

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ANTIMICROBIANOS BENZILPENICILINA ESTREPTOMICINA E FLUCITOSINA, NO CRESCIMENTO “IN VITRO” DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

RESUMO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. No diagnóstico laboratorial da Leishmaniose o isolamento em cultura é considerado padrão-ouro, entretanto tem como inconveniente a possibilidade de contaminação secundária por bactérias e fungos que inviabilizam o exame. A fim de minimizar a contaminação são utilizados antibióticos como benzilpenicilina e estreptomicina e antifúngicos como flucitosina. Concentrações ideais destes antimicrobianos, para que o isolamento do protozoário não seja prejudicado, necessitam ser estabelecidas. Neste trabalho estudou-se o efeito de diferentes concentrações dos antibióticos (benzilpenicilina e estreptomicina) e do antifúngico (flucitosina) sobre o crescimento de *Leishmania braziliensis* “in vitro”. Os resultados demonstraram que as concentrações de 1000 e 500 U/mL de benzilpenicilina e, 1000 e 500 µg/mL de estreptomicina e flucitosina, exerceram inibição significativa do crescimento do protozoário, indicando que essas substâncias devem ser utilizadas com certa cautela na rotina do diagnóstico das leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmaniose. Diagnóstico. Meios de Cultura.

SUMMARY

The leishmaniasis are a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. In the laboratory diagnosis of *leishmaniasis* isolation in culture is considered the gold standard, but has the drawback the possibility of secondary contamination by bacteria and fungi that prevent the examination. To minimize contamination are used as antibiotics benzylpenicillin and streptomycin and flucytosine as antifungal agents, however it is necessary to seek optimal concentrations for the isolation of the parasite is not jeopardized. We studied the effect of different concentrations of antibiotics (Penicillin and streptomycin) and antifungal (flucytosine) on the growth of *Leishmania braziliensis* in vitro. The results showed that concentrations of 1000 and 500 µg/mL flucytosine and streptomycin and 1000 and 500 U/mL penicillin showed significant inhibition of parasite growth, indicating that these substances should be used with some caution in the routine diagnosis of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis. Diagnosis. Medium.

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses constituem um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (1). As diferentes formas da doença (tegumentar e

visceral) estão relacionadas à espécie do parasita e diferem na distribuição geográfica, hospedeiros, vetores envolvidos, assim como nas taxas de incidência e de

Cintia Xavier de Mello¹,
Maria de Fátima Madeira¹,
Armi Nóbrega² e
Shirley Abrantes^{2*}

¹Instituto de Pesquisa Clínica
Evandro Chagas - IPEC /
FIOCRUZ

²Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde - INCQS /
FIOCRUZ

*Correspondência:
shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br

mortalidade. São consideradas como importante problema de saúde pública em vários países, sendo incluídas entre as seis endemias de maior relevância mundial (2). Estima-se que em todo o mundo 350 milhões de pessoas estejam expostas à doença e que 12 milhões adoecem. A incidência anual é de 1,5 milhões de novos casos da doença tegumentar e de 500 mil da visceral (2). Ambas as formas da doença apresentam ampla diversidade clínica, fato que deve ser considerado para o diagnóstico, o qual deve ser pautado em evidências clínicas, epidemiológicas e laboratoriais.

Diferentes ferramentas podem ser empregadas para o diagnóstico laboratorial, as quais podem variar de acordo com a forma da doença (tegumentar ou visceral).

Os métodos parasitológicos são importantes nesse contexto, no entanto, a demonstração direta do parasita nem sempre é possível, já o isolamento em meio de cultura, devido à elevada sensibilidade e especificidade é considerado padrão ouro no diagnóstico desse grupo de doenças (3).

