

UVE
Biol
1988

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE LEISHMANIA
SEGUN EL METODO DE OBTENCION DE LA MUESTRA
Y EL TIPO DE SANGRE UTILIZADO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.

TERESA SAMAYOA FERNANDEZ

Guatemala

1988

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE LEISHMANIA
SEGUN EL METODO DE EXTRACCION DE LA MUESTRA
Y EL TIPO DE SANGRE UTILIZADO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE LEISHMANIA
SEGUN EL METODO DE OBTENCION DE LA MUESTRA
Y EL TIPO DE SANGRE UTILIZADO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.

TERESA SAMAYOA FERNANDEZ

Trabajo de investigación presentado para optar
al grado académico de Licenciada en Biología.

Guatemala

1988

Vo.Bo.:

f Ana Maria Padilla
Lic. Ana Ma. P. de Mérida
Asesora

Tribunal:

f Ana Maria Padilla
Lic. Ana Ma. P. de Mérida

f T. Navin
Dr. Thomas Navin

f Celia Córdón de Rosales
Lic. Celia Córdón de Rosales

Fecha de aprobación: 19 de octubre de 1988

Dedico este trabajo:

A DIOS

A mis padres y hermano

A mis familiares

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy especialmente al Dr. Thomas Navin por su ayuda durante todo el desarrollo de este trabajo.

A la Lic. Ana María Peralta de Mérida por su asesoría y gran ayuda y apoyo para realizar este trabajo.

A la Lic. Celia Cordón de Rosales por la revisión y comentarios del trabajo escrito.

Al Sr. Juan Francisco Montenegro por permitirme sacar sangre de sus caballos.

Al Ing. Jaime Sosa del INCAP por su ayuda en el análisis estadístico.

Al Ing. Luis Felipe Mérida, al Sr. Silvetz Ramirez y al arquitecto Francisco José Samayoa por el dibujo de las gráficas.

Al Ing. Luis Fernando Samayoa por permitirme utilizar su computadora.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
A. Leishmaniasis	1
B. Clasificación de <u>Leishmania</u>	1
C. Ciclo vital	2
D. Reservorios	2
E. Vector	4
F. Complejos taxonómicos	5
G. Leishmaniasis en el Nuevo Mundo	6
H. Formación de la úlcera	8
I. Espectro de enfermedades	9
J. <u>Leishmania mexicana mexicana</u>	10
K. <u>Leishmania braziliensis braziliensis</u>	11
L. Métodos de diagnóstico	12
M. Métodos de extracción de la muestra	14
N. Medios de cultivo	15
O. Sangre	18
P. Crecimiento de <u>Leishmania</u> en hamsters	20
Q. Tratamiento	22
R. Leishmaniasis en Guatemala	23

	Página
II. METODOLOGIA	29
A. Procedencia de las cepas de <u>Leishmania</u>	29
B. Determinación de especie de las cepas de <u>Leishmania</u>	29
C. Extracción de los amastigotes	31
D. Preparación de los medios de cultivo	36
E. Inoculación de los medios de cultivo	38
F. Observación de los cultivos. Curvas de crecimiento	40
G. Pruebas estadísticas	42
III. RESULTADOS	43
A. Porcentajes de positividad y negatividad	43
B. Curvas de crecimiento	51
IV. DISCUSIONES	69
A. Determinación de especie	69
B. Porcentajes de positividad y negatividad	70
1. Por cepas	70
2. Medios positivos	71
3. Medios sin crecimiento	75
4. Medios contaminados con hongos o bacterias	80

	Página
C. Curvas de crecimiento	81
1. Observación de los cultivos	81
2. Dibujo de las curvas de crecimiento	86
3. Criterios usados para comparar las curvas de crecimiento	87
4. Análisis de las curvas de crecimiento	88
a. Comparación de especies	88
b. Comparación de métodos de extracción de la muestra	90
c. Comparación de dos tipos de sangre agregados al medio de cultivo	91
d. Interacción de variables	94
V. CONCLUSIONES	95
VI. LITERATURA CITADA	97

Lista de Cuadros

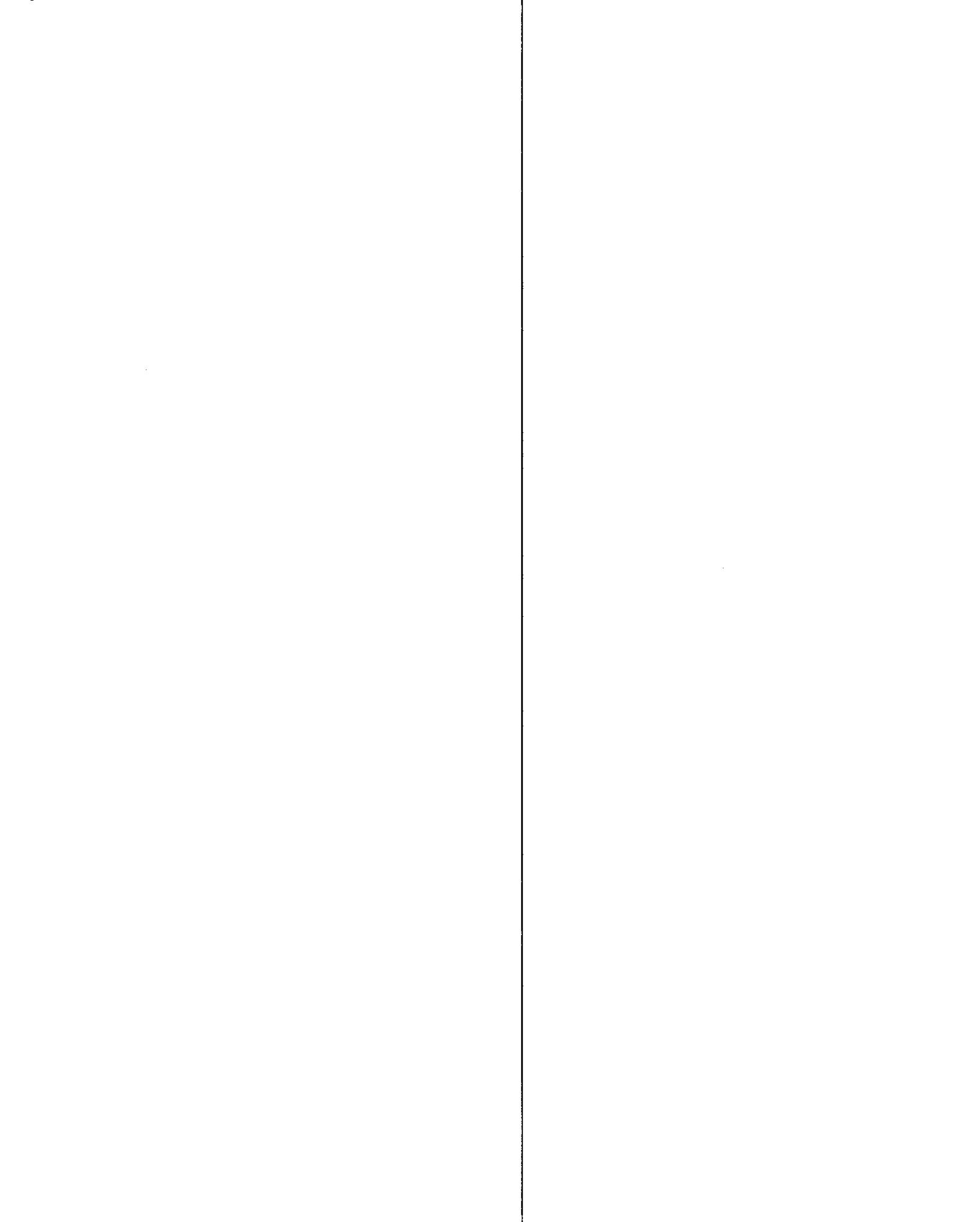
Cuadro		Página
1	Resultados de los estudios de comparaciones de métodos de diagnóstico de leishmaniasis cutánea y/o mucosa.	16
2	Lista de los hamsters utilizados: Código del paciente del que se inoculó, especie de <u>Leishmania</u> que se les aisló, antigüedad de la lesión, y área de lesión.	32
3	Frecuencias y porcentajes de positividad de <u>Leishmania</u> en improntas y medios de cultivo, a partir de una cepa.	44
4	Frecuencias y porcentajes de positividad de los medios de cultivo inoculados con <u>Leishmania</u> , para las variables, combinación de variables y el total.	49
5	Resultados de la prueba de Chi-cuadrado aplicada a las frecuencias de medios de cultivo positivos y negativos, inoculados con <u>Leishmania</u>	50

6	Resultados del ANDEVA trifactorial (especie x método de muestreo x sangre) para el pico máximo de crecimiento, # de días para alcanzar el pico, # de días para llegar a 10^6 promastigotes/ml, y # de días sobre 10^6 promastigotes/ml.	53-54
7	Resumen de los resultados significativos del ANDEVA trifactorial (Cuadro 6).	55
8	Resultados del ANDEVA que compara el pico máximo de crecimiento, y el # de días sobre 10^6 promastigotes/ml, de los medios conteniendo sangre de los tres conejos utilizados.	65
9	Resultados de la prueba de Tukey comparando el pico máximo de crecimiento de los tubos conteniendo sangre de los tres conejos utilizados.	65

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Ciclo vital de <u>Leishmania</u>	3
2	Distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea en el Nuevo Mundo.	7
3	Número de medios de cultivo inoculados para cada tratamiento aplicado.	39
4	Frecuencias y porcentajes de crecimiento y contaminación de los cultivos de <u>Leishmania</u> para cada variable y para el total.	48
5	Curvas de crecimiento "in vitro" de <u>Leishmania mexicana</u> y <u>L. braziliensis</u> en medio de Evans.	58
6	Curvas de crecimiento "in vitro" de <u>Leishmania</u> a partir de amastigotes tomados de la pata de un hámster por aspirado o por biopsia.	59
7	Curvas de crecimiento de <u>Leishmania</u> en medios de cultivo con sangre de conejo o sangre de caballo	61
8	Curvas de crecimiento de <u>Leishmania mexicana</u> o <u>L. braziliensis</u> en medios de cultivo con sangre de caballo o conejo. Medias.	62
9	Curvas de crecimiento de <u>Leishmania mexicana</u> o <u>L. braziliensis</u> en medios de cultivo con sangre de caballo o conejo. Medianas.	63

Figura		Página
10	Curvas de crecimiento de <u>Leishmania</u> en medios de cultivo enriquecidos con sangre de tres conejos diferentes. Medias	67
11	Curvas de crecimiento de <u>Leishmania</u> en medios de cultivo enriquecidos con sangre de tres conejos diferentes. Medianas	68



RESUMEN

En Guatemala hay leishmaniasis cutánea provocada por cepas de Leishmania mexicana y L. braziliensis. El aislamiento de las cepas en hamsters y su mantenimiento en medios de cultivo es importante para el diagnóstico de la enfermedad.

