço de cada amostra nas concentrações de 1×10^0 , 1×10^1 ,

1×10^2 , 1×10^3 parasitas. Os poços não utilizados foram preenchidos com 200µl de solução fisiológica a 0,9% para evitar a evaporação durante o período de incubação. As microplacas foram mantidas a 25°C durante o experimento.

As duas técnicas de cultivo foram examinadas em quatro ocasiões: 48h, 120h, 168h e 216h após a inoculação. Cada uma das seqüências de 3 poços descritos acima correspondeu a um determinado período de observação da cultura na microplaca. Em cada observação foram examinados dois poços e dois tubos, sendo preservado o terceiro poço e o terceiro tubo de cada concentração para eventual contaminação dos dois primeiros. Uma alíquota da cultura foi colocada na câmara de Neubauer para a contagem com a utilização de microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) em objetiva de 40x, sendo quantificados todos os resultados.

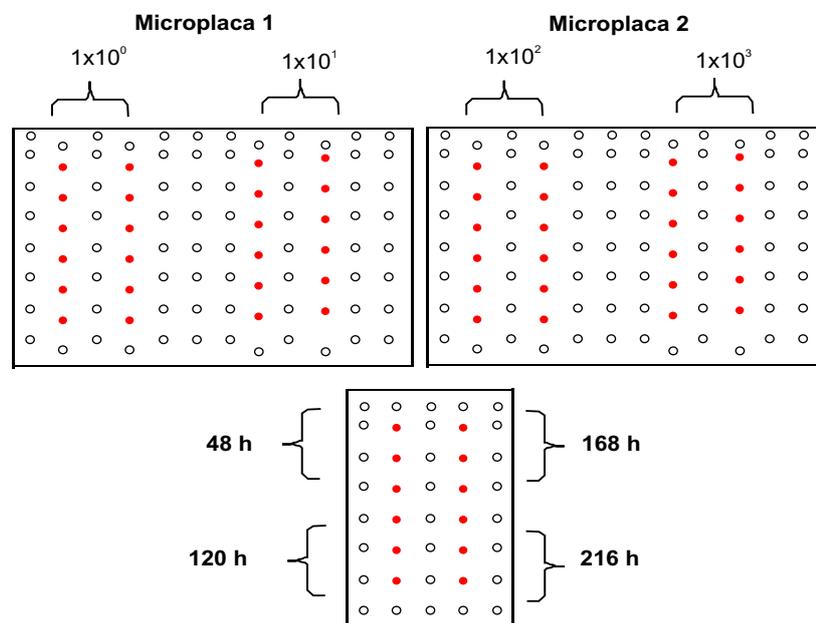


Figura 1. Representação esquemática da microplaca de 96 poços. Nos poços vermelhos foram distribuídos 100µl de BAB com 15% de sangue de coelho desfibrinado e 50µl de RPMI suplementado com 5µl de SFB + 1% gentamicina + 50µl da amostra. Cada amostra na respectiva concentração (1×10^0 ; 1×10^1 ; 1×10^2 ; 1×10^3) foi inoculada em 12 poços correspondendo a duas colunas da microplaca, sendo utilizada para o experimento duas microplacas. No detalhe observa-se a disposição das quatro seqüências de poços utilizados para cada amostra e tempo para observação.

RESULTADOS

Ao término do experimento, foi observado que *L. (V.) braziliensis* proliferou em ambos os métodos de cultivo e com todas as quantidades de parasitas inoculados (Tabela 1). Com o inóculo de 1×10^3 foi observada proliferação parasitária a partir de 48 horas do cultivo.

Mesmo na quantidade mínima, um único parasita (1×10^0) foi suficiente para permitir a proliferação tanto na TTC quanto na TMC, a partir de 120 e 216 horas de cultivo, respectivamente. Com esse inóculo, o maior crescimento foi observado na TTC (1×10^7 parasitas/ml), com 216 horas do inóculo.

No inóculo de 1×10^1 houve maior crescimento na TTC (1×10^8 parasitas/ml), porém o crescimento foi observado primeiramente na TMC a partir de 120 horas do cultivo, enquanto que o crescimento na TTC foi observado a partir de 168 horas.

Na quantidade inicial de 1×10^2 parasitas, os dois métodos atingiram como maior

crescimento 1×10^8 parasitas/ml, ambos com 168 horas de cultivo. Com o inóculo de 1×10^3 parasitas o maior crescimento foi observado na TMC (2×10^8 parasitas/ml) com 168 horas do início do experimento.