Os meios de cultura foram desenvolvidos baseados principalmente em dois propósitos básicos: necessidade da confirmação definitiva do diagnóstico clínico, através do isolamento do agente etiológico e preservação contínua da espécie isolada para utilização em outros estudos (4). Para o isolamento e cultivo contínuo de protozoários tripanosomatídeos, entre eles os do gênero *Leishmania*, o meio elaborado por Novy & MacNeal (5) popularmente conhecido como 3N ou NNN, foi adaptado, acrescentando-se à fase sólida, meios de cultura líquidos ricos em aminoácidos, os quais são fundamentais para suprir as necessidades nutricionais desse parasita. Atualmente utiliza-se o meio de cultura Schneider's (6), suplementado com soro fetal bovino inativado como fase líquida do meio NNN.

O sucesso para isolamento parasitário em meio de cultura está condicionado a inúmeros fatores, entre eles, a possibilidade de contaminações secundária por bactérias e fungos (7), fato que pode inviabilizar o diagnóstico (8), principalmente em material obtido de lesões (cutâneas ou mucosas), onde a microbiota natural do paciente está presente (7).

É desejável que o meio de cultura permita o isolamento e crescimento do protozoário, mas também iniba ou retarde a multiplicação de contaminantes, principalmente bactérias. Para isso, são incorporados ao meio de cultura antibióticos como benzilpenicilina e estreptomicina (7), entretanto, concentração destes antibióticos não está padronizada na literatura (9).

De acordo com Palomino, Guerra e Lumbresas, 1983 (7), o uso de antifúngicos deve ser evitado por-

que se supõem que causem dano a *Leishmania sp.*, que são organismos eucarióticos, porém o índice de contaminação secundária por fungos em meio de cultura é alto, sendo este um fator que pode impossibilitar o diagnóstico da doença. Por essa razão, devem-se buscar concentrações que sejam ideais, de modo que tais substâncias não provoquem interferências no isolamento e no crescimento do protozoário (7). Por outro lado, a estabilidade dessas substâncias, quando incorporadas ao meio de cultura deve ser conhecida. Nesse contexto, o nosso grupo tem trabalhado, visando estabelecer condições relacionadas ao preparo e armazenamento de antimicrobianos e antifúngicos (10). Neste estudo, avaliamos o efeito de diferentes concentrações dos antimicrobianos, benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina, no crescimento "in vitro" de *Leishmania braziliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Reagentes utilizados nos ensaios

- Meio de cultura Schneider® (Sigma S9895). Este meio foi preparado segundo recomendações do fabricante, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e conservado a temperatura de 4°C.
- Benzilpenicilina (Calbiochem) – Utilizou-se as concentrações de 1000 U/mL, 500 U/mL, 200 U/mL e 100 U/mL, preparadas em solução fisiológica (NaCl 0,85%) e esterilizadas por filtração, utilizando membrana de 0,22 micrômetros, em capela de fluxo laminar. Essa substância é destinada somente para uso *in vitro*.
- Sulfato de Estreptomicina (FURP - Fundação para o remédio popular) - Utilizou-se as concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL, também preparadas em solução fisiológica. Essa substância é destinada para uso *in vivo*.
- Flucitosina (Sigma, n° cat: F7129) – Utilizaram-se as concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL preparadas e esterilizadas como descrito no item b. Essa substância é destinada somente para uso *in vitro*.

Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

1.2. Amostra de referência de *Leishmania braziliensis*

Utilizou-se a amostra de referência *Leishmania (Vianina) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

1.3. Realização dos ensaios:

Para avaliar o efeito de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento de *L. braziliensis*, foram realizadas curvas de crescimento, onde foram incorporados ao meio de cultura diferentes concentrações dos reagentes.

A curva de crescimento foi feita em tubos tipo Falcon de 15 mL empregando o meio de cultura Schneider suplementado com 10% de SFB. Em cada tubo, foi semeado 10^6 parasitas em volume de 1 mL. As culturas foram submetidas à temperatura de 26 - 28°C e contagens do número de parasitas foram feitas diariamente, durante sete dias, utilizando hemocitômetro de Neubauer. Os ensaios foram feitos em triplicatas e independentes, sendo os reagentes incorporados no dia 1 da curva.

