

Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de leishmaniasis

Ingrid Alexandra Montealegre Santa¹

1. Grupo de Parasitología-Red Nacional de Laboratorios
Instituto Nacional de Salud de Colombia

Correspondencia: imontelegre@ins.gov.co

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades muy distintas entre sí, producida por distintas especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania*, transmitida por insectos dípteros de los géneros *Phlebotomus*, vectores en el Viejo Mundo y *Lutzomyia*, vectores en el Nuevo Mundo. En algunas regiones del país se le conoce como mantablanca, palomilla, pringador o mosco-marrano (1,2).

La fauna de *Phlebotominae*, vectores de leishmaniasis, tanto en su diversidad como en la abundancia relativa entre especies, es característica y diferente para cada región ecológica (3), que pueden infectar al humano que vive o tiene actividades laborales en áreas tropicales y subtropicales del planeta; las transformaciones ecológicas principalmente en los países en vía de desarrollo, suelen establecer la aparición de nuevos focos de la enfermedad (4), situación que hoy en día permite que la leishmaniasis se presenten cada vez más expandida y cobre mayor importancia en salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere en total 350 millones de personas en riesgo de contraer leishmaniasis, enfermedad endémica en 88 países, de ellos 22 en América.

Actualmente, se reporta una incidencia anual de 1 a 1,5 millones de casos de leishmaniasis tegumentaria (LT) y 500.000 de leishmaniasis visceral (LV), esta última lleva a la muerte en una mayor proporción, estimándose que 75 mil personas con esta condición mueren al año. La LV es una patología ampliamente distribuida en América, aunque muestra rara o baja frecuencia en países andinos (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela), en Brasil constituye un problema relevante en salud pública en alguna de sus regiones (5). En Colombia, la leishmaniasis se presenta en forma endémica y se encuentra en el 91% de todo el territorio ubicado bajo los 1750msnm; además, produce las tres formas clínicas principales de la enfermedad, es decir, la mucosa, visceral y cutánea (6).

Después del periodo de incubación, las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea (LC) comienzan con una lesión nodular en el sitio de inoculación, con formación de una costra que puede desprenderse, exponiendo una úlcera que se cura gradualmente y deja una cicatriz ligeramente hundida con pigmento alterado. Algunas lesiones pueden perdurar como nódulos o placas. Son usuales los nódulos secundarios en el borde de la lesión. Otros signos o síntomas son: lesiones múltiples primarias o satélites, adenopatías regionales, dolor, prurito e infecciones bacterianas secundarias (7).

La leishmaniasis mucocutánea es una grave complicación evitable de la leishmaniasis cutánea, este caso muestra fallas en el diagnóstico y tratamiento oportunos y, en general, en el programa de control de esta enfermedad (8), el compromiso mucoso generalmente ocurre varios años después del compromiso cutáneo, ocasionalmente puede presentarse mientras la lesión cutánea primaria aún está activa y puede ocurrir por extensión directa desde la piel a la mucosa vecina, cuando la inoculación ocurre en un sitio cercano a la punta nasal o al labio superior, y se manifiesta desde simple edema de mucosa nasal, obstrucción, secreción purulenta hasta perforación del cartílago nasal, la faringe, el paladar, la laringe y el labio superior, creando deformidad física (9).

La LV afecta generalmente a la población infantil y a los reservorios de esta enfermedad que son los perros domésticos, clínicamente se caracteriza por generar linfadenomegalia, pérdida de peso marcada, decaimiento progresivo, hepato-esplenomegalia, epistaxis, artropatías, ascitis, diarrea; algunas veces presentan nódulos, alopecia, dermatitis exfoliativa seca; así mismo, las alteraciones oftalmológicas tipo uveítis, blefaroconjuntivitis y queratoconjuntivitis son frecuentes y progresa el depósito de inmunocomplejos a nivel renal conllevando a glomerulonefropatías con pérdida de proteínas, polidipsia, poliuria y vómitos (10). En Colombia se presenta en algunos departamentos como Tolima, Sucre, Córdoba, Bolívar y los valles del río Magdalena. El índice registrado en el año 2003 fue de 125 casos, según el Instituto Nacional de Salud.