DISCUSSÃO

Para o cultivo de protozoários do gênero *Leishmania* são necessários alguns pré-requisitos: um laboratório com estrutura mínima de materiais e equipamentos para impedir ou reduzir ao máximo as oportunidades de contaminações; técnicos treinados e dedicados à realização de intensivos procedimentos de preparação e inoculação da amostra a ser cultivada e, também, para as continuadas observações para verificação do crescimento parasitário. As técnicas tradicionais de cultivo desses protozoários são realizadas em tubos de ensaio e, além de muito laboriosos, geralmente apresentam baixa sensibilidade.¹⁵

Tabela 1. Crescimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na técnica tradicional de cultura (TTC) e na técnica de microcultura (TMC) proveniente de diferentes números de parasitas inoculados. TMC⁰, TTC⁰; TMC¹, TTC¹; TMC², TTC²; TMC³, TTC³ – inóculos à 1×10^0 , 1×10^1 , 1×10^2 e 1×10^3 parasitas, respectivamente.

Cultivo (horas)	Número de parasitas/ml							
	TMC ⁰	TTC ⁰	TMC ¹	TTC ¹	TMC ²	TTC ²	TMC ³	TTC ³
48	0	0	0	0	0	0	3×10^7	4×10^5
120	0	4×10^6	2×10^6	0	2×10^6	5×10^6	6x106	2×10^6
168	0	6×10^6	5×10^6	1×10^8	1×10^8	1×10^8	2×10^8	1×10^8
216	5×10^6	1×10^7	6×10^7	5×10^7	2×10^7	1×10^7	3×10^7	0

0 = ausência de *Leishmania* na alíquota examinada

Hide *et al.*¹⁷ propuseram como alternativa um sistema de cultivo em microplacas. Esses autores afirmam que a proliferação de *Leishmania* em microplacas é decorrência da necessidade de utilização de um menor volume de amostra a ser semeada e da proporção de ar disponível neste aparato. Boggild *et al.*,¹⁸ que realizaram o microcultivo em sistema de tubos capilares, apontam as condições de microaerofilia e os elevados níveis de CO₂ como responsáveis pela maior sensibilidade dessa técnica. Entendem ainda que esse sistema é mais propício para a transformação de amastigota em promastigota.

Lemesre *et al.*¹⁹ defendem que o tamanho do inóculo influencia no crescimento de *Leishmania* sp e que não há crescimento de *L. (L.) infantum chagasi* ou *L. (V.) braziliensis* com inóculos diluídos em quantidade inferior a 1x10⁴ parasitas/ml em meio de cultivo. Maia *et al.*²⁰ também defendem que o sucesso da cultura depende da carga parasitária. Entretanto, Lightner *et al.*²¹ defendem que em teoria bastaria um único parasita viável para obter-se multiplicação e detecção em cultura. No presente estudo, observou-se a proliferação de *Leishmania (V.) braziliensis* tanto na TTC quanto na TMC, com inóculo em todas as concentrações (1x10⁰, 1x10¹, 1x10², 1x10³).

Deve-se destacar que mesmo a partir do inóculo de um único parasita observou-se a proliferação desde 216 horas na TMC e 120 horas na TTC. Com esse inóculo mínimo de 1x10⁰, observou-se densidade de 5x10⁶ e 1x10⁷ parasitas na TMC e TTC, respectivamente.

A detecção mais precoce de proliferação parasitária nas duas técnicas foi observada com 48 horas de cultivo no inóculo, com concentração de 1x10³ parasitas/ml. Na

técnica de microcultivo em tubos capilares, Allahverdiyev *et al.*^{22,23} descreveram essa mesma precocidade para a demonstração da presença de promastigotas de *Leishmania* a partir de diferentes tecidos em situações de quadros clínicos de leishmaniose tegumentar e visceral. Esses resultados remeteram a expectativas favoráveis em relação à utilização da TMC para fins diagnósticos.

A quantidade de parasitas alcançados no ensaio de quantificação excederam 1x10⁸ parasitas/ml, o que torna viável a realização de outros experimentos suplementares, como, por exemplo, produção de antígenos para a realização de testes diagnósticos; estudos sobre biologia celular do próprio parasita; ultraestrutura etc.

Ao pensarmos nas potencialidades das técnicas de cultura como instrumento diagnóstico das leishmanioses para a TTC, embora os parasitas possam ser observados desde a primeira semana de cultivo, na maioria das vezes são necessárias novas observações após 2 ou 3 semanas.²⁰ Essa condição praticamente inviabiliza a metodologia como uma ferramenta diagnóstica.