Em todos os ensaios, utilizaram-se dois controles: meio de cultura sem adição de qualquer reagente e meio de cultura contendo a associação de benzilpenicilina e estreptomicina nas concentrações respectivas de 200 U/mL e 200 µg/mL.

Para a análise estatística tomou-se como referência o valor do número de parasitos (média de três contagens) obtidas no quarto dia da curva, para comparação entre os controles e os testes. Foi realizado o teste *t* de Student, paramétrico unicaudal em nível de significância de 2,5% (0,025).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de *L. braziliensis*, expostas as diferentes concentrações dos antimicrobianos e do antifúngico são mostradas nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

Nota-se que o padrão da curva controle apresentou-se de acordo com o relatado na literatura, identificando um pico de crescimento mais elevado no quarto dia, com pequenas variações, observada entre os ensaios, fato que pode estar provavelmente relacionado ao lote do meio de cultura, que foi preparado em diferentes momentos. Com relação à adição dos antimicrobianos observou-se o mesmo padrão da curva controle, apresentando inibição do crescimento parasitário, proporcional à concentração do antimicrobiano.

As análises estatísticas mostraram que benzilpenicilina nas concentrações de 1000 e 500 U/mL e estreptomicina e flucitosina, nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL, promoveram inibição do crescimento parasitário significativo (Figuras 1, 2 e 3).

Em contrapartida, as concentrações de 200 e 100 U/mL de benzilpenicilina e 200 e 100 µg/mL de estreptomicina e de flucitosina não apresentaram inibição do crescimento parasitário estatisticamente significativa, indicando que essas concentrações podem ser utilizadas com certa segurança no isolamento em cultura de *Leishmania* sp.

