

# Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana\*

## *Comparative study of parasitological techniques for demonstration of amastigotes and primary isolation of promastigotes in American Cutaneous leishmaniasis\**

Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio<sup>1</sup>  
Eurico Aparecido da Silva<sup>4</sup>

Gilberto Brown de Andrade<sup>2</sup>  
César Augusto Cuba Cuba<sup>5</sup>

Antonio César Pereira<sup>3</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS - O PCR tem alta sensibilidade no diagnóstico da LTA, mas é caro e distante da prática. A cultura e o esfregaço são práticos, mas pouco sensíveis.

OBJETIVO - O objetivo deste trabalho foi comparar os dois últimos métodos, buscando maior sensibilidade e menor custo.

MÉTODOS - Foram comparados três meios de cultura no isolamento de leishmânia: Difco agar sangue + Schneider + soro bovino fetal (20%); Difco agar sangue + Schneider + urina humana (2%); Schneider + urina humana (2%). Foram comparadas, também, duas técnicas de pesquisa de amastigotas: esfregaço realizado com biópsia, ou raspado através de palito (matchstick).

RESULTADOS - Os índices de positividade e contaminação (29 a 33% e 8 a 11%, respectivamente,  $p > 0.05$ ) foram semelhantes na comparação dos cultivos. Os esfregaços com biópsia, ou palito também não tiveram diferenças significativas (14 e 19%, respectivamente,  $p > 0,05$ ). A *Leishmania (Viannia) braziliensis* predominou.

CONCLUSÃO - No Brasil, a urina pode substituir o soro fetal bovino. Há vantagem na relação custo/benefício. A urina não tem custo enquanto 500ml de soro bovino fetal custa 185 dólares.

Palavras-chave: Diagnóstico; *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose cutânea.

**Abstract:** BACKGROUND - PCR is a highly sensitive procedure for the diagnosis of LTA, but it is expensive and not readily available. Culture and smearing are practical, but they lack sensitivity.

OBJECTIVE - The objective of this work is to compare the latter two methods in order to achieve a higher sensitivity at a lower cost.

METHODS - Three culture media were compared in the process of isolating leishmaniasis: blood Agar Difco + Schneider + 20% fetal calf serum; Difco + Schneider + human sterile urine (2%); Schneider with sterile human urine (2%). Moreover, two techniques were compared for the demonstration of amastigotes: biopsy performed with smears, or matchstick scrapping.

RESULTS - The positivity and contamination indices (29-to-33% and 8-to-11%, respectively,  $p > 0.05$ ) were similar when comparing the cultures. The smears carried out by biopsy or the matchstick scrapping procedure had no significant differences (14 and 19%, respectively,  $p > 0.05$ ). *Leishmania (Viannia) braziliensis* predominated.

CONCLUSION - In Brazil, urine may substitute fetal calf serum. The cost-to-benefit ratio is advantageous. Urine has no cost, while the market value of 500 ml of fetal calf serum is \$US 185.

Key words: Diagnosis; *Leishmania braziliensis*; Leishmaniasis, cutaneous.

Recebido em 5.07.2001. / Received in July, 5<sup>th</sup> of 2001.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 16.04.2002. / Approved by the Consultive Council and accepted for publication in April, 16<sup>th</sup> of 2002.

\* Trabalho realizado no Serviço de Dermatologia do HUB; Laboratório de Dermatologia e Laboratório de Parasitologia da UnB. / Work done at "Dermatology Service of the HUB; UnB Dermatology laboratory and Parasitology laboratory".

<sup>1</sup> Professora Adjunta de Dermatologia, Coordenadora do Laboratório de Dermatologia, Chefe do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB)-Universidade de Brasília (UnB). / Adjunct Professor of Dermatology, Coordinator of the Dermatology Laboratory, Head of the Dermatology Service of the Hospital Universitário de Brasília (HUB)-Universidade de Brasília (UnB).

<sup>2</sup> Médico residente da Clínica Médica do Hospital Distrital de Brasília, ex-aluno da UnB. / Resident M.D. of the Hospital Distrital de Brasília Medical Clinic, and Alma Mater of UnB.

<sup>3</sup> Médico, ex-aluno da UnB. / M.D., Alma Mater of UnB.

<sup>4</sup> Médico, ex-aluno da UnB. / M.D., Alma Mater of UnB.

<sup>5</sup> Professor Titular de Parasitologia, Coordenador do Laboratório de Parasitologia da UnB. / Titular Professor of Parasitology, Coordinator of the UnB Parasitology Laboratory.

## INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar americana pode ser realizado mediante exames parasitológicos, provas imunológicas e métodos da biologia molecular. Nos exames parasitológicos busca-se a evidênciação do parasito por meio de exames direto e indireto com a finalidade de confirmar a causa da doença.

Dois métodos parasitológicos importantes são o esfregaço em lâmina, utilizando fragmento de tecido obtido por biópsia ou por raspado da lesão,<sup>1</sup> e o crescimento de *Leishmania* em cultura obtida pela inoculação do material retirado da punção aspirativa da lesão ou da biópsia triturada. Ambos os métodos têm baixos percentuais de achado de parasito principalmente em se tratando de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.<sup>2,3,4</sup> Os exames de demonstração de parasito por esfregaços são importantes porque são facilmente realizados e podem fornecer o diagnóstico com rapidez se observada a correta preparação da lâmina. Há mais sucesso no achado do parasito em cultura do que no esfregaço. A pesquisa parasitológica por inoculação em hamster, apesar de ser mais sensível, é lenta e onerosa. Realizar três aspirados em diferentes locais da lesão aumenta a sensibilidade do isolamento das promastigotas em culturas das lesões cutâneas.<sup>2,3</sup>

Howard e colaboradores demonstraram que a urina humana estimula a divisão celular *in vitro* de *Leishmania*, podendo facilitar o cultivo primário de células infectadas.<sup>5</sup> Armstrong e colaboradores relataram que a urina humana estéril adicionada ao meio de cultura também estimula a divisão celular de formas promastigotas e facilita o cultivo primário de células infectadas de tecido animal, podendo substituir o soro fetal bovino nos meios de cultura.<sup>6</sup> Foram usadas, em ambos casos, cepas já identificadas e mantidas em criopreservação.

O objetivo deste estudo foi verificar se a urina humana estéril, adicionada ao meio Difco e Scheneider, seria mais eficiente ou poderia substituir o soro bovino fetal em cultivos de espécies de *Leishmanias* existentes no país, bem como se as técnicas de esfregaço, com coleta do material por biópsia ou *matchstick*, poderiam ter sensibilidades diferentes.

## PACIENTES E MÉTODOS

Foram selecionados 21 doentes portadores de lesões cutâneas de LTA atendidos em ambulatório especializado dessa enfermidade no Hospital Universitário de Brasília (HUB), Universidade de Brasília. Todos os pacientes foram submetidos à reação de Montenegro, pesquisa indireta de anticorpos fluorescentes, exame histopatológico e posterior tratamento das lesões da pele. Haviam sido previamente esclarecidos a respeito do trabalho para o qual deram seu consentimento. Foram incluídos os pacientes com lesão da pele compatível com LTA e que tivessem, além da intradermoreação de Montenegro positiva, pelo menos outro exame específico positivo: esfregaço, cultura, IFI ou exame histopatológico. A assepsia das lesões foi realizada com soro fisiológico a 0,9%, álcool iodado e álcool a 95°, nessa seqüência.

## INTRODUCTION

*The laboratory diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis (ACT) may be performed by the aid of parasitological tests, immunologic proofs and molecular biology methods. In parasitological tests, evidence of parasites was sought by means of direct and indirect tests for the purpose of confirming the cause of the disease.*

*Two important parasitological methods are laminated smears, using the tissue fragment obtained by biopsy or by matchstick scrapping of the lesion,<sup>1</sup> and growth of Leishmania in culture obtained by the inoculation of material withdrawn from the lesion aspired by punch biopsy or by triturated biopsy. Both methods have a lower percentage of parasite findings, mainly regarding Leishmania (Viannia) braziliensis.<sup>2,3,4</sup> Smear tests for revealing the parasite are important because they are easily performed and may provide rapid diagnosis if the slide preparation is done correctly. The finding of parasites is more successful in culture sampling than by smear. Parasitological research by inoculation in hamsters, in spite of being more sensitive, is slow and onerous. Performing three aspirations at different lesion sites increases the sensitivity of isolating promastigotes in cultures of the cutaneous lesions.<sup>2,3</sup>*

*Howard et al. showed that human urine stimulates cell division in vitro of Leishmania, possibly facilitating the primary culture of infected cells.<sup>5</sup> Armstrong et al. reported that sterile human urine added to the culture medium also stimulates cell division in promastigote forms and facilitates the primary culture of infected animal tissue cells, possibly substituting calf fetal serum in culture media.<sup>6</sup> Previously identified strains maintained in cryopreservation were used in both cases.*