Se trabajó con once cepas de L. braziliensis y nueve cepas de L. mexicana aisladas de pacientes guatemaltecos e inoculadas en hamsters.

Se compararon dos métodos de extracción de la muestra a partir de la lesión de la pata del hámster: aspirado versus biopsia. Ambos resultaron igualmente efectivos para el aislamiento de las cepas en medio de Evans. La positividad para biopsia fue 61% y para aspirado 64%. El método de toma de muestra no afecta el crecimiento posterior de los organismos en los medios de cultivo.

Adicionalmente, se hicieron curvas de crecimiento de las dos especies de Leishmania cultivadas, en medios de Evans enriquecidos con sangre, y con medio de Schneider + suero bovino fetal como fase líquida, contando la concentración diaria de parásitos con un hemocitómetro. Esto se hizo con el propósito de verificar si se puede sustituir sangre defibrinada de conejo por la sangre de caballo defibrinada e inactivada que se ha recomendado (Evans 1978) para enriquecer

los medios de cultivo. Las curvas de crecimiento se compararon con base en rapidez de crecimiento (número de días para llegar a 10^6 promastigotes/ml y número de días para alcanzar el máximo); crecimiento máximo (concentración máxima en promastigotes/ml); y durabilidad del medio (número de días que el medio se mantuvo sobre 10^6 promastigotes/ml).

Leishmania braziliensis fue más difícil de aislar, y presentó un crecimiento más lento y duradero que L. mexicana ($p < 0.05$). Sin embargo, ambos tuvieron valores máximos similares (mayores de 10^8 promastigotes/ml). Los medios enriquecidos con sangre de conejo presentaron un porcentaje de medios positivos estadísticamente mayor ($p < 0.05$) que los enriquecidos con sangre de caballo, en el caso de L. braziliensis, pero igual si no se toma en cuenta la especie de Leishmania. Los medios con sangre de conejo también llegaron a un pico máximo mayor ($p < 0.05$). Por esto se considera que la sangre de conejo defibrinada puede sustituir a la de caballo defibrinada e inactivada, en el medio de cultivo. Asimismo se encontraron diferencias en rendimiento de concentraciones máximas entre conejos donadores de sangre ($p < 0.05$), siempre en rangos aceptables.

I. INTRODUCCION

Este trabajo tiene como principales objetivos comparar dos técnicas para obtener muestras de lesiones de hamsters inoculados con Leishmania, y la comparación del efecto de dos tipos de sangre animal en la preparación de los medios de cultivo.

A. Leishmaniasis:

La leishmaniasis humana comprende un conjunto heterogéneo de enfermedades. Se distinguen tres formas mayores: Leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral. La visceral es potencialmente fatal. Estas enfermedades son causadas por varias especies del protozoo parásito Leishmania, y son transmitidas por las hembras de las moscas de arena, principalmente de los géneros Phlebotomus, y Lutzomyia, que pican a la persona para alimentarse de su sangre (Kern 1981).

B. Clasificación de Leishmania:

Segun la clasificacion de Levine et al. (1980), los organismos del género Leishmania pertenecen a: Reino Protista; Subreino Protozoa; Filo Sarcomastigophora; Subfilo Mastigophora; Clase Zoomastigophorea; Orden Kinetoplastida; Suborden

Trypanosomatina; Familia Trypanosomatidae; Leishmania Ross 1903.

C. Ciclo vital:

Los organismos del género Leishmania presentan dos formas distintas: un promastigote flagelado en el vector, y un amastigote sin flagelo en el huésped mamífero. El amastigote es un parásito intracelular obligado de los macrófagos e histiocitos. El parásito se multiplica rápidamente por fisión binaria hasta que causa la ruptura del macrófago. Los parásitos, entonces, pueden ser fagocitados por otros macrófagos, o ser ingeridos por un vector que pica a la persona. En el insecto, los parásitos pasan a su forma flagelada, el promastigote, y se multiplican otra vez rápidamente por fisión binaria. Los parásitos flagelados migran a la proboscis del vector, y eventualmente pueden ser inoculados a otra persona cuando el insecto toma otra ingesta de sangre. Como puede verse en la Figura 1, entonces el ciclo empieza de nuevo (Pearson 1984).

D. Reservorios:

Esta enfermedad es común entre reptiles del Orden Squamata, Suborden Sauria (lagartijas), y entre mamíferos. De estos últimos la sufren especialmente cánidos y roedores, pero también se ha visto en edentados, marsupiales,

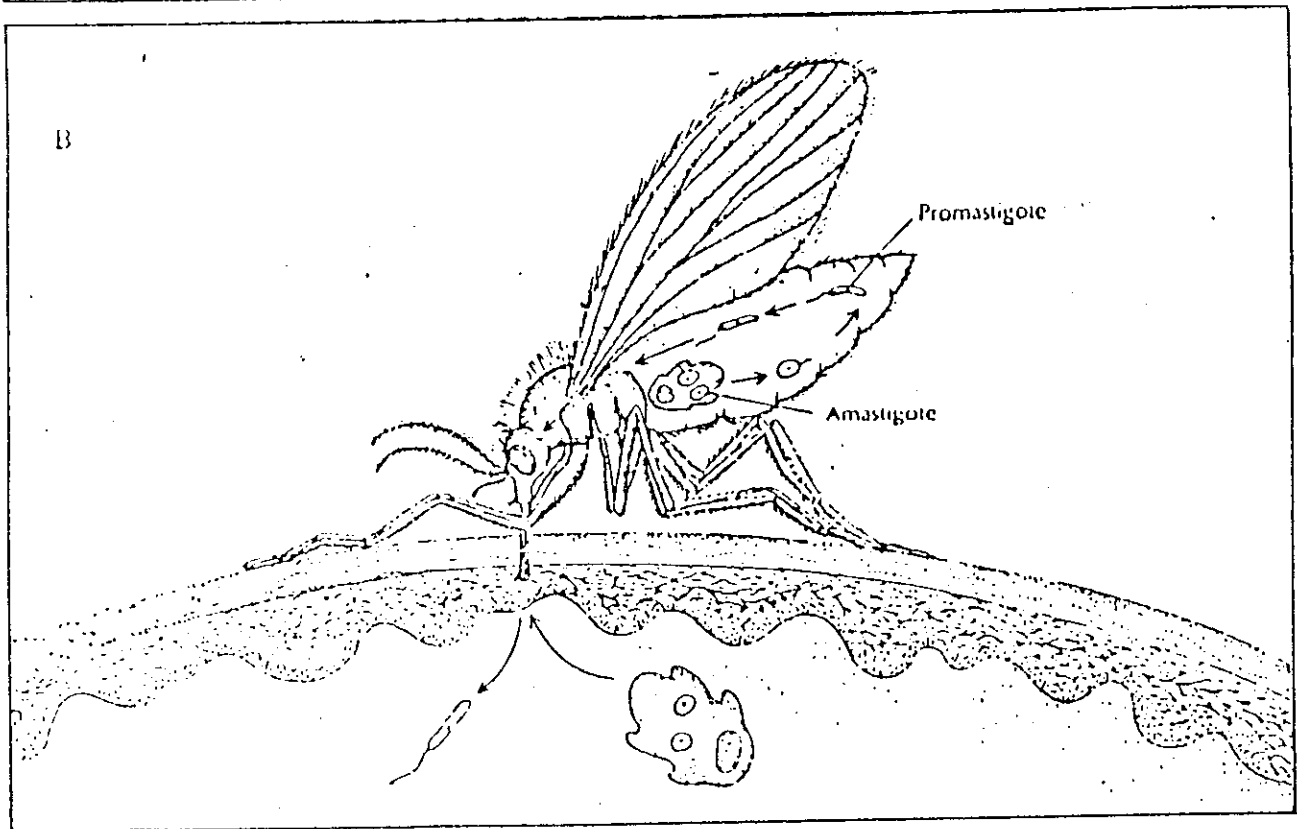
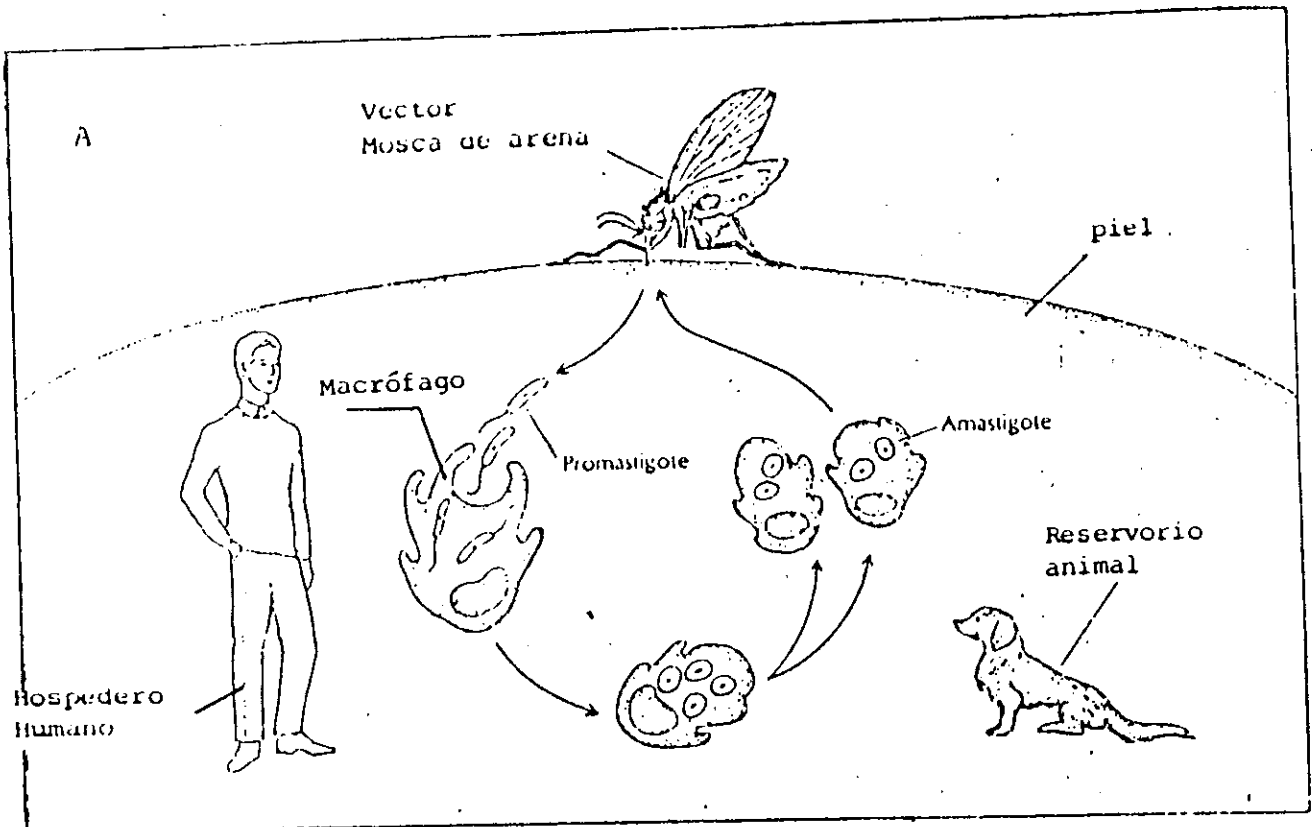