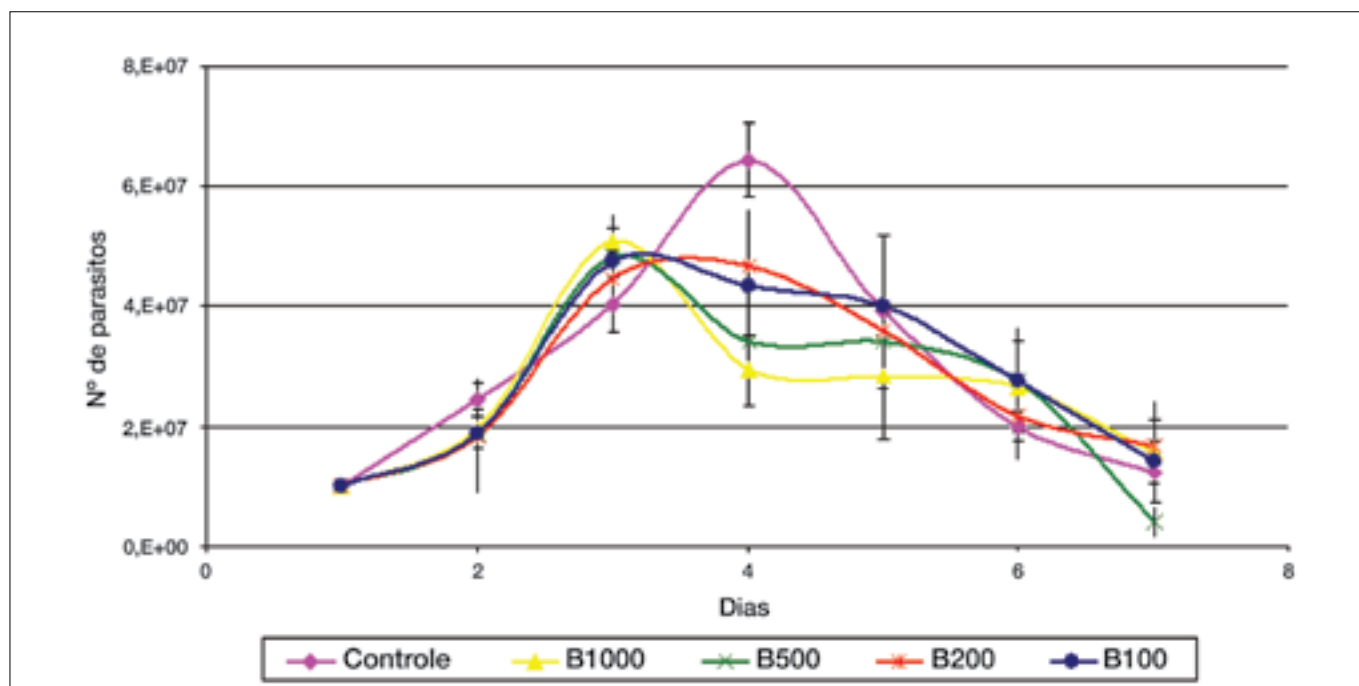


Figura 1. Curva de crescimento de *L. braziliensis*, em meio Schneider contendo 10% de SFB, exposta a diferentes concentrações de benzilpenicilina

CROMATOGRAFIA DIONEX

Faça **bem** mais gastando **muito** menos!



<http://dionex-uhplc.com>

Desempenho de UHPLC a custos de HPLC padrão

Toda a linha de Cromatografia Líquida da DIONEX é compatível com separações de UHPLC, para todos os usuários, laboratórios e analitos:

- Pressão de 620 bar até 10 ml/min e taxa de aquisição de 100 Hz no sistema básico
- Pressão de 1000 bar até 8 ml/min e taxa de aquisição de 200 Hz no sistema RSLC
- Aplicações DUAL X2 para toda a linha: paralelo, method scouting, SPE on line, 2D-LC, etc.
- Exclusivo sistema de detecção por aerosol carregado CORONA CAD®.

**Uma vez a cada trimestre,
adicione água...
e amostras a qualquer momento!**

Mais uma vez a DIONEX inova e lança o primeiro IC Capilar do mundo. Com a tecnologia IC X IC consiga limites de detecção ultra-baixos similar a de um MS.

Com o Fast IC corra suas análises até 4 vezes mais rápido.

É tão fácil de usar, você escolhe o seu método, encaixa o IC Cube, adiciona amostras e começa a rodar!



DIONEX

Passion. Power. Productivity.