*The objective of this study was to verify whether sterile human urine added to the Difco and Scheneider medium would be more efficient or could substitute fetal calf serum in Leishmanias species cultures available in the country. The second objective was to determine whether the smear techniques, in association with material collected by biopsy or matchstick scrapping technique, could have different sensibilites.*

## PATIENTS AND METHODS

*A selection was made of 21 patients with ACT cutaneous lesions undergoing care at the outpatient clinic specialized in the disease located at the Hospital Universitário de Brasília (HUB), Universidade de Brasília. All patients were submitted to Montenegro's reaction, indirect survey of fluorescent antibodies, histopathological test and later skin lesion treatment. They had been previously informed of the work, to which they gave their consent. Also included were patients with skin lesions compatible with ACT and who had, apart from positive Montenegro's intradermoreaction, at least another positive specific test: smear, culture, IFI or histopathologic test. Asepsis of lesions was performed with 0.9% physiological serum, iodized alcohol and 95o alcohol, in this sequence. The aspired sites and biopsies were anaes-*

Os locais dos aspirados e biópsias foram anestesiados com lidocaína a 2% contendo adrenalina, excetuando-se esta última quando se tratava de extremidades. Com seringa munida de agulha de 25 x 8mm, contendo 0,5ml de solução salina com gentamicina (100mcg/ml), introduzida sob leve pressão na borda de superfície íntegra e infiltrada da lesão, o material foi aspirado e inoculado nos tubos de cultura.

Foram usados meios de cultura com três composições diferentes: 1. Difco ágar-sangue complementado com 0,5ml de Schneider (20% de soro bovino fetal) como sobrenadante (D+S+SB); 2. meio similar ao anterior acrescido de urina humana estéril (U) em concentração de 2% filtrada em milipore bacteriológico com filtro de 0,45m (D+S+SB+U); 3. meio contendo Schneider (sem soro bovino fetal) suplementado com U a 5% (S+U). Todos os meios foram acrescidos de gentamicina na concentração de 100mcg/ml. Foram realizados quatro aspirados em cada lesão e inoculados aleatoriamente em três tubos contendo o meio D+S+SB, três com D+S+SB+U e dois contendo S+U. Os meios de cultura, depois de inoculados, foram incubados a 23°C +/-1°C e examinados semanalmente com microscópio de luz invertida, durante 30 dias, após os quais foram desprezados os tubos negativos.

Na técnica para demonstração de amastigotas, a biópsia foi realizada na borda infiltrada e com superfície íntegra da lesão, utilizando-se *punch* de 4mm de diâmetro, e o fragmento foi comprimido sobre duas lâminas, depois da retirada do excesso do sangue em papel de filtro. As lâminas permaneceram durante período que variou de dois a três minutos em temperatura ambiente para secar e, em seguida, foram fixadas com álcool metílico (metanol) por quatro minutos e coradas pelo Giemsa e, posteriormente, examinadas sob óleo de imersão à microscopia ótica (x100) por 15 minutos.

Na margem interna da mesma lesão foi feita escarificação com um palito de madeira, extremidade em bixel *matchstick*, previamente autoclavado. O material coletado foi espalhado sobre duas lâminas para cada paciente, submetidas à mesma seqüência já descrita para a coleta do material para as culturas. O método estatístico utilizado foi o teste do Qui-quadrado para análise em tabelas do tipo 2x2, para verificação de diferença entre grupos.

## RESULTADOS

Dos casos estudados 77% tinham de zero a quatro meses de evolução, 19%, de cinco a oito meses, e 4% acima de oito meses de evolução da doença.

As técnicas de isolamento de promastigotas nos três meios apresentaram índices de positividade e contaminação semelhantes (29 a 33% e 8 a 11%, respectivamente) (Tabela 1). As técnicas para demonstração de amastigotas entre o esfregaço realizado por biópsia realizada com *punch* e a técnica realizada com palito *matchstick* também tiveram índices de positividade semelhantes (14 e 19%, respectivamente). Comparados os resultados dos vários meios de cultura, assim como os resultados da pesquisa de amastigotas, pelo teste do Qui-quadrado, as diferenças não foram significantes.