Las lesiones son causadas por un protozoo del género *Leishmania*, con más de 20 especies identificadas a nivel mundial; por lo menos la mitad de ellas han sido encontradas en América. Las formas del parásito están relacionadas con el ciclo de vida y son dos: promastigotes extracelulares de forma flagelar, los cuales se encuentran en el canal alimentario del insecto vector del género *Lutzomyia* y crecen en medios de cultivo; la forma amastigota (aflagelar) intracelular obligados presentes dentro de los macrófagos de los tejidos de hospederos vertebrados (en hombres y en animales reservorios) (11). Los mecanismos por los cuales los amastigotes sobreviven en este ambiente aparentemente hostil, han sido pobremente estudiados, debido a la dificultad de realizar análisis bioquímicos directamente sobre el parásito localizado dentro de la célula huésped (12).

La reproducción se hace por división binaria. Los promastigotes infectantes migran a la parte anterior del insecto, hasta que son inoculados en un nuevo huésped, al comienzo de la picadura. El tiempo que toma el vector para ser infectante es de aproximadamente 10 días. En la naturaleza, la infección de los vectores es baja, por lo cual se requiere que pique repetidas veces para una transmisión adecuada. Al penetrar los promastigotes por la piel, invaden las células histiocitarias y en su interior se transforman en amastigotes. *L. donovani* y *L. chagasi* se disemina a las vísceras, lo cual no ocurre con las otras especies, que sólo se localizan en la piel o mucosas.

El diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis se basa, generalmente, en la aplicación conjunta de métodos de diagnóstico directos e indirectos. El directo requiere la visualización directa del parásito en improntas o frotis del sitio de la lesión o biopsias, las cuales se tiñen con Giemsa o tinción de Romanowsky. Otras posibilidades de diagnóstico, consisten en el cultivo del protozoo o el uso de técnicas moleculares como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar e identificar el ADN del parásito.

Entre los métodos indirectos, se encuentran los serológicos tradicionales como inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA. La prueba de Montenegro o Leishmanina es una prueba de hipersensibilidad tardía y es la más usada como ayuda diagnóstica y consiste en la inoculación de extractos parasitarios en

la piel. Si el paciente alguna vez ha estado en contacto con la *Leishmania*, se genera una reacción de hipersensibilidad de tipo celular, presentándose entre las 48 a 72 horas de su aplicación, caracterizada por el rubor y tumefacción del área inoculada igual o mayor a 5mm (13). El presente artículo pretende resaltar la importancia y la dinámica de los medios de cultivos utilizados en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, para el aislamiento y el mantenimiento de cepas de *Leishmania*.

En el laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, a diferencia de otros autores que aseguran que los cultivos son de poco valor práctico por su contaminación frecuente y porque los parásitos que se aíslan *in vitro* también se encuentran en frotis directos (14), encontramos que el cultivo de las leishmanias es una técnica auxiliar muy valiosa para el diagnóstico directo, ya que permite el aislamiento del parásito y facilita la determinación de la especie de *Leishmania* que ha infectado al huésped. La forma flagelada o promastigota es fácil de estudiar en material de cultivo de laboratorio, son organismos alargados de 15 a 25 μm por 1,5 a 3,5 μm de ancho, con una extremidad posterior afilada. El citoplasma es abundante granular, con un núcleo redondeado u ovoide y un kinetoplasto ovoide o baciliforme, situado entre el núcleo y la extremidad anterior.