www.dionex.com.br - (11) 3731-5140

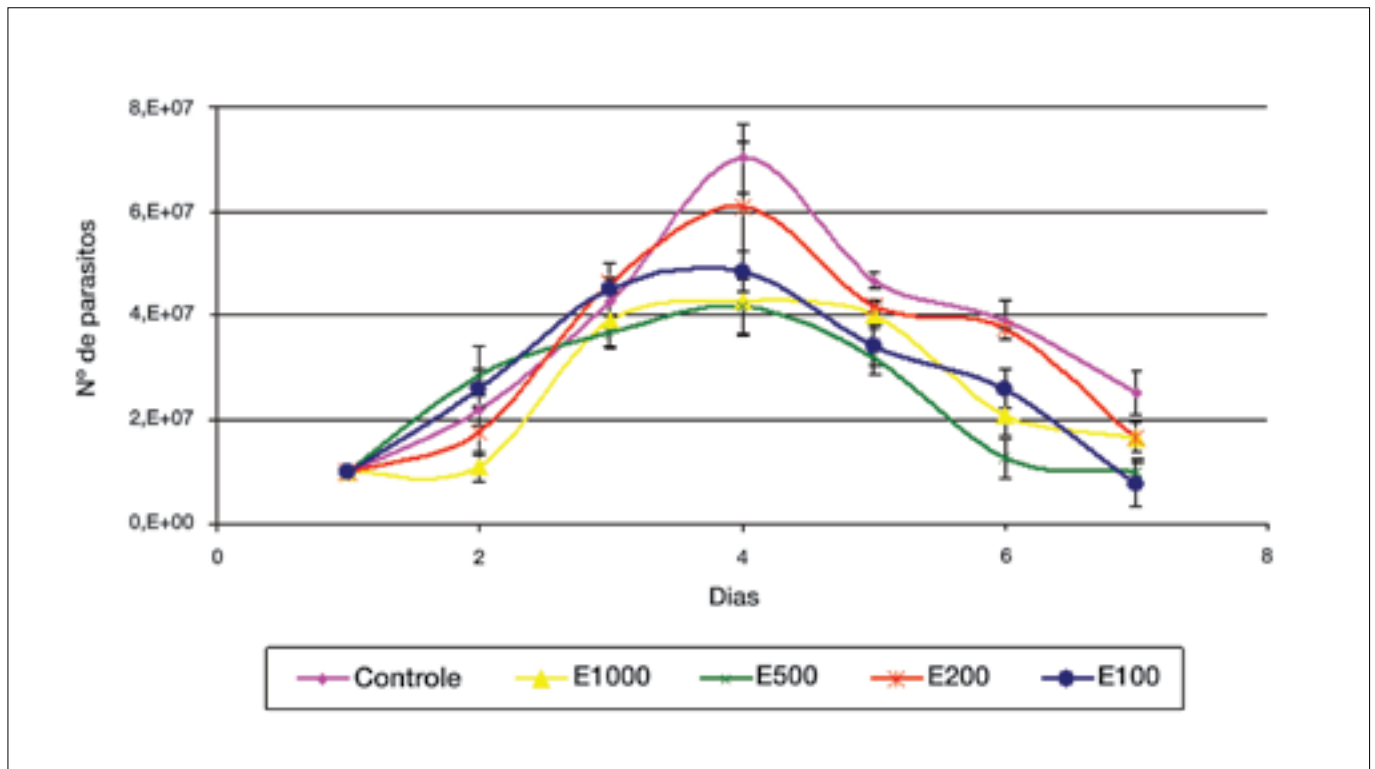


Figura 2. Curva de crescimento do parasito *L. braziliensis* em diferentes concentrações de estreptomicina