Em experimento que incluiu o cultivo de aspirado de baço de 103 cães com leishmaniose visceral, 84,5% (87/103) dos resultados positivos na TMC foram obtidos em 48 horas (Gutierrez *et al.*, dados em fase de publicação). A precocidade na observação promove expectativa favorável na utilização da TMC para fins diagnósticos.

Ainda segundo Maia *et al.*,²⁴ a TTC também apresenta desvantagens em relação à susceptibilidade para a contaminação microbiológica. A estratégia adotada no presente estudo incluiu a inoculação das amostras em 12 poços diferentes na TMC, diminuindo assim a possibilidade de contaminação. Além disso, ao semear

pequena quantidade de amostra (50µl por poço), semeia-se também menor quantidade de interferentes que podem promover contaminação ou inibição do crescimento do parasita. Essa contaminação ou inibição normalmente ocorre devido à proliferação de fungos ou bactérias no meio de cultivo.²⁵ Dessa maneira, a TMC tem como vantagem o potencial uso para crescimento primário,

sendo uma ferramenta para tornar oportuno e rápido o diagnóstico das leishmanioses.

No presente estudo, concluímos que a TMC é uma estratégia que permitiu o cultivo a partir de uma única forma flagelada. Novos estudos estão sendo realizados para avaliar a viabilidade da TMC para utilização como método diagnóstico.

REFERÊNCIAS

1. Neuber H. Leishmaniasis. J. Dtsch Dermatol Ges. 2008;6(9):754-65.
2. Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2004; 23(2):661-76.
3. Oumeish OY. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. Clin dermatol. 1999;17:249-54.
4. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol. Infect Dis. 2004;27:305-18.
5. Bates PA, Tetley L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. Experimental Parasitology. 1993; 76:412-23.
6. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília; 2007. p.21.
7. Garcia AS. Alternativas nutricionais para o crescimento primário *in vitro* e para a identificação de protozoários do gênero *Leishmania* [dissertação de mestrado]. São Paulo: Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007.
8. Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. Mem do Inst Oswaldo Cruz. 1994;89(3):463-9.
9. Prata A, Silva LA. Calazar. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. V. 1, p. 713-32.
10. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007;7(9):581-96.
11. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005;366:1561-77.
12. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006;123:311-30.
13. Andresen K, Gaafar A, El-Hasan A, Ismail A, Dafaila M, Theander TG, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. A comparison with direct microscopy of smears and section from lesions. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90:133-5.

14. Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):374-89.
15. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Adauí V, Tulliano G, et al. Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3680-84.
16. Gutierrez A, Tolezano LFC, Garcia EL, Westphalen EVN, Westphalen SR, Araújo MFL, Barbosa JER, Aureliano DP, Taniguchi HH, Cunha EA, Garcia RA, Hiramoto RM, Tolezano JE. A microculture technique for growing trypanosomatids parasites of leishmaniasis and chagas' disease. Preliminary results. VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz; outubro de 2007; São Paulo.
17. Hide M, Singh R, Kumar B, Banuls AL, Sundar S. A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. *Acta Trop.* 2007;102:197-200.
20. Maia C, Ramada J, Cristóvão J, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2009;179:142-4.
21. Lightner LK, Chulay JD, Bryceson ADM. Comparison of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* from splenic aspirates. *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32(2):296-9.
22. Allahverdiyev AM, Uzun S, Bagirova M, Durdu M, Memisoglu HR. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(3):294-7.
23. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabas E, et al. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(2):276-80.
24. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):274-87.
25. Oliveira MA, Pires AS, Bastos RP, Lima GM, Pinto SA, Pereira LI, et al. *Leishmania spp.* parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2010;52(2):83-8.

Recebido em: 2/9/2010
Aprovado em: 14/12/2010

Correspondência/correspondence to:

Alessandra Gutierrez
Av. Dr. Arnaldo, 351 - 8º andar
CEP: 01246.901 - São Paulo - Brasil
Tel. 55 11 3068-2891
E-mail: alegutierrez@gmail.com

Nota: Este trabalho teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Edital MCT-CNPq/MS - SCTIE - DCIT - Doenças Negligenciadas. Proc. 25/2006.

*Parte da dissertação de mestrado: Desenvolvimento, padronização e avaliação da técnica de microcultura para o crescimento primário e proliferação de *Leishmania spp.*, no diagnóstico etiológico das leishmanioses, 2010; apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.