*thetized with 2% lidocaine containing adrenaline, excluding the latter when treating the extremities. Using a syringe mounted with a 25 x 8 mm needle, containing 0.5 ml of saline solution with gentamicin (100 mcg/ml), introduced under light pressure on the edge of the integral and infiltrated lesion surface, the material was aspirated and inoculated in the culture tubes.*

*Three different compositions were used in the culture media: 1. Blood Agar Difco + with 0.5 ml of Schneider (20% fetal calf serum) with (D+S+SB) supernatant; 2. similar medium to the former increased with a 2% sterile human urine (U) concentration filtered with a bacterial millipore using a 0.45m filter (D+S+SB+U); 3. a medium containing Schneider (with fetal calf serum) supplemented with 5% U (S+U). All media were dosed with gentamicin in a 100 mcg/ml concentration. Four aspirations were performed on each lesion, which were inoculated randomly in three tubes containing the D+S+SB medium, three with D+S+SB+U and two containing S+U. Culture media, after inoculations, were incubated at 23°C +/-1°C and examined weekly under an inverted light microscope for 30 days, following which the negative tubes were disconsidered.*

*In the technique showing amastigotes, the biopsy was performed on the infiltrate edge and over the whole lesion surface, using 4-mm diameter punch. The fragment was compressed between two slides, after withdrawing excess blood with filter paper. The slides were allowed to dry over the ensuing period for two-to-three minutes at room temperature. Afterward they were fixed with methyl alcohol (methanol) for four minutes and colored by Giemsa and, later, examined by means of immersion oil under the optical microscope (x 100) for 15 minutes.*

*At the internal margin of the same lesion, scarring was made by using a wooden scrapper stick with a previously autoclavated matchstick edge. The material collected was spread over two slides per patient, submitted to the same aforementioned sequence for collecting material for these cultures. The statistical method applied was the Chi-squared test, using the 2 x 2 type table analysis for verifying group differences.*

## RESULTS

*Of the cases studied 77% had zero-to-four month progression, 19% five-to-eight months, and 4% had more than eight months of disease progression.*

*The techniques for isolating the promastigotes in three media showed positivity indices and similar contamination (29-to-33%, and 8-to-11%, respectively). (Table 1). The techniques showing the amastigotes between the smear performed by punch biopsy and the matchstick method also had similar positivity indices (14 and 19%, respectively). When compared with the Chi-squared test, the results of the various culture media and the amastigote research showed no significant difference.*

Tabela 1: Resultado do crescimento de *Leishmania* em meios de cultura  
 Table 1: Results of *Leishmania* growth in culture media

Resultados / Results	Meios de cultura / culture media					
	D + S + SB		D + S + U + SB		S + U	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Positivo / Positive	21*	33	21*	33	12*	29
Negativo / Negative	35	56	37	59	26	61
Contaminado / Contaminated	7	11	5	8	4	10
Total	63	100	63	100	42	100

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A verificação da presença do parasito na lesão suspeita de LTA é o que confirma esse diagnóstico. Com as técnicas disponíveis na prática usual, entretanto, o sucesso no achado de *Leishmania* é representado por baixos percentuais (para pesquisa no esfregaço 18% a 52%).<sup>1,7</sup> O achado do parasito torna-se ainda mais difícil nos casos em que o agente etiológico é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, bem como se a lesão for da mucosa.<sup>4</sup> Torna-se praticamente impossível achá-lo nas formas cutânea verrucosa e mucosa crônica, com pouca atividade da doença.

Hoje, há métodos de biologia molecular, como o PCR, dotados de grande sensibilidade no diagnóstico da LTA.<sup>8</sup> Essa técnica, entretanto, necessita de equipe especializada, infra-estrutura adequada, tornando pouco prática e também onerosa sua execução, estando ainda distante de entrar na prática diária. Os autores acreditam, portanto, ser de importância procurar, hoje, dentro da realidade do país, aperfeiçoar os métodos disponíveis em todos os níveis de saúde que permitam direcionar a terapêutica e melhorar o prognóstico da doença.

No HUB, onde estes casos foram estudados, os pacientes procedem predominantemente dos estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal. A maioria dos casos do referido hospital é de *L (V) braziliensis*, vindo depois *L (L) amazonensis* e, raramente, outras espécies, como *L(V) shawi*,<sup>9,10</sup> constituindo um bom modelo para testar as espécies que aqui predominam. A preponderância de *L (V) braziliensis* justifica os baixos índices de achado de *Leishmania* nos resultados, e, quanto aos índices de contaminação, foram aceitáveis no cultivo em todos os meios empregados.