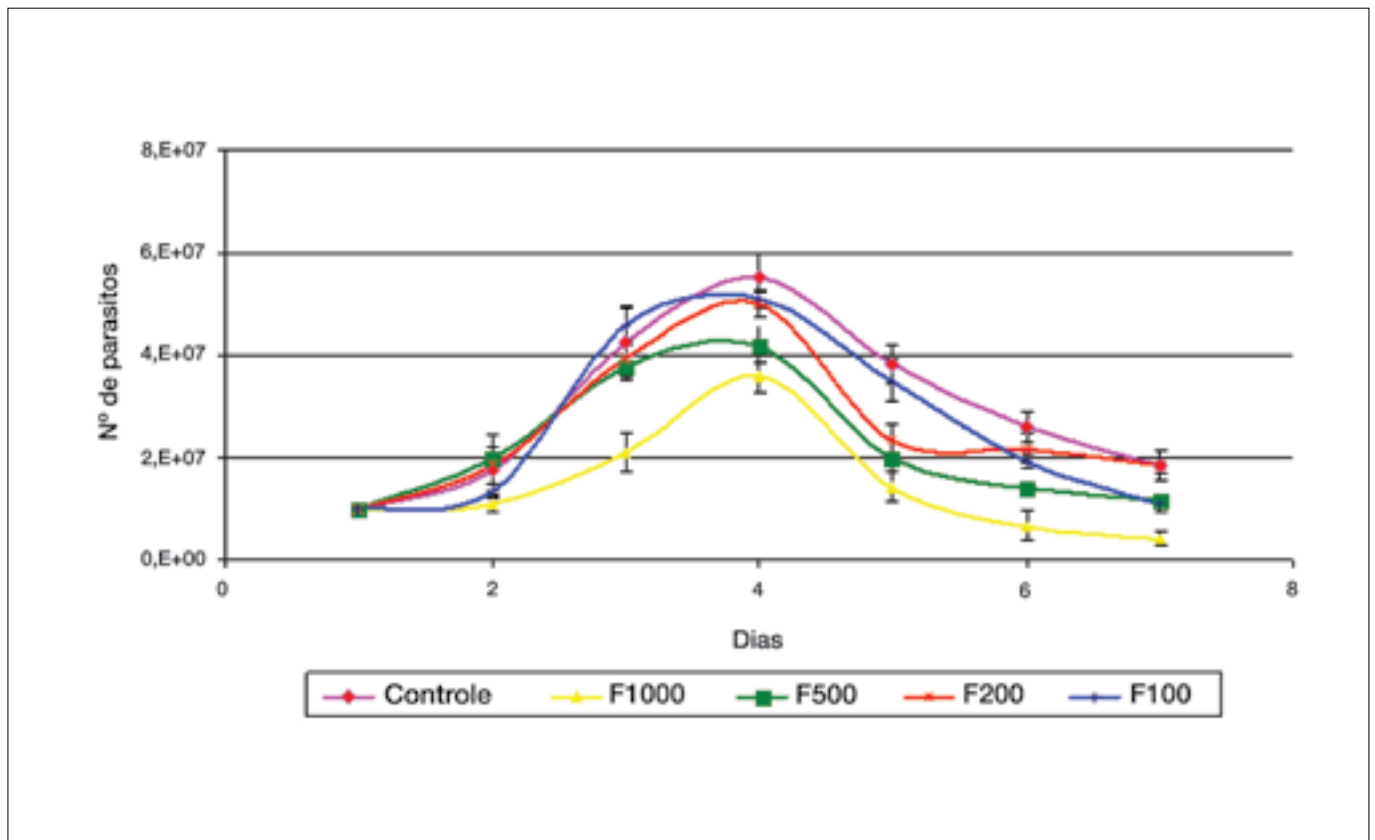


Figura 3. Curva de crescimento do parasito *L. braziliensis* em diferentes concentrações de flucitossina