Figura 1. Ciclo vital de *Leishmania*. A, En el hospedero mamífero. B, en el vector. (Pearson 1984)

prociónidos y primates, incluyendo al hombre, que es un huésped accidental al entrar a selvas y demás áreas endémicas (Zuckerman y Lainson 1977), por lo que la enfermedad constituye una zoonosis.

E. Vector:

El vector de la leishmaniasis es la comúnmente llamada "mosca de arena", que es un díptero con rango de vuelo muy corto. Solamente las hembras pican, y la sangre que ingieren la utilizan en la producción de huevos. Viven aproximadamente unas dos semanas y se alimentan de sangre unas dos o tres veces durante su vida. Para infectarse, la mosca debe picar cerca de la lesión, pues los macrofagos infectados se quedan en los tejidos cercanos.

Se han reportado numerosas especies de moscas de arena que transmiten la leishmaniasis, y que pertenecen a cuatro géneros: la mayoría son Phlebotomus en el viejo Mundo (Zuckerman y Lainson 1977; Ash y Orihel 1980; Markell y Voge 1981; Katz et al. 1982; Pearson 1984) y Lutzomyia en el Nuevo Mundo (Los anteriores y Evans et al. 1984; Low-a-chee et al. 1983; Cuba Cuba et al. 1985; Travi 1987); pero también se han reportado Psychodopygus (Zuckerman y Lainson 1977; Markell y Voge 1981; Katz et al. 1982) y Sergentomyia (Kern 1981).

F. Complejos Taxonómicos:

En los inicios de la investigación de la leishmaniasis, se distinguían solamente tres especies con base en los criterios clínicos de la enfermedad: Si era visceral, cutánea o mucosa. Dado que se presenta todo un espectro de enfermedades, se fueron subdividiendo en más especies, y aparecieron nomenclaturas más complicadas, en especial para las leishmanias sudamericanas, que están en un rápido proceso de especiación (Zuckerman y Lainson 1977).

Con el tiempo han surgido nuevos criterios en la taxonomía de las leishmanias. Hoy en día se han utilizado una combinación de las características de los parásitos, como la morfología, comportamiento en los huéspedes vertebrado e invertebrado, crecimiento 'in vitro' en medios de cultivo estándar, y datos serológicos y epidemiológicos. También pueden mencionarse pruebas de densidad buoyante del DNA del cinetoplasto, análisis de isoenzimas, composición antigénica de los amastigotes y promastigotes, y los metabolitos excretados por los parásitos (Zuckerman y Lainson 1977)

En la actualidad, se han distinguido cuatro grupos taxonómicos, o complejos con sus subespecies, causantes de la leishmaniasis humana:

Complejo Leishmania donovani Ross 1903 (leish. visceral)

L. tropica Wright 1903 (cutánea del Viejo Mundo)

L. mexicana Biagi 1953 (cutánea del Nuevo Mundo)

L. braziliensis Vianna 1911 (cutánea y mucosa del
Nuevo Mundo). (Neva 1982)

G. Leishmaniasis en el Nuevo Mundo:

En este trabajo sólo se estudiaron L. mexicana y L. braziliensis, por lo que de aquí en adelante solamente se hablará de estos dos complejos. En la Figura 2 puede verse la distribución de la leishmaniasis cutánea en el Nuevo Mundo. En ella puede verse que del complejo L. mexicana, L. m. amazonensis es la subespecie más frecuente, y de más amplia distribución (Grimaldi et al. 1987). Del complejo L. braziliensis, L. b. braziliensis es la subespecie con mayor frecuencia y distribución, causando leishmaniasis cutánea y mucosa (Grimaldi et al. 1987).

En el VIII Congreso Latinoamericano de Parasitología, en 1987, R. A. Cedillos reportó que ha habido un incremento del número de casos de leishmaniasis cutánea y mucosa, debido a la ampliación de la frontera agrícola, y otras actividades en la selva. Sin embargo enfatizó en que se desconoce el número exacto de casos porque en la mayoría de países el sistema de diagnóstico y notificación es muy deficiente. En toda Latinoamérica se notificaron 11,425 casos en 1982, 16,374 en 1983 y 16,181 casos en 1984. Un 80% de casos fueron de leishmaniasis cutánea o mucosa. Kern (1981) reporta 12 millones de casos de leishmaniasis humana en el mundo.

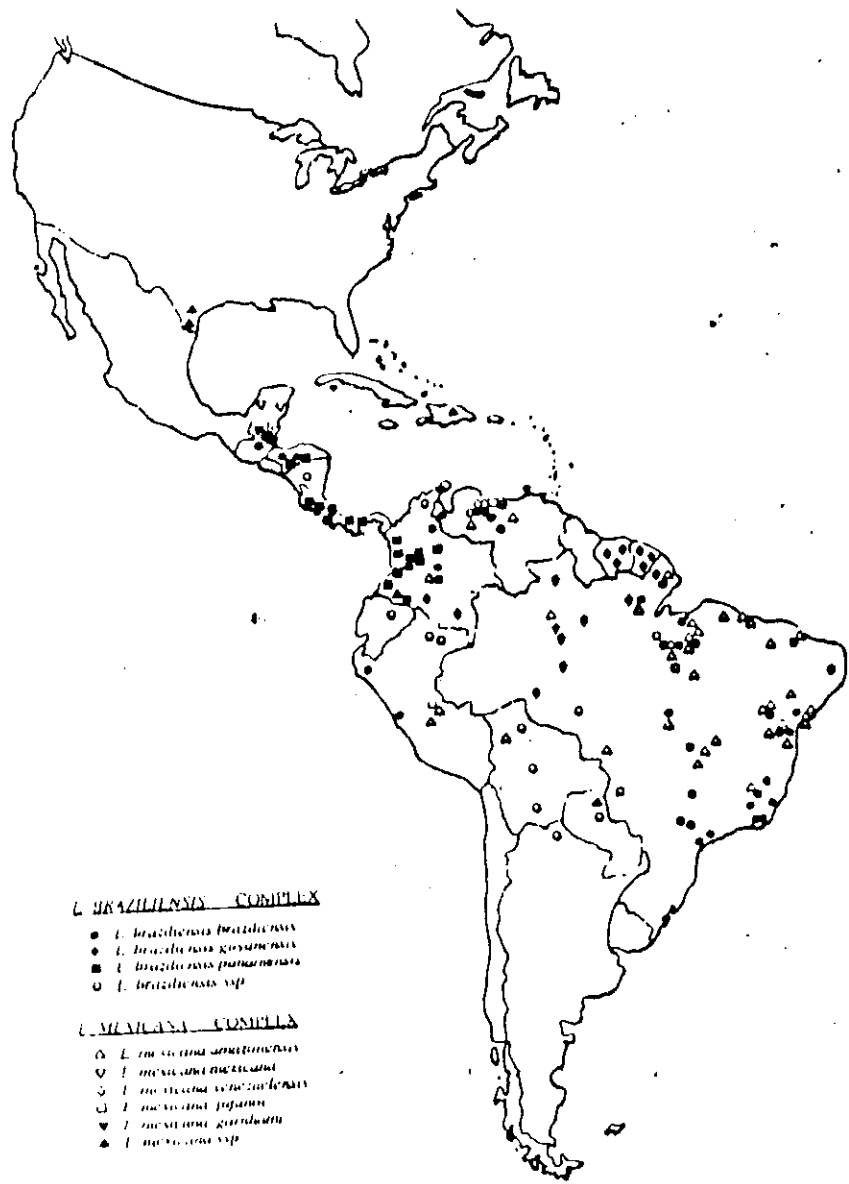


Figura 2. Distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea en el Nuevo Mundo (Grimaldi et al. 1987). La información para Guatemala se completó de acuerdo a otra fuente (Kelley et al. 1987).

H. Formación de la úlcera:

Después de la picadura de la mosca de arena, en la que inocula promastigotes a la piel, los parásitos son fagocitados por los macrófagos, donde proliferan. También se encuentran en el endotelio de los capilares y otros pequeños vasos sanguíneos del área. Los linfocitos se sensibilizan y activan a los macrófagos, que lisan a los amastigotes. Se da una reacción granulomatosa y pueden haber acumulaciones de monocitos, linfocitos y células plasmáticas, así como leucocitos polimorfonucleares donde hay necrosis de tejidos (Katz et al. 1982). Primero se forma un nódulo localizado, luego salen nodulos satélites, que se ulceran cuando los parásitos dañan el suministro de sangre en el área afectada (Markell y Voge 1981; Neva 1982). También se ha propuesto que la úlcera resulta de la rápida lisis de los macrófagos, y se ha mencionado la posibilidad de que exista una toxina, pero nunca se ha comprobado su existencia (Katz et al. 1982). Las lesiones pueden ser húmedas (con un exudado), o secas. También pueden ser únicas o múltiples. Al parecer, la manifestación clínica de la enfermedad depende no sólo de la especie del parásito, sino también de la historia inmunológica del paciente así como de sus características genéticas y metabólicas. Es por eso que se da un espectro de enfermedades (Zuckerman y Lainson 1977; Pearson 1984). Existe una clasificación histológica de la leishmaniasis cutánea (Ridley 1980) que es

compatible con todo el rango de enfermedades.