El manejo y mantenimiento de los cultivos de *Leishmania* no cumplen un formato estrictamente debido a que cada especie tiene un comportamiento diferente, por lo que hay que procurar que en el mantenimiento *in vitro* de las cepas se le proporcione los elementos nutricionales lo más cercanas a su hábitat o microambiente natural. Por ello no existe un medio universal que permita el crecimiento de las distintas especies de *Leishmania*, ya que éstas presentan diferentes requerimientos nutricionales. Los parásitos de *Leishmania* están constituidos esencialmente por proteínas, lípidos e hidratos de carbono, estos últimos en mayor proporción como el glucógeno que se encuentra presente en gran cantidad en la mayoría de especies de *Leishmania*.

A pesar de ello, los medios universalmente aceptados y más frecuentemente utilizados son los medios bifásicos de agar sangre (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN modificado) y los medios monofásicos o líquidos (Schneider, RPMI, etc.), habitualmente enriquecidos con glutamina o/y suero fetal bovino desactivado (10-30%). Estos medios son de difícil aplicación y uso en las áreas endémicas de los países pobres, ya que el costo y la necesidad de importación dificultan su aprovechamiento. Un hecho esencial, cuando se utilizan medios enriquecidos con suero bovino fetal, es que debe efectuarse un ensayo previo del lote para comprobar si permite el crecimiento y multiplicación de las leishmanias, ya que se ha comprobado que algunos lotes presentan una notable citotoxicidad y en algunos casos por sus componentes nutricionales enriquecidos facilitan la contaminación bacteriana, por lo que hay que tener más cuidado y adoptar medidas preventivas como el uso de antimicrobianos y antimicóticos como la gentamicina y la 5-fluorocitosina respectivamente.

Se ha observado que la contaminación de los cultivos primarios, es decir lo obtenidos a partir de la toma de muestras de lesiones, es un problema frecuente para el crecimiento del parásito, debido a la sobre infección bacteriana de la lesión y a la flora normal de la piel; sin embargo, algunos trabajos como el de Navin y colaboradores demuestran que la sensibilidad del cultivo aumenta cuando éste es realizado utilizando una aspiración con aguja del borde de la lesión, este procedimiento parece disminuir notablemente la contaminación secundaria de los cultivos (13). Sea cual sea el medio de cultivo a elegir, se le deben añadir antibióticos para reducir las posibles contaminaciones.

La elección de los métodos de aislamiento y de cultivo dependerá de las circunstancias inmediatas y de la capacidad técnica y de la experiencia del personal de laboratorio. El aislamiento *in vitro* presenta ciertas ventajas respecto a los métodos *in vivo*: los cultivos son positivos más rápidamente, de 5 a 30 días en comparación con los meses que tardan las lesiones en aparecer en un animal y los materiales son menos costosos. Sin embargo, para el aislamiento *in vitro*, las técnicas utilizadas deben llevarse a cabo en condiciones estériles estrictas; por tanto, no es siempre realizable en condiciones de campo. Por desgracia, no existe todavía un medio de cultivo “universal” en que crezcan con facilidad todas las leishmanias y es casi imposible predecir qué medio será el más apropiado para el crecimiento de un aislamiento particular de *Leishmania*.

Cada laboratorio tiene que encontrar el medio más adecuado entre los medios bifásicos de agar sangre y los medios de cultivo de tejidos suplementados con suero fetal bovino (15). Cuando se intenta el aislamiento primario de organismos desconocidos, se debe utilizar un medio con agar sangre de preferencia el medio Novy, McNeal y Nicolle (NNN); de acuerdo a la experiencia en el laboratorio, lo ideal es preparar estos medios con sangre desfibrinada de conejo o en su defecto sangre humana con la cual se han obtenido resultados favorables en los aislamientos primarios y en el mantenimiento de cepas de referencia o, en su defecto, medio sólido de infusión de cerebro y corazón (BHI) o medio de Tobie modificado por Evans (EMTM). Los organismos de pacientes con LV y LMC pueden ser muy difíciles de cultivar. A veces, incluso cuando el aislamiento inicial tiene éxito, los parásitos pueden morir cuando se subcultivan. Esto parece especialmente frecuente cuando el aislamiento inicial se hace en medio rico. A menudo esto se puede superar si los subcultivos se realizan en medios nutritivos menos ricos, como el NNN, o en los medios semisólidos, como el “Evans mojado” o el agar sangre semisólido de Locke.