Como referido, outros autores já haviam comprovado a eficácia da urina humana no crescimento de amastigotas em cultivo de células e de promastigotas mantidas em laboratório, oriundas de países orientais ou de procedência desconhecida. No trabalho aqui relatado os cultivos foram realizados com material colhido do doente e avaliados em espécies que predominam ou existem no país, como a (*L(V) braziliensis*, *L(L) amazonensis* e *L(V) shawi*), levando os autores a concluir que a urina humana pode substituir o soro fetal bovino,

## DISCUSSION AND CONCLUSION

This diagnosis confirms verification of parasite presence in the lesion suspected of having ACT. With the techniques available in practical use, however, successful findings of *Leishmania* are represented by a low percentage (18-to-52% for smear research).<sup>1,7</sup> Finding parasites became even more difficult in cases where the etiological agent is *Leishmania (Viannia) braziliensis*, as well as when the lesion would be mucosal.<sup>4</sup> It was almost impossible to find it in the chronic verrucosa and mucosal cutaneous forms, demonstrating little disease activity.

Nowadays, there are highly sensitive methods in molecular biology, like PCR, for the diagnosis of ACT. However, this technique requires specialized equipment and adequate infrastructure. Its execution is of little practical use as well as being onerous, which is why it is still a long way from daily practice. Yet today the authors believe it is important to find ways within the scope of a country's possibilities to improve the methods available at all levels of health care which promote better therapy orientation and improved disease prognosis.

At the HUB, where these cases were studied, patients came predominantly from the states of Goiás, Minas Gerais, Bahia and the Distrito Federal. Most of the reference hospital cases are *L (V) braziliensis*, followed by *L (L) amazonensis*, with other species rarely seen, such as *L(V) shawi*.<sup>9,10</sup> This constitutes a good model by which to test the species that predominate. The preponderance of *L (V) braziliensis* justifies low indices in finding *Leishmania* in the results. As for contamination indices, they were acceptable for the culture of all media employed.

As mentioned, the authors had already confirmed the effectiveness of human urine for amastigote growth in cell cultures and for promastigotes maintained in the laboratory, whose origin was either oriental countries or unknown. In the research reported in this paper the cultures were performed on material collected from the patient and evaluated in terms of species that predominate or exist in the country, such as (*L(V) braziliensis*, *L(L) amazonensis* and *L(V) shawi*). This led the authors to conclude that human urine may substitute fetal calf serum in

também no Brasil. Essa é uma alternativa vantajosa quando se analisa a relação custo/benefício. Um frasco de 500ml de soro fetal bovino custa, em média, 185 dólares, enquanto a urina humana não tem nenhum custo. □

*Brazil. This is an advantageous alternative when its cost-benefit ratio is considered. A 500-ml flask of fetal calf serum costs \$185 on average, whereas human urine has no cost whatsoever.* □

#### REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Urjel R, Recacoechea M, La Fuente C, Orellana AH. Simple method for collection of material from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 1983; 77: 882-3.
2. Cuba CC, Netto EM, Costa JLM, Barreto AC, Marsden PD. El cultivo ``in vitro`` como instrumento practico para el diagnostico y aislamiento primário de *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2 estudos en pacientes de areas endemicas. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1986; 28: 317-24.
3. Cuba CC, Netto EM, Marsden PD, Rosa AC, Llanos Cuentas EA, Costa JLM. Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 456-7.
4. Marsden PD. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Tres Braços. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 485-7.
5. Howard MK, Pharoah MM, Ashall F, Miles M. Human urine stimulates growth of leishmania in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85: 477-9.
6. Armstrong TC, Patterson JL. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical Serum-free Medium containing human urine. *J Parasitol* 1994; 80: 1030-2.
7. Navin TR, Arana FE, Merida AM, Arana BA, Castilho AL,

Silvers N. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 36-42.

8. Laskay T, Mikó TL, Negesse Y, Solbach W, Rollinghoff M, Frommel D. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 273-5.

9. Paula, CDR. Estudo comparativo entre isotionato de pentamidina, administrada em três doses, com o esquema usual de metil meglumina para o tratamento da forma cutânea de leishmaniose tegumentar americana. Tese. Brasília: Universidade de Brasília, 1999.

10. Sampaio, RNR, Marsden PD, Furtado T, Barreto AC, Cuba CC, Campbell, GMA. Avaliação clínica e laboratorial de 114 casos hospitalares de Leishmaniose cutâneo mucosa. *An Bras Dermatol* 1989; 64: 201-5.

---

#### ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: / MAILING ADDRESS:

**Profa. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio**  
**SHIS QI 25, Conj 2, casa 1, Lago Sul,**  
**Brasília DF 71660 220**  
**Tel: (61) 367-1331 Fax: (61) 367-3825.**  
**E-mail rnrsampai@hotmail.com ou**  
**rsampaio@unb.com.br**