I. Espectro de enfermedades:

La lesión cutánea más común se cura por sí misma, cuando la inmunidad del paciente se incrementa con el tiempo. Las infecciones secundarias pueden complicar la curación. Sin embargo, hay casos en que la lesión no se cura espontáneamente. Hay dos polos en el espectro de la respuesta inmune: La anergia y la hipersensibilidad. El paciente anérgico es incapaz de responder a la infección. Ahora se sabe que es por la supresión de la respuesta de los linfocitos T (Castes 1987; Kern 1981). Los parásitos, entonces, pueden proliferar indefinidamente, formando numerosas lesiones, que cubren una gran área del cuerpo. Esta es la característica de la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Markell y Voge 1981). El paciente hipersensible tiene una respuesta celular y humoral bastante efectiva, pero no puede eliminar a los parásitos por completo, así que la lesión central se cura, pero los bordes de la misma siguen activos, o se forman lesiones periféricas activas. Esta es la forma recidiva o lupoide (Markell y Voge 1981).

En la leishmaniasis mucosa, la lesión cutánea inicial se cura, pero meses o años después aparecen lesiones fuertemente desfigurativas y destructivas en las membranas mucosas. En ocasiones no hay lesión cutánea previa a la mucosa (Pearson

1984).

La leishmaniasis puede confundirse con esporotricosis, blastomycosis, sífilis, lepra, tuberculosis cutánea, y lupus vulgaris (Pearson 1984).

J. Leishmania mexicana mexicana Biagi 1953:

Los reservorios naturales que se han reportado son roedores selváticos como Ototylomys phyllotis, Heteromys desmarestianus, Nyctomys sumichrasti y Sigmodon hispidus.

La lesión es más frecuente en la cola (Zuckerman y Lainson 1977). El vector natural reportado ha sido Lutzomyia olmeca olmeca (Evans et al. 1984). En general, en el complejo L. mexicana, los promastigotes se desarrollan en el intestino medio y anterior, nunca en el posterior (Zuckerman y Lainson 1977).

Las enfermedades que causa son conocidas como la "úlceras del chiclero" y "úlceras de la banía". Hay una sola lesión o un número limitado de ellas, con destrucción frecuente del tejido del pabellón de la oreja, en el 40% de los casos (Zuckerman y Lainson 1977; Markell y Vogt 1981). No hay expresión mucosa, y son raros los casos de LCD (Katz et al. 1982).

Es ampliamente aceptado que L. mexicana crece fácil y abundantemente en los medios de cultivo. En los hamsters, los parásitos se reproducen rápidamente para formar histiocitomas llenos de parásitos, con una reacción celular pobre. La

metástasis hacia las demás extremidades es común (Zuckerman y Lainson 1977). Morfológicamente, los amastigotes de L. mexicana se pueden diferenciar de los del complejo L. braziliensis, porque los primeros son más grandes, y muestran diferencias en la forma y disposición del cinetoplasto y núcleo, y son más vacuolados (Zuckerman y Lainson 1977).

K. L. braziliensis braziliensis Vianna 1911:

Los reservorios naturales que se han reportado son Oryzomys concolor, O. capito laticeps, O. nigripes, Akodon arviculoides, Proechimys guyanensis y perros (Zuckerman y Lainson 1977; Cuba Cuba 1985).

Los vectores reportados para L.b. braziliensis han sido Psychodopyqus wellcomei, Lutzomyia pessoai, Lu. intermedius, Lu. ylephiletor, Ps. amazonensis y Ps. paraensis (Zuckerman y Lainson 1977).

La enfermedad que causa consiste en lesiones únicas o poco numerosas que pueden ser extensas, de larga duración y desfigurantes. La metástasis de los parásitos de la lesión primaria a las mucosas es común, y se desarrolla la leishmaniasis mucosa o espundia, aún años después de haber desaparecido la primera lesión. El proceso empieza por lo general en el septo nasal y eventualmente lo perfora. Los primeros síntomas suelen ser epistaxis nasal y obstrucción. Luego colapsa la punta de la nariz. También, se puede perforar la piel de

la nariz o el paladar suave. El labio superior y la lengua, así como la mucosa bucal, faríngea y laríngea pueden destruirse, en ese orden. También, se ha reportado daño en la traquea y en la mucosa genital (Pearson 1984). En consecuencia, puede haber pérdida de la voz, respiración dificultosa, y muerte por infecciones bacterianas secundarias o pulmonía.

Numerosos autores han señalado que es extremadamente difícil cultivar L. b. braziliensis 'in vitro', que crece en números menores que L. mexicana, o simplemente no crece (Zuckerman y Lainson 1977; Walton et al. 1977; Marinkelle 1981; Chaves et al. 1982; Pearson 1984; Cuba Cuba et al. 1984b). En el hámster, los parásitos de L. braziliensis crecen relativamente despacio en la piel, produciendo un nódulo pequeño, nunca como el gran histiocitoma de L. mexicana (Zuckerman y Lainson 1977).

L. Métodos de diagnóstico:

Existen varias formas de diagnosticar la leishmaniasis, y los científicos aún no han llegado a un acuerdo sobre cuál es el más adecuado. Aún no hay uno que sea completamente satisfactorio.

- a) Examen clínico: no es suficiente, pues puede confundirse con otras enfermedades.
- b) Exámenes microscópicos: Se trata de ver los parásitos ya sea en secciones histológicas teñidas con hematoxilina-

eosina, o con frotos o improntas de muestras de la lesión, teñidas con colorante de Wright o Giemsa (Neva 1982; Arana, F.A. et al. 1987). La desventaja de este examen microscópico, es que las lesiones muchas veces tienen muy pocos amastigotes, y es difícil hacer el diagnóstico.

c) Cultivo: Los promastigotes se pueden ver en medios de cultivo, a partir de muestras que contienen amastigotes. Los diferentes medios se enumeraran más adelante. También, se han hecho cultivos de macrófagos 'in vitro', en los que se cultivan amastigotes (Kern 1981). Otros han hecho cultivos en la bolsa de yema de huevos de gallina embrionados. La desventaja de los medios de cultivo es que son complejos y caros, y hay mucha contaminación.

d) Inoculación de animales: Distintos tipos de muestras pueden inocularse en animales de laboratorio para ver el desarrollo de lesiones en ellos. Este método puede ser bastante tardado, porque las lesiones se manifiestan semanas o meses después. Se usan varios animales como ratas, ratones, hamsters, cuyos y primates no humanos de por lo menos nueve géneros (Lujan 1987). Entre los ratones se ha encontrado una susceptibilidad y patrón de enfermedad distinto según el tipo de ratón (Kern 1981; Hill et al. 1982). La leishmaniasis en el hámster se describirá en detalle más adelante.

e) Examen de hipersensibilidad atrasada (Prueba de

Montenegro):

Este examen consiste en inyectar intradérmicamente una suspensión de promastigotes de Leishmania muertos con fenol. Una induración a las 48 horas, de 5-10 mm. de diámetro o más, se considera positiva. Este examen tiene varias desventajas, porque es negativo durante las etapas iniciales de la infección, y se vuelve positivo cuando la úlcera ya se ha desarrollado, o cuando ésta ya se curó. En áreas endémicas, un gran segmento de la población es positiva, por lo que con esta prueba es difícil saber quién está padeciendo en ese momento de la enfermedad. Por otro lado, los pacientes anérgicos, con LCD, dan un resultado negativo (Katz et al. 1982).

f) También, se han reportado una serie de serodiagnósticos: Fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, examen de anticuerpos fluorescentes, anafilaxis pasiva cutánea, pruebas de difusión en gel, serotipos de factores excretados, ELISA, y otras pruebas, pero ninguna ha sido totalmente satisfactoria (Zuckerman y Lainson 1977; Markell y Voge 1981; Katz et al. 1982; Neva 1982).

M. Métodos de extracción de la muestra:

Como se mencionó, muchas veces es necesario extraer una muestra de la lesión para hacerle un análisis microscópico, inocular medios de cultivo, o animales de laboratorio.

La toma de la muestra de la lesión se puede hacer en varias formas: tomando un aspirado de la lesión con una jeringa hipodérmica que contiene solución salina, tomando una biopsia de los bordes de la lesión, haciendo un raspado con bisturí, u haciendo primero un corte en la lesión y luego un raspado de la misma (Katz et al. 1982; Neva 1982; Pearson 1984). Hay quienes afilan la punta de un fósforo, la insertan en la lesión y sacan una porción del tejido para hacer frotos (Urjel et al. 1983). Hay otros que usan una brocha de dentista de las de hacer tratamiento de canales, o capilares para sacar la muestra (Evans et al. 1984; Arana, B. et al. 1987).

Existen varios estudios que hacen una comparación de métodos, y sus resultados pueden verse en el Cuadro 1. Adicionalmente, hay autores (Markell y Vogt 1981; Neva 1982) que dan su opinión sobre cada método, aunque no presentan sus resultados.

N. Medios de cultivo:

Los organismos causantes de la leishmaniasis se han cultivado principalmente en medios de cultivo difásicos, es decir, que contienen tanto una fase sólida como una líquida. Sin embargo, también se han usado medios líquidos y semisólidos, monofásicos (Mansour et al. 1973; Berens et al. 1976; Ray y Ghose 1980; Al-Khaleeb y Al-Azawi 1981).

El medio difásico más utilizado es el NNN (por los

Cuadro 1

Resultados de estudios de comparaciones de métodos de diagnóstico de leishmaniasis cutánea y/o mucosa en humanos.