Dentro de las ventajas que se han observado en el laboratorio y en otros de la utilización de medios bifásicos de agar sangre para el diagnóstico primario se mencionan las siguientes: son particularmente valiosos para el aislamiento primario y el mantenimiento, por largo tiempo, de los «stocks» de *Leishmania*, permiten la morfogénesis celular de amastigotes en promastigotes, en la gran mayoría de los aislados de *L. braziliensis*, y de otras especies del sub-género *Viannia*, así como del sub-género *Leishmania*, son apropiados para los estudios de curvas de crecimiento, lográndose densidades de 10⁷-10⁸ promastigotes por mL de cultivo «in vitro».

El medio permite también el establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento, en aproximadamente 6-7 días, son de fácil preparación y de bajo costo. Sin embargo, existen también algunos inconvenientes entre los cuales podríamos citar: la dificultad de poder estandarizarse, por ser químicamente complejos y no definidos, no son apropiados para el crecimiento en masa de los flagelados por la presencia del agar, por lo que es necesario utilizar mejor los medios líquidos para la preparación de antígenos convencionales y células para estudios bioquímicos. El uso de medios líquidos, si bien adolece del inconveniente de su alto costo, presenta la ventaja de facilitar la observación del parásito directamente en el microscopio invertido. En cambio, cuando se efectúa el cultivo en medio NNN la observación se dificulta y por ello se le debe agregar unas gotas de medio Schneider, también para facilitar la observación se realiza entre porta y cubreobjetos, tras la toma aséptica de una pequeña porción de la fase líquida que es donde crecen los promastigotes (16).

La temperatura de incubación es otro de los factores importantes en regular el crecimiento y desarrollo del parásito. Los efectos de la temperatura sobre el metabolismo, nutrición y morfología, indican que estos organismos pueden tener capacidades metabólicas a temperaturas elevadas y llegar a

ser dependientes del calor, sin embargo la reproducción de las leishmanias se produce a temperaturas de incubación que varían entre 16°C a 32°C (17), pero se sugiere que la temperatura de incubación ideal para *Leishmania* es de 20°C a 25°C, es por ello que las lesiones tienden a desarrollarse en las partes más frías del cuerpo del hospedero.

El máximo crecimiento y el periodo de viabilidad varían con los distintos medios y las distintas especies o cepas del parásito. Cuando se efectúa el cultivo en el medio NNN modificado hay que realizar resiembras cada siete días, practicando al menos cuatro resiembras sucesivas antes de dar los resultados como negativos. En el caso de ser efectuado la siembra en un medio líquido, se debe proceder con una periodicidad inferior (cada 3-5 días, dependiendo de la cepa) y debe mantenerse el cultivo durante un mínimo de un mes. Sin embargo, nuestra experiencia, junto con la de otros laboratorios (18), nos ha demostrado que es conveniente mantener los cultivos por un periodo de tiempo más largo, ya que algunas cepas se positivizan muy tarde, al cabo de tres meses o más.

El crecimiento más o menos rápido de un cultivo varía también en función del inóculo. Esto es especialmente frecuente cuando se trata de muestras de médula ósea que contienen gran cantidad de sangre que, a su vez, provoca una inhibición del crecimiento del cultivo. Por eso se recomienda, en estos casos, la dilución de la muestra en suero fisiológico, adicionado de 100U/mL de gentamicina, previa a su siembra. La sensibilidad de los cultivos está directamente relacionada con la correcta selección que se haga del medio más apropiado. Asimismo, la habilidad del investigador para escoger el área de la lesión que sea la de mayor actividad parasitaria, y de conocer la dinámica de cada especie de *Leishmania* solo surge después de varios años de experiencia, práctica y dedicación.