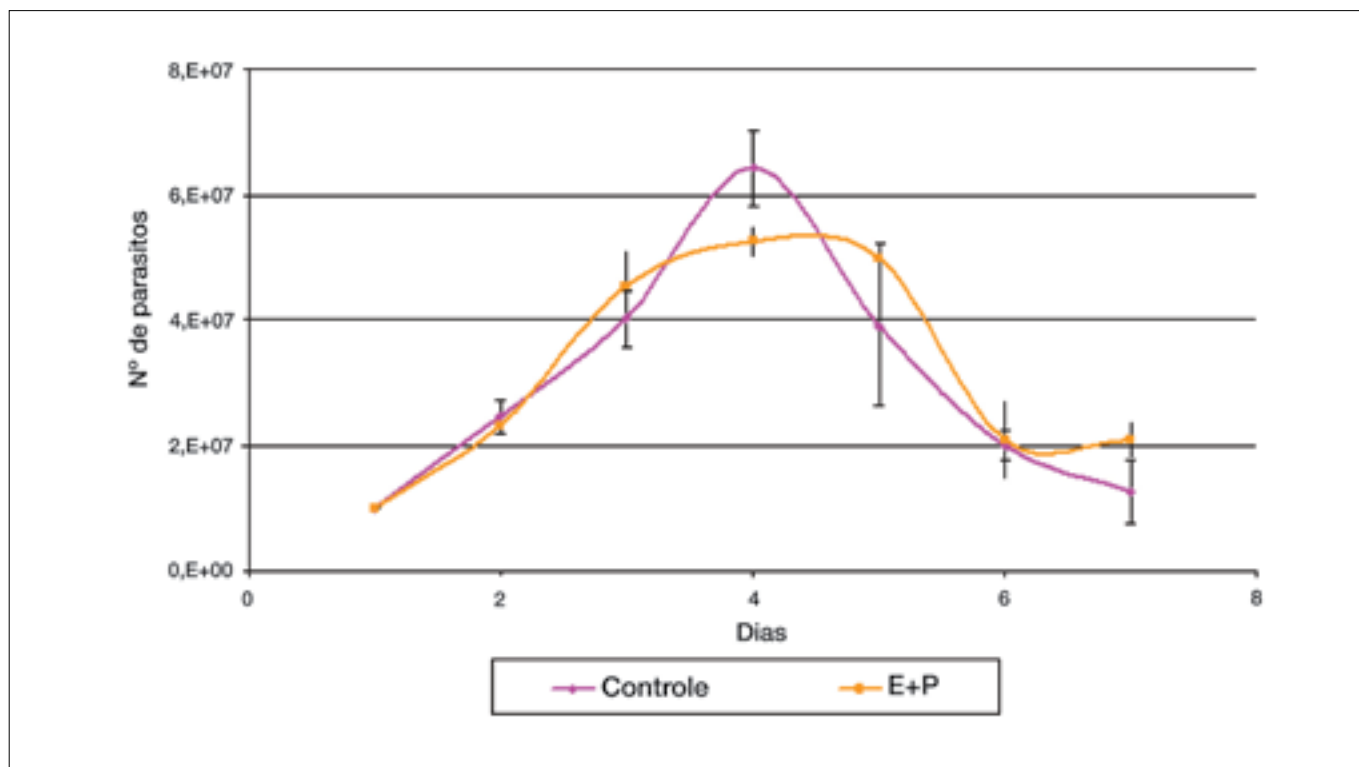


Figura 4. Curva de crescimento do parasito *L. braziliensis* em associação de benzilpenicilina e estreptomicina

A associação de benzilpenicilina (200 U/mL) e estreptomicina (200 µg/mL) mostrou uma inibição do crescimento do parasito significante estatisticamente (Figura 4).

A inibição do crescimento promovida pelas concentrações de 500 e 1000 U/mL de benzilpenicilina, e nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL de estreptomicina e flucitosina indica que essas concentrações não são seguras para o uso no diagnóstico das leishmanioses, pois além de evitar a contaminação da cultura por bactérias e fungos promoverá também a inibição do crescimento do parasito que se deseja isolar. Esses resultados concordam com artigos que relatam a ação leishmanicida de alguns antibióticos, como a azitromicina, que já foi utilizada no tratamento da leishmaniose tegumentar (11).

Por outro lado, esses resultados discordam dos encontrados por Kimber *et al.*, 1981 (12), que em concentrações de 625 µg/mL de flucitosina não encontrou diferença significativa no crescimento de promastigotas de *L. infantum*, *L. tropica* e *L. mexicana*, porém esse autor não cita nenhum tratamento estatístico dado aos seus resultados para realizar tal afirmação.

Marzochi *et al.*, 1992 (13), utilizou também uma alta concentração de flucitosina (500 µg) em um kit de punção aspirativa para ser utilizado em coletas de campo, obtendo bom rendimento no isolamento.

Com relação à associação de benzilpenicilina e estreptomicina é interessante notar o sinergismo existente entre esses dois antibióticos, pois quando utilizados separadamente em concentrações de 200 U/mL e 200 µg/mL, não geram inibição estatisticamente significativa no crescimento do parasito, porém quando utilizados em combinação promovem essa inibição, concordando com a afirmação de sinergismo entre as substâncias feita por Katzung, 2005 (14). Essa combinação de antimicrobianos tem sido utilizada há muitos anos no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish/IPEC/FIOCRUZ) para o isolamento a partir de fragmentos de biopsias de lesões tegumentares e manutenção de diferentes espécies de *Leishmania*. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que tais antibióticos em associação nas concentrações de 200 U/mL e 200 µg/mL, podem inibir o crescimento de *L. braziliensis in vitro*, porém uma certa inibição do crescimento pode ser admitida, para que possíveis contaminações das amostras possam também ser evitadas. Devem ser realizados maiores estudos para determinação de concentrações seguras para essa combinação de antibióticos.

A cepa escolhida para realização dos experimentos foi *L. braziliensis*, devido a sua ampla distribuição no estado do Rio de Janeiro representando a maioria dos isolados

do VigiLeish, porém os resultados aqui obtidos podem não se repetir com outras espécies de *Leishmania*. Seria interessante realizar estudos posteriores contemplando outras espécies para análise de seu comportamento frente a esses antimicrobianos.

A cepa utilizada já está bem adaptada ao cultivo *in vitro*, e é sabido que cepas já adaptadas ao meio de cultura apresentam um crescimento aproximadamente até três vezes maior que cepas não adaptadas (15). Dessa forma, pode-se esperar que os resultados obtidos neste estudo, possam não ser reproduzidos com amostras recém isoladas.

Os resultados da curva de crescimento em diferentes concentrações de flucitosina se mostraram muito semelhantes aos dos antibióticos benzilpeni-

cilina e estreptomicina, é conhecido que existe uma maior preocupação com relação ao uso de flucitosina quando comparado ao de qualquer antibiótico, esses resultados mostram que deve se ter muita precaução no uso de qualquer substância microbicida em culturas de *Leishmania*.

CONCLUSÃO

Observou-se que a adição de benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina em diferentes concentrações inibiram o crescimento de *L. braziliensis in vitro*, sendo mais evidente nas concentrações de 1000 e 500 U/mL de Benzilpenicilina, 500 e 1000 µg/mL de estreptomicina e 1000 e 500 µg/mL de flucitosina.

REFERÊNCIAS

- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasília, 182 p. 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Report of the scientific working group on leishmaniasis. Geneva, WHO/TDR/SWG, 137p. 2004.
- IHALAMULLA, R. L.; RAJAPAKSA, U. S.; KARUNAWEEERA, N. D. Microculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions – Sri lankan experience. *Annals of Tropical Medicine e Parasitology*. 99, 6:571, 2005.
- VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin infect dis*. 16:97, 2003.
- NOVY, F. G.; MACNEAL, W. J. On the trypanosomes of birds. *J infect dis*, 2:259, 1905.
- HENDRICKS, L. D.; WRIGHT, N. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis by in Vitro Cultivation of Saline Aspirates in Schneider's Drosophila Medium. *Am J Trop Med Hyg*, 28, 6:962, 1979.
- PALOMINO, J. C.; GUERRA, H.; LUMBRERAS, H. A. Selective liquid Medium for Primary Isolation of South American Leishmanias. *Tropenmed Parasit*. 34:229, 1983.
- OKOT-KOTOBER, B. M. A rapid chromatographic method for elimination of fungal contamination in *in vitro* cultures of leishmania spp. *Parasitology*. 91:1,1985.
- MÄSER, P.; GREYER-BÜHLER, Y.; KAMINSKY, R.; BRUN, R. Parasitol Res. An anti-contamination cocktail for the in vitro isolation and cultivation of parasitic protozoa. 88:172-174, 2002.
- MELLO, C.; MAZZEI, A.; MADEIRA, M. F.; OLIVEIRA, A. P.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos antibióticos benzilpenicilina e estreptomicina e do antifúngico flucitosina em meio de cultura Schneider®. *Revista Analytica*, 38:78, 2009.
- SILVA-VERGARA, M. L.; SILVA, L. A.; MANEIRA, F. R. Z.; SILVA, A. G.; PRATA, A. Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 46,3:175, 2004.
- KIMBER, C. D.; EVANS, D. A.; ROBINSON, B. L.; PETERS, W. Control of yeast contamination with 5-fluorocytosine in the *in vitro* cultivation of *Leishmania* spp. *Ann trop med Parasitol*. 75,4:453, 1981.
- MARZOCHI, M. C. A.; SILVA, P. C. T.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO V. F.; COUTINHO, V.; BRITO, D. B. Sistema de punção aspirativa a vácuo para cultivo, isolamento e transporte de *Leishmania* em condições de campo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 25:70, 1992.
- KATZUNG, G. B.; Farmacologia básica e clínica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 991p.
- CELESTE, B. J.; GUMARÃES, C. S. Growth curves of *Leishmania braziliensis brasiliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to Schneider's drosophila medium as assessed by anti-leishmania human sera. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 30, 2:63, 1988.