REFERENCIA	METODO DE DIAGNOSTICO	% DE POSITIVIDAD	ESPECIE ESTUDIADA
Cuba Cuba et al. 1984b	Impronta de biopsia	38.2	L.b.b
	Histología de biopsia	25.2	
	Cultivo de aspirados y biopsias	18.8	
	Hámster	39.2	
Weigle et al. 1987	Histología	14.1	L.b.p
	Impronta de biopsia	18.7	
	Raspado	22.3	
	Cultivo de aspirado	57.6	
	Cultivo de biopsia	49.4	
	Hamster inoculado con aspirado	38.3	
	Hamster inoculado con material de la biopsia	52.4	
Hendricks et al. 1979	Cultivo de aspirado a partir de lesiones con menos de un mes de duración	67.0	
Grimaldi et al. 1984	Biopsia → hamster → 2 días → biopsia → cultivo (10-15 días)	90.0	L.b.b
Arana, B. et al. 1987	Frote de raspado	53.7	L.b.b y L.m.m
	Cultivo de raspado con brocha de dentista	62.0	
	Cultivo de aspirado del borde de la lesión	55.0	
	Cultivo de biopsia	48.0	

L.b.b = Leishmania braziliensis braziliensis

L.b.p = L.b. panamensis

L.m.m = Leishmania mexicana mexicana

nombres de los que lo desarrollaron: Novy, Nicolle y Mac Neal). Este medio es esencialmente un agar sangre inclinado, al que se le ha incorporado peptona, extracto de res, y de 10-30% de sangre de conejo o caballo defibrinada. La parte líquida es solución de Locke, solución salina, líquido de condensación, o un medio de cultivo de tejidos. Sin embargo, a este medio básico se le han hecho múltiples modificaciones (Neva 1982; Marin et al. 1982). Actualmente, se sabe que los factores esenciales de crecimiento de Leishmania son: Una fuente de energía como la glucosa, una fuente de aminoácidos como la peptona, un estabilizador de la presión osmótica como el NaCl, la colina del extracto de res y la hemina de la sangre, ya sea entera defibrinada o hemolizada (Chaudhuri et al. 1982).

Los medios líquidos omiten el agar, y frecuentemente usan sangre hemolizada, así como suero bovino fetal. Algunos medios de cultivo de insectos, como el de Schneider, se han usado con buenos resultados (Neva 1982). Algunos de los medios semisólidos y sólidos que se han utilizado, presentan la variante de que se han sembrado en placas petri en lugar de tubos de ensayo, usando técnicas microbiológicas para sembrarlos. Varios investigadores han tenido éxito para cultivar colonias de L. donovani y L. tropica en tales medios (Keppel y Janovy 1980; Iovannisci y Ullman 1983; Hill et al. 1983; Hill 1983).

Se han hecho estudios comparativos de medios de cultivo (Walton et al. 1977; Srivastava y Srivastava 1980; Shaw y Lainson 1981; Chaves et al. 1982; Marin et al. 1982), pero aún no existe un acuerdo sobre el mejor medio. Gran parte del problema se debe a que muy pocos medios están químicamente definidos. Sólo unos cuantos investigadores han reportado medios definidos (Steiger y Steiger 1976; Melo 1981; Iovanisci y Ullman 1983).

O. Sangre:

La sangre es un ingrediente esencial del medio de cultivo, para lograr el crecimiento de los organismos. Chaudhuri et al. (1982), descubrieron que es la hemina, de todos los componentes de la sangre, la que sirve de nutriente a los protozoos. La hemina es la hemoglobina que ha sido calentada con ácido acético y cloruro de sodio, por lo que el ion Cl^- se une al hierro de la porción hem de la hemoglobina. Su nombre genérico es clorhemina o ferricloruro de ácido 1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinil-porfirina-6,7-dipropiónico. Sin embargo, la hemoglobina varía según la especie, como se puede comprobar al ver los cristales de hemoglobina. Por ejemplo, la oxihemoglobina humana forma cristales tetragonales, mientras que la de caballo los forma ortorrómbicos si ha sido citrada, y monoclinicos si ha sido oxalada (Windholz 1976). Aún, dentro de la especie humana, hay muchos tipos de

hemoglobina, por la variación de unos pocos aminoácidos. Esta variación se da independiente del tipo sanguíneo, que depende de la cubierta protéica del glóbulo rojo, por lo que dos personas con el mismo tipo sanguíneo pueden tener distinto tipo de hemoglobina. Por otro lado, si la sangre es entera, existen muchos factores más que varían, por lo que la sangre entre una especie y otra es muy distinta (Comunicación personal con el Dr. J. Calle).

En los medios de cultivo para Leishmania que llevan sangre, lo más común ha sido usar sangre de conejo, aunque se ha reportado sangre de caballo (Evans 1978; Evans et al. 1984), de oveja (Walton et al. 1977a), de cuyo, y de humano (Chaudhuri et al. 1982).

El tratamiento aplicado a la sangre también es motivo de polémica. La mayoría de investigadores usa la sangre entera defibrinada, aunque hay otros que la prefieren hemolizada (e.g. Mansour et al. 1973). Hay otros que también la inactivan (Evans 1978; Franke et al. 1985). Se han hecho comparaciones entre sangre fresca y una vendida comercialmente (Hill et al. 1982) y entre hemina fresca y una comercial (Chaudhuri et al. 1982).

Por último, también se ha discutido la concentración necesaria de sangre en el medio. Se han reportado concentraciones entre 10 y 30%. Mansour et al. (1973) propusieron una concentración de 30% de sangre de conejo defibrinada en medio

bifásico NNN, para el aislamiento primario de las cepas de Leishmania, y de sólo 10% para el mantenimiento de cepas establecidas después del tercer pase. Neva (1982) posteriormente confirmó esta recomendación. Srivastava y Srivastava (1980) reportaron que no hubo diferencia de rendimiento, en un agar enriquecido con un 10 ó 15% de sangre de conejo defibrinada. Cuba Cuba et al. (1985) reportaron un buen rendimiento en el 15% de sangre para mantenimiento y 30% para aislamiento.

P. Crecimiento de Leishmania en hamsters:

El hamster dorado, Mesocricetus auratus, ha sido muy utilizado para el crecimiento de Leishmania, a partir de las lesiones de pacientes o animales silvestres. Es relativamente anérgico a la leishmaniasis, y permite el desarrollo de la enfermedad, que por lo general es fatal para el hámster (Zuckerman y Lainson 1977; Markell y Voge 1981). Sin embargo, Kern(1981) reporta que las lesiones provocadas en los hamsters por L. enrietti muchas veces se curan por sí solas.

Como se mencionó anteriormente, en el hámster las características de las lesiones de L. braziliensis y L. mexicana son distintas. En un estudio (Wilson et al. 1979), las lesiones no fueron distinguibles durante los primeros 21-28 días de crecimiento posteriores a una inoculación intradérmica de 10⁶ promastigotes de cada especie. Después de este período,

las lesiones de L. mexicana se ponían redondeadas, más eritematosas, y eventualmente se ponían túrgidas, con la piel estirada y lustrosa. Entre los días 56-90 ambas lesiones consistían de células histiocíticas, aunque habían focos de linfocitos, células plasmáticas y leucocitos polimorfonucleares. En L. mexicana, la mayoría de histiocitos contenían numerosos amastigotes en vacuolas grandes. En L.b.braziliensis, la mayoría de histiocitos no contenían parásitos, y los que sí estaban infectados, también eran vacuolados. La rapidez de crecimiento y el tamaño de la lesión fue similar para ambas especies durante los primeros 21-28 días. Sin embargo, L.b. braziliensis presentó una regresión después del día 42. Esta regresión duró 14 días. Posteriormente, las lesiones mostraron un crecimiento lento. En L. mexicana, el tamaño de la lesión aumentó de tamaño exponencialmente, por lo menos durante 2 meses, llegando a tener unos 2 cm de área de lesión.

También, se cree que sólo en L. mexicana hay nódulos y metástasis a las extremidades, cola, testículos, orejas y nariz (Zuckerman y Lainson 1977; Cuba Cuba et al. 1984a), pero nunca una metástasis subcutánea.

Los lugares de inoculación de las leishmanias pueden ser nariz, orejas, patas y flancos. La inoculación puede hacerse intradérmica o subcutánea. La intradérmica ha demostrado producir lesiones cinco veces más rápido que la subcutánea (Wilson et al. 1979). La concentración del inóculo es

directamente proporcional a la rapidez del desarrollo de la lesión.

Q. Tratamiento:

Entre las personas afectadas es común automedicarse antes de buscar tratamiento, y se aplican ácido de batería, ajo en polvo, jugo de limón caliente, Lysol, y varias cortezas de arboles (Low-a-chee et al. 1983). Esto solo empeora el cuadro con necrosis e infecciones secundarias.

El tratamiento mas utilizado es la quimioterapia, con antimonios, de los cuales los pentavalentes como el Pentostam y el Glucantime parecen ser los más efectivos y menos tóxicos para el paciente. Las dosis reportadas varían, y los tratamientos suelen durar entre 10 y 15 días. También, se han usado diamidinas aromáticas y otras drogas como el cloruro de berberina, asimismo antibióticos como la Anfotericina B, Rí-pamficina y Monomicina.

Recientemente, se han ensayado otros tratamientos sin drogas, como la aplicación del calor (Navin 1987) o del frío (Robles 1987) directamente sobre la lesión, para matar a los parásitos. Ambos métodos han dado buenos resultados. Adicionalmente, hay estudios para la posible aplicación de inmunoterapia y vacunación (Castes 1987).

Control o prevención de la enfermedad:

Algunas formas de la leishmaniasis zoonótica pueden

controlarse si, tanto el reservorio como el vector, pueden encontrarse fácilmente y si las condiciones permiten su control. Sin embargo, en las selvas de Centro y Sur América, esto no se puede hacer. Los insecticidas no son recomendables desde el punto de vista económico y ecológico, y el hábitat de animales salvajes infectados no se puede destruir. La vacunación podría llegar a ser una solución, unido a un tratamiento barato y eficaz a los pacientes. Las moscas de arena son más abundantes al amanecer y al atardecer. Se podría cambiar los horarios de trabajo para evitar estar expuesto a las horas en que pican las moscas (Zuckerman y Lainson 1977; Katz et al. 1982).

R. Leishmaniasis en Guatemala:

En Guatemala, la mayoría de casos de leishmaniasis son cutáneos, aunque también se han dado casos de leishmaniasis mucosa y visceral (Torres y Figueroa 1987; Torres 1986; Cedillos 1987). Aparentemente, la leishmaniasis cutánea se conoce en Guatemala desde el tiempo de los mayas (Torres y Figueroa 1987).

El primero en estudiar la leishmaniasis cutánea (úlceras del chiclero) en Guatemala fue el Dr. E. Padilla en 1928, quien también la reportó en muchos perros del departamento de El Petén (Torres y Figueroa 1987). El primer caso confirmado de leishmaniasis visceral lo reportaron en 1949 los Dres. M.A

Cabrera y R. de León, en el departamento de El Progreso. El segundo caso lo reportó en 1958 el Dr. L.N. Figueroa, en el mismo departamento. En 1959, los mismos doctores describieron el área endémica de El Progreso (Torres y Figueroa 1987). En total son seis los casos reportados de leishmaniasis visceral en Guatemala hasta 1986: cinco en el valle del Río Motagua, El Progreso, y uno en el departamento de Santa Rosa. Todos los enfermos han sido niños menores de dos años (Torres 1986).

La leishmaniasis cutánea es mucho más frecuente en Guatemala. El número de reportes de casos al Departamento de Enfermedades Parasitarias de la Dirección General de Servicios de Salud ha aumentado notoriamente en la última década (Torres 1986). El 95% de los casos reportados son del Departamento de El Petén, y el resto de casos se distribuyen entre Playa Grande, El Quiché, Escuintla, Cobán, Alta Verapaz y Sololá (Torres 1986; Torres y Figueroa 1987).

La enfermedad afecta a grupos de campesinos que entran a la selva, a chicleros, y a los militares que han hecho sus entrenamientos y operaciones en la selva.

En el Medical Entomology Research Training Unit of Guatemala (MERTUG) y en el Walter Reed Army Institute of Research de Washington, D.C., se han aislado y caracterizado cepas guatemaltecas de L. b. braziliensis, L. b. panamensis, así como L. m. mexicana (Kelley et al. 1987).

Los vectores que se han encontrado naturalmente infectados por Leishmania en Guatemala son: Lutzomyia longipalpis para la enfermedad visceral (Zuckerman y Lainson 1977; Torres 1986). Para la cutánea, C. Porter, T. Ruebush y T. Navin del MERTUG aislaron L.m. mexicana de Lutzomyia ylephiletor y Lu. shannoni, y Evans et al. (1984) de Lu. olmeca olmeca en Belice.

Los reservorios silvestres que se han reportado para Guatemala y Belice son: Heteromys sp.-ratón espinoso de bolsillo- reportado por Lainson y Strangways en 1962, y por Porter, Ruebush y Navin en 1983 (Torres 1986); Ototylomys sp.-rata de árbol- reportada por Lainson y Strangways en 1962 (Torres 1986); Syomodon hispidus- rata algodónera- reportada por Lainson y Strangways en 1962 y Guzmán en 1984 (Torres 1986); y Peromyscus sp.- ratón de patas blancas- reportado por Lainson y Strangways en 1962 (Torres 1986).

En Guatemala, la leishmaniasis va en aumento, y cada vez se hace más necesario un diagnóstico adecuado y confiable, en el que se puedan aislar los parásitos que causan la enfermedad. Esto es de especial importancia desde que se descubrió L.b. braziliensis en el país, pues esta subespecie produce lesiones con un severo desfiguramiento de las mucosas.

En el MERTUG ya se hizo un estudio comparativo sobre el método de extracción de muestras a partir de lesiones de

humanos (Arana, B. et al. 1987). Sin embargo, no se ha hecho un estudio así, comparando métodos de extracción de muestra a partir de la lesión de un hámster dorado. Las lesiones de los hamsters son muy distintas a las de los humanos. Muchas veces es necesario inocular medios de cultivo a partir de los amastigotes de las lesiones de hamsters. Uno de los objetivos de este trabajo es comparar dos métodos de extracción de la muestra de la lesión del hámster dorado: el aspirado y la biopsia, según el crecimiento de los organismos en medios de cultivo, para poder recomendar el más adecuado.

En un laboratorio como el MERTUG, donde se hacen estudios epidemiológicos y otras investigaciones sobre Leishmaniasis, es necesario un medio de cultivo que sirva para los usos tan variados que se les dan a los parásitos:

- Para el diagnóstico a partir de pacientes, animales o de insectos, es necesario un medio en el que los parásitos se desarrollen en el menor número de días posible.

- Para el mantenimiento de cepas, es necesario un medio que dure en buenas condiciones el mayor tiempo posible. Actualmente, se tienen que hacer pases de las cepas en mantenimiento del medio inoculado a uno nuevo, cada semana.

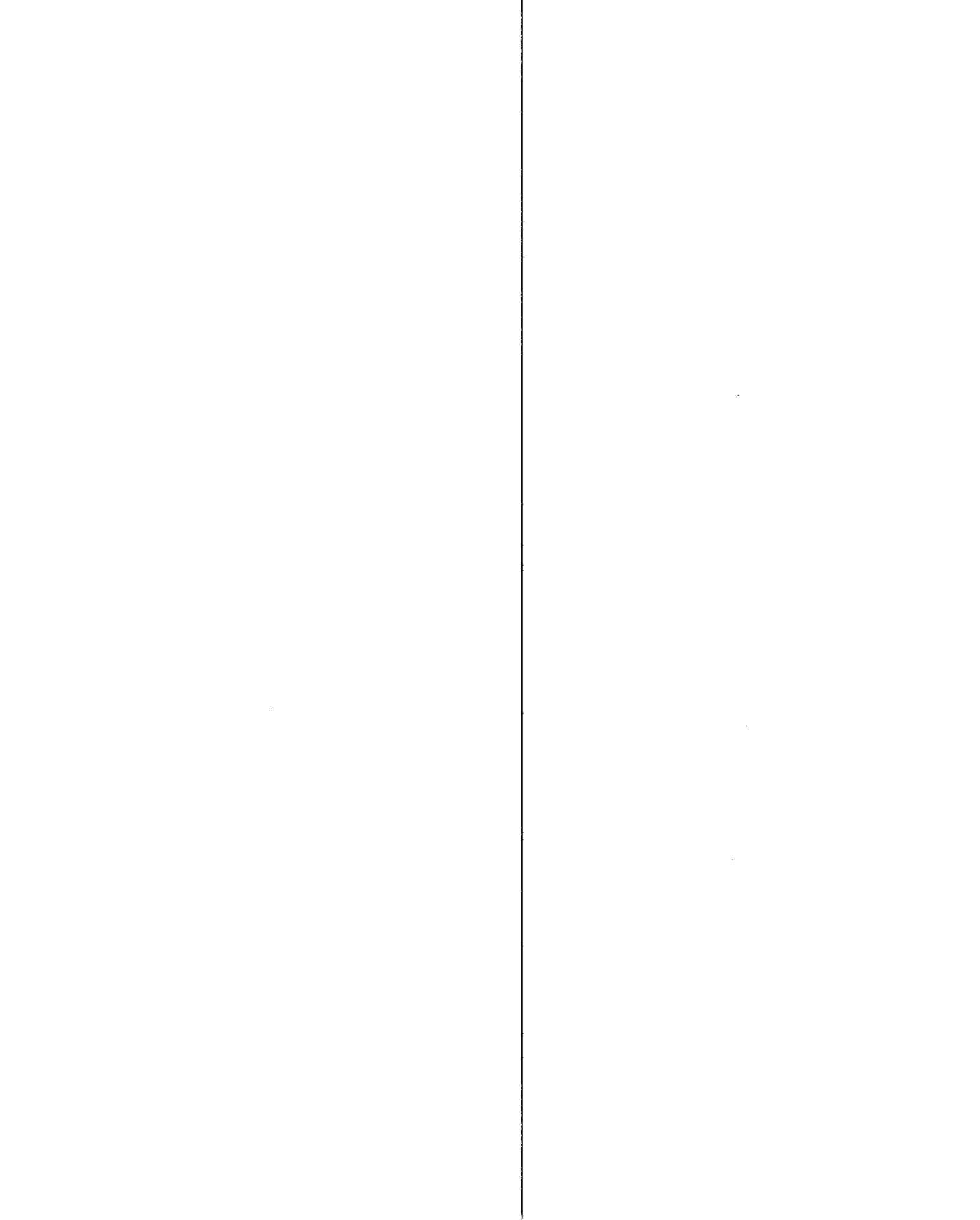
- Para estudios como el análisis del ADN del cinetoplasto, se necesitan altas concentraciones de parásitos en el medio.

Un medio que reuniera estas características y además fuera de fácil preparación y barato, sería el medio ideal, pero este

aún no existe. En el MERTUG se utiliza el medio de Evans (1978), con la única variante que en lugar de agregársele sangre defibrinada e inactivada de caballo, se le agrega sangre defibrinada de conejo. El segundo objetivo de este trabajo es hacer la comparación del rendimiento de la sangre de conejo vs. la de caballo en el medio de Evans, según los tres criterios de rapidez de crecimiento, duración del medio en buenas condiciones, y máxima concentración de parásitos.

Finalmente, dado que en Guatemala existen tanto L. mexicana como L. braziliensis, el tercer objetivo es comparar la positividad y el crecimiento de los organismos según la especie, para los dos métodos de toma de muestra, en los medios antes mencionados.

Este trabajo se complementa con otros dos estudios que se hicieron simultáneamente: Uno es sobre comparación de medios de cultivo (Mayorga 1988) y el otro compara distintos antibióticos y concentraciones distintas que se le pueden agregar al medio de Evans (1978) para evitar contaminación por hongos o bacterias (Fuentes 1988).



II. METODOLOGIA

Se evaluó el efecto de tres variables haciendo cultivos de Leishmania y siguiendo curvas de crecimiento: Especie de Leishmania inoculada (L. mexicana vs. L. braziliensis); método de muestreo (aspirado vs. biopsia); sangre utilizada en el medio de cultivo (sangre de caballo vs. sangre de conejo).

Procedimiento:

A. Procedencia de las cepas de Leishmania:

Las cepas de Leishmania, se obtuvieron de hamsters dorados, Mesocricetus auratus, inoculados en las patas traseras, con muestras obtenidas de lesiones de pacientes de leishmaniasis. Estas personas son en su mayoría soldados guatemaltecos que son pacientes del Hospital Militar de Guatemala, o que llegan a la clínica de la Base Militar de Poptún, Petén.

Los hamsters utilizados en este trabajo fueron aquellos que mostraban una lesión en la pata o patas inoculadas.

B. Determinación de especie de las cepas de Leishmania:

Haciendo uso de la información obtenida por pruebas de ADN del cinetoplasto y de isoenzimas, se escogieron

hamsters inoculados con cepas de L. braziliensis y L. mexicana para usarlos en la prueba, e incluir a las dos especies causantes de leishmaniasis cutánea que se han identificado en Guatemala. Sin embargo, de los 20 hamsters utilizados solamente quince poseían cepas que habían pasado por alguna de las pruebas antes mencionadas, al momento de escribir este trabajo.

Debido a que no se sabía con certeza la especie de Leishmania que tenían cinco de los hamsters, se aplicó un tercer criterio para determinar la especie. Este consiste en comparar el área de la lesión, contra la edad de la misma. Wilson et al. (1979) reportaron que L. mexicana produce una lesión en la pata de mayor tamaño que L. braziliensis, con unos rangos de área de lesión de 0.15-2.0 cm y 0.25-0.85 cm respectivamente. Los últimos valores corresponden a 60 días post-inoculación intradérmica con 10^6 promastigotes. Para cada hamster se anotó la edad de la lesión y el índice del área de lesión, calculado como $A = r_1 r_2$ donde r_1 = radio mayor y r_2 = radio menor de la lesión (Wilson et al. 1979) En base a esto, los cinco hamsters del grupo en mención se pudieron separar entre L. mexicana y L. braziliensis. En total, después de aplicados los tres criterios mencionados (ADN, isoenzimas y tamaño de la lesión de la pata), se pudo determinar que se trabajó con 9 hamsters inoculados con

L. mexicana y 11 hamsters inoculados con L. braziliensis. En el Cuadro 2 se resumió esta información.

Es importante hacer notar un caso. La cepa llamada Roedor #48 Sitio #5, fue inoculada en un hamster dorado a partir de la lesión que presentaba en la cola un roedor silvestre de El Petén. Las cepas de L. braziliensis utilizadas, probablemente pertenecen a L. braziliensis braziliensis. Las cepas de L. mexicana, probablemente pertenecen todas a la subespecie L. mexicana mexicana.

C. Extracción de los amastigotes:

La extracción de los amastigotes de Leishmania de las lesiones de las patas de los veinte hamsters se hizo mediante un aspirado y una biopsia, según el método que se describe a continuación.

Se mató el hamster por inhalación de cloroformo. Se colocó sobre unas toallas de papel, bajo una campana, que tenía en su interior un Bacti-incinerador al rojo vivo, para mantener la esterilidad dentro de la campana, y se bañó con alcohol etílico al 95%, en ambos lados del cuerpo. Se tapó el cuerpo con más toallas de papel, dejando destapada la pata posterior con la lesión. Todo el manipuleo de los hamsters se hizo con guantes quirúrgicos estériles. Se midió el ancho, largo y alto de la lesión con una escala de Vernier. Se tomó nota de si el animal

Cuadro 2

Lista de los hamsters utilizados: Código del paciente del que se inoculó, especie de Leishmania que se les aisló, antigüedad de la lesión, y área de lesión.

CODIGO	ESPECIE	METODO DE DETERMINACION*	ANTIGÜEDAD DE LA LESION	INDICE DEL AREA DE LESION cm ² **
GA-004	L.m	tamaño lesión	401 días	1.31
GA-069	L.m.m	isoenzimas	238	0.33
GA-093-1	L.m	ADN	100	0.03
GA-117	L.m	ADN	132	1.06
GA-136	L.m	ADN	113	1.60
GA-163-1	L.m	ADN	105	8.44
GA-171-1	L.m	tamaño lesión	121	3.61
GA-176-1	L.m.m	isoenzimas	111	3.53
Roedor 48 sitio 5	L.m.m	isoenzimas	99	4.70
GA-040	L.b	ADN	370	0.02
GA-052	L.b	ADN	252	0.12
GA-062	L.b	ADN	304	1.06
GA-063	L.b	tamaño lesión	260	0.05
GA-066	L.b	tamaño lesión	259	0.06
GA-085	L.b.b	isoenzimas	203	0.01
GA-099-1	L.b	ADN	123	0.25
GA-109	L.b	ADN		0.01
GA-127	L.b	ADN	211	1.10
GA-146	L.b.b	isoenzimas	208	0.06
GA-177-4	L.b	tamaño lesión	123	0.01

* Las especies de Leishmania fueron determinadas por tres métodos distintos:
 DNA= Hibridización del DNA del cinetoplasto.
 Isoenzimas= Comparación de enzimas con cepas conocidas.
 Tamaño lesión= El tamaño de la pata lesionada puede indicar la especie de Leishmania.
L. mexicana = 2.0 cm² a los 60 días del inóculo
L. braziliensis = 0.75 cm² a los 60 días del inóculo (Wilson et al. 1979)

** El índice del área de lesión se sacó usando la fórmula $A = r_1 r_2$ donde
 r_1 = radio mayor de la lesión
 r_2 = radio menor de la lesión (Wilson et al. 1979)

L.m.m = Leishmania mexicana mexicana

L.b.b = Leishmania braziliensis braziliensis

presentaba lesiones en otras partes del cuerpo. En caso necesario se rasuró con un bisturí, la pata alrededor de la lesión. Toda la cristalería e instrumentos que se utilizaron fueron esterilizados. Los que no eran desechables, se autoclavearon antes de lavarlos.

El aspirado se hizo inyectando la lesión con solución salina estéril, de fosfatos (PBS). Se usó una jeringa con una aguja de 26. Después de inyectar la solución salina, se volvió a aspirar de la lesión, sin haber retirado la aguja del lugar en que se perforó la piel. De ser necesario, se hicieron varias perforaciones para extraer más líquido, o se aspiraron las gotas que espontáneamente salieron de algún orificio. El contenido de la jeringa se pasó entonces a un tubo plástico. Después de este paso, el aspirado estaba listo para inocular medios de cultivo.

En los primeros hamsters, se inyectó 0.05 ml de PBS en la lesión, pero como se recobraba muy poco líquido, se decidió poner en la jeringa 0.2 ml de PBS, e inyectar la cantidad necesaria para inflar la lesión, y dejar la piel en tensión. Este método fue más eficaz, porque hizo más fácil recobrar el PBS de la lesión, y del interior de la aguja, de donde era difícil hacer bajar las pequeñas gotas de líquido. Al tener un aspirado más abundante, se pudo, incluso, usar una pequeña gota para calcular la concentración de amastigotes presentes.

Para la biopsia, se hizo una incisión con un bisturí. Se hizo un corte longitudinal y varios cortes perpendiculares en las orillas, de forma que pudieran levantarse dos lados de la lesión, como un libro abierto. Del interior de la porción abierta, se cortó uno o más pequeños trozos de tejido, sin incluir piel, y con una pinza se pasaron a una caja petri. Después de este paso, se hicieron tres improntas de lo que quedaba de la lesión, presionando portaobjetos contra el tejido infectado. Los portaobjetos se dejaron secar, se fijaron con metanol absoluto, y se tiñeron durante 15 minutos con colorante de Giemsa, diluido 1:20 en buffer de fosfatos con un pH de 7.2. Se lavaron con el mismo buffer. Por último, el hamster se envolvió en papel de aluminio, y se congeló.

Los pequeños trozos de tejido extraídos de la pata del hamster, se pasaron a un macerador de vidrio, con 1 ml de PBS estéril, y se maceró hasta que no quedó tejido. El líquido se pasó a un tubo de centrifuga, y se aforó a 10 ml con PBS. A continuación se hizo una centrifugación lenta durante 15 minutos a 30g (350 rpm). Se asumió que con esta centrifugación, las células densas y otra materia pesada quedarían en el sedimento, y las células pequeñas y materia liviana quedarían en el sobrenadante. Los amastigotes son de baja densidad y por eso se dice

que no sedimentan a velocidad tan baja. Esto se comprobó al ver ambas partes al microscopio. El sobrenadante entonces se pasó a otro tubo de centrifuga estéril, al que se le hizo una centrifugación rápida durante 15 minutos a 300g (1100 rpm). Se consideró que en este caso, los amastigotes de Leishmania quedarían empacados, lo que se comprobó al ver al microscopio ambas fases. El sobrenadante se separó del sedimento, dejando una pequeña porción de líquido en el tubo. El tubo con el sedimento se agitó bien, y quedó entonces en él la solución concentrada de amastigotes, de la que se tomó una gota para contarlos.

La concentración de amastigotes se calculó usando un hemocitómetro tipo Neubauer (American Optical), observando a 400x, con un microscopio binocular. Los amastigotes se identificaban como células verdosas brillantes, de unos 3 μ de diámetro, con movimiento browniano. Cada uno de los amastigotes vistos en el campo delimitado por el hemocitómetro representa 1×10^4 amastigotes/mililitro. Es importante hacer notar, entonces, que el hemocitómetro tiene su límite inferior de sensibilidad en 1×10^4 amastigotes/mililitro. Una vez conocida la concentración de amastigotes en el sedimento de la segunda centrifugación, se hizo una dilución con PBS, para poder inocular en los medios de cultivo 10 microlitros (μ l) de una solución de

amastigotes de 10^3 amastigotes/ml, en $990 \mu\text{l}$ de fase líquida en el medio, para dejar una concentración final en el tubo inoculado de 1×10^3 amastigotes/ml, idealmente, aunque hubo casos en que el inóculo quedó con más de 1×10^3 , pero siempre menor que 1×10^4 .

D. Preparación de los medios de cultivo:

El medio de cultivo que se escogió fue el de Evans. La preparación del medio se puede hacer en dos etapas: primero puede prepararse el agar base, que puede mantenerse refrigerado y estéril, y el día en que se necesitan los medios, se vuelve a fundir la base y se enriquece con sangre defibrinada.

En este trabajo se compara el crecimiento de la Leishmania en medio enriquecido con sangre de conejo y el mismo medio enriquecido con sangre de caballo. Tanto la sangre de conejo como la de caballo se extrajeron del animal, y se desfibrinaron agitando con perlas de vidrio. La sangre de conejo se extrajo directamente del corazón y la del caballo de la yugular. Los medios que se prepararon se hicieron con sangre de tres conejos distintos, y dos caballos distintos. Los medios fueron debidamente identificados para poder comparar los resultados no solamente entre conejos y caballos, sino dentro de miembros de la misma especie. Los conejos utilizados fueron

conejos albinos del laboratorio del MERTUG. El conejo (a) murió durante la extracción de la sangre. Los caballos utilizados son caballos de carreras, de raza inglesa pura sangre. Se aplicó el tratamiento de Evans (1984) a la sangre de caballo, que fue defibrinada y luego inactivada en un baño de María a 56°C durante media hora. La sangre de conejo solamente fue defibrinada.

El medio de Evans tiene la siguiente composición: 3.0g de Extracto de res (oxid Lab-Cemco L319), 5.0 g Peptona bacteriológica (oxid L293), 8.0 g de NaCl (Sigma Chem. Compounds L24F-0065), 10.0 g de Agar purificado (Difco) y 1 lt. de agua destilada.

La sangre se agregó al medio fundido antes de que se enfriara, de forma que quedara un 20% de sangre en el volumen total. Después de haber agregado la sangre al medio, se pusieron alícuotas de 2ml en tubos de ensayo 13 x 100 con tapadera de rosca, y se inclinaron en una grilla para medios inclinados, hasta que se solidificaron. Los medios se dejaron durante 48 horas a 26°C para probar su esterilidad. Los medios que aparecieron contaminados en esta etapa, se descartaron. Los medios, entonces, se refrigeraron a 4°C hasta el día de su inoculación.

El día en que se hizo la inoculación, se agregó el sobrenadante o fase líquida, la solución de Schneider, cuya fórmula es: 79 ml de Medio de Schneider (Gibco), 20.0 ml

de Suero Bovino Fetal (FCS)(Gibco) inactivado en baño de María a 56°C durante media hora, y 1.0 ml de Antibióticos (Penicilina-Amikacina, conc. final de c/uno = 100 mg/ml); Penicilina (Pfizer Pfipharmecs), y Amikacina (Sigma Chemical Company L 26F - 0442).

E. Inoculación de los medios de cultivo:

En el caso de la biopsia, se inoculó la dilución preparada después de la concentración por centrifugación.

El aspirado fue inoculado tal como salió de la jeringa con que se extrajo. Cuando se modificó el método de hacer el aspirado, como se indicó previamente, fue posible verificar con un hemocitómetro, que el inóculo final no fue mayor de 1×10^4 . La inoculación de los tubos se hizo con una micropipeta, usando puntas esterilizadas. En resumen, como puede verse en la figura 3, de cada hamster se hizo un aspirado y una biopsia, con los cuales se inocularon medios de Evans conteniendo sangre de conejo o de caballo, con réplicas.

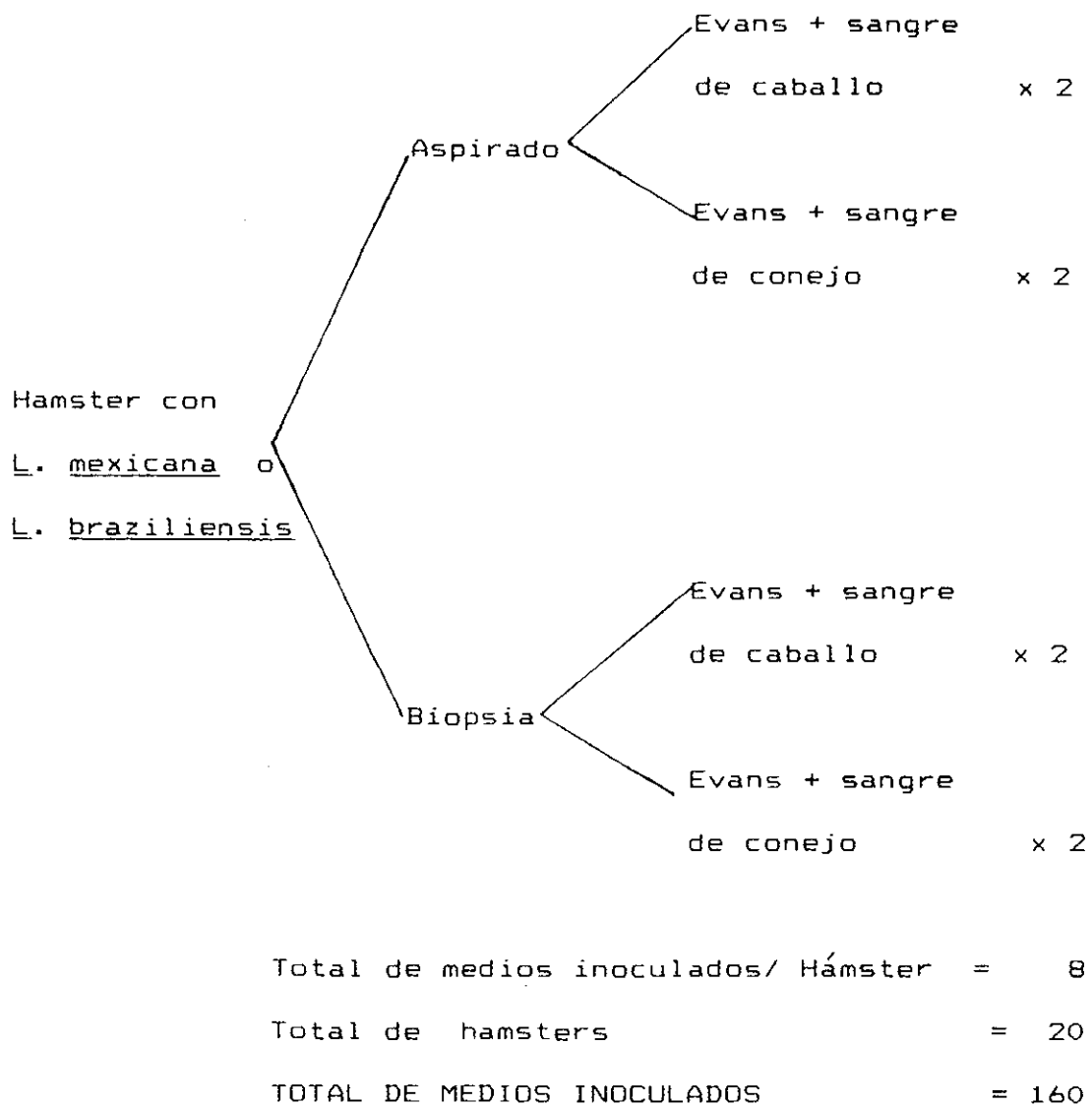


Figura 3

Número de medios de cultivo inoculados para cada tratamiento aplicado.

F. Observación de los cultivos. Curvas de crecimiento:

Los medios de cultivo se mantuvieron a una temperatura que osciló entre los 22 y 26°C.

Una pequeña gota de cada medio de cultivo se observó bajo el microscopio, en el hemocitómetro, a partir del día 3 después de inoculado el medio, y por lo menos cada tres días a partir de ese día, aunque se trató de hacerlo diariamente durante los días de crecimiento logarítmico. De esta forma, se tuvo el dato de la concentración de Leishmania en la fase líquida de cada tubo, por lo menos cada tres días, hasta que la concentración de parásitos bajaba de 10^6 , antes de descartar el medio de cultivo. En muchos casos, se siguió observando el medio, hasta que la concentración era menor de 10^4 promastigotes/ml, es decir, cuando ya no se podía ver ningún promastigote vivo en el campo marcado en el hemocitómetro. En este caso, el cultivo se consideraba "muerto", aunque podía tener aun entre 0 y 9,999 promastigotes/ml. Se contaron sólo los promastigotes considerados "viables", con el flagelo en movimiento.

Los medios que presentaron contaminación por hongos o bacterias también fueron descartados. Se anotó la presencia de artefactos extraños en el medio de cultivo.

Para hacer la determinación de la concentración de

promastigotes/ml en el medio, fue necesario hacer diluciones del sobrenadante cuando el número de organismos se iba incrementando.

Como se mencionó anteriormente, cada organismo que se ve en el hemocitómetro, representa a 1×10^4 promastigotes/ml. Si se ven 6 promastigotes en total, quiere decir que hay 6×10^4 promastigotes/ml. Al verse 10 promastigotes en el campo, hay $10 \times 10^4 = 1 \times 10^5$. En otras palabras cuando en el hemocitómetro se ven entre:

1 y 9	promastigotes,	el cultivo se mantiene en	10^4
10 y 99	"	"	10^5
100 y 999	"	"	10^6
1000 y 9999	"	"	10^7
10000 y 99999	"	"	10^8

Se consideró que era factible ver fácilmente hasta 100 promastigotes en movimiento en el campo delimitado por el hemocitómetro, o sea en concentraciones de 10^4 y 10^5 , pero a partir de 10^6 es cada vez mas difícil hacer el conteo y que salga exacto. Por esta razón, cuando se llegaban a ver mas de 100 promastigotes en el campo, se hacían diluciones. Para concentraciones de 10^6 se hicieron diluciones de $10 \mu\text{l}$ de sobrenadante en $100 \mu\text{l}$ de PBS. Para las de 10^7 y 10^8 se hicieron diluciones de $10 \mu\text{l}$ de sobrenadante en $1000 \mu\text{l}$ de PBS. En ambos casos se contaron los promastigotes y luego se multiplicó por el factor de

corrección necesario.

G. Pruebas estadísticas:

Se aplicó la prueba de Chi-cuadrado a los porcentajes de positividad. A las curvas de crecimiento se les aplicó un análisis de varianza trifactorial, y una prueba de Tukey, a ciertos días y puntos claves de la curva.

III. RESULTADOS

Se presentan dos secciones principales: la primera presenta todas las consideraciones sobre el éxito de "colonización" de Leishmania sobre su medio (positividad). La segunda sección trata sobre su crecimiento posterior en los medios de cultivo (curvas de crecimiento).

A. Porcentajes de positividad y negatividad:

No hubo crecimiento en todos los medios inoculados. En algunos hubo contaminación de bacterias, en otros contaminación por hongos, y otro grupo de tubos nunca presentó crecimiento aunque el medio se conservó limpio. Al conjunto de tubos contaminados y sin crecimiento se les llamó negativos. Se consideró positivos a los medios con Leishmania viables (con movimiento flagelar), y sin contaminación.

- Porcentaje de positividad por cepas:

De las veinte cepas de Leishmania con que se trabajó, se logró crecimiento en los medios de cultivo, de dieciocho de ellas, o sea un 90% de positividad.

- Porcentaje de positividad para el total de tubos:

Se inocularon 8 tubos con cada cepa, haciendo un total

Cuadro 3

Frecuencias y porcentajes de positividad de Leishmania en
improntas y medios de cultivo, a partir de una cepa.

CODIGO	IMPRONTA	TUBOS+	T U B O S -			TOTAL	
			B	Ho	N		
<u>Leishmania mexicana</u>							
GA-004		0	1		7	8	
GA-069	+	7			1	8	
GA-093-1	-	6	2			8	
GA-117	+	7		1		8	
GA-136	+	7		1		8	
GA-163-1	+	8				8	
GA-171-1	-	6		2		8	
GA-176-1	+	5	1	2		8	
Roedor 48 sitio 5	-	8				8	
<u>Leishmania braziliensis</u>							
GA-040	-	7		1		8	
GA-052		3		3	2	8	
GA-062	-	8				8	
GA-063		0		1	7	8	
GA-066	+	1		2	5	8	
GA-085	+	1	1		6	8	
GA-099-1	+	8				8	
GA-109	-	6		1	1	8	
GA-127	+	8				8	
GA-146	+	1		5	2	8	
GA-177-4	-	3		3	2	8	
TOTAL		10/16	100	5	22	33	160
PORCENTAJE		62	62	3	14	21	100

B = bacterias Ho