Referencias

1. Velez I, Hendrickx E, Robledo S, Agudelo S. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2001;17:171-180.
2. Barreto M, Burbano M, Barreto P. Nuevos registros de flebotominos (Diptera: Psychodidae) y triatomos (Hemiptera: Reduviidae) para Risaralda, Cauca y Valle del Cauca, Colombia. Colombia Médica. 1997;28:116-122.
3. Salomón O, Mocarbel N, Pedroni E, Colombo J, Sandillu M. *Phlebotominae*: Vectores de leishmaniasis en las provincias de Santa Fe y entre Ríos, Argentina. Medicina (Buenos Aires) 2006;66:220-224.
4. INLASA. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de Leishmaniosis. Unidad de parasitología y entomología. Primera edición, La Paz, 2002.
5. Organización Mundial de la Salud, Comité de expertos en la lucha contra la leishmaniasis. Lucha contra las leishmaniasis: informe de un Comité de Expertos de la OMS. Ginebra: OMS; 1990. Serie de informes técnicos No. 793.
6. Peñuela M, Sánchez A. Una mirada a la epidemiología y al control de la leishmaniasis zoonótica en Colombia. Biosalud. 2007;6:99-111.
7. Bruzual E, Arcay L, Parte-Pérez M. Diseminación tisular y efectos histopatológicos producidos por *Leishmania mexicana amazonensis* en roedores infectados experimentalmente. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2008; 28:139-144.
8. Zea D, Prager M, Figueroa R, Miranda M. Complicación mucosa de la leishmaniasis cutánea. Biomédica. 2009;29:9-10.
9. Mejía P, Restrepo R, Toro A. leishmaniasis mucocutánea verrucosa: una manifestación inusual. Rev Asoc Col Dermatol. 2008;16:97-99.
10. Zabala E, Ramírez O, Bermúdez V. leishmaniasis visceral en un canino. Rev Fac de Ciencias Veterinarias. 2005;46:43-50.
11. Miranda H, Alfaro A, Lora C, Rodríguez L. Estudio comparado de métodos de diagnóstico de la leishmaniasis y caracterización molecular de los agentes etiológicos en la libertad. Folia Dermatol. 2003;14:18-21.
12. Salomon O, Ramos L, Quintanilla M, Acardi S, Santini M, Schneider A. Distribución de vectores de leishmaniasis visceral en la provincia de corrientes, 2008. Medicina (Buenos Aires) 2009;69:625-630.
13. Zerpa O, Borges R, Loyo N, Galindo W, Belisario D, Rodriguez N, Sosa A, Convit J. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. Dermatología Venezolana. 2002;40:106-110.
14. Cuba C, Netto E, Costa J, Barreto A. El cultivo "In Vitro" como instrumento práctico para el diagnóstico y aislamiento primario de *Leishmania braziliensis*, estudio de pacientes en áreas endémicas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1986;28:317-324.
15. Naiff RD, Talhari S, Barrett TV. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986;83:529-530.
16. Valencia P, Vera-Ku B, Flores A, Andrade F. Obtención de cultivo axénico de amastigotes de tres cepas de *Leishmania (Leishmania) mexicana* a partir de promastigotes aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada en México. Rev Biomed. 1998;9:206-213.
17. Missoni E, Masala G. Calor y leishmaniasis. Una revisión de las implicancias clínicas y biológicas. Rev. Peruana de Epidemiología. 1993;6:27-32.
18. Gallego M, Riera C. Las Leishmaniosis Humanas: Leishmaniosis Autótona por *Leishmania infantum*. Unitat de Parasitologia Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitaries, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona. 2003. http://www.seimc.org/control/revi_para/pdf/leish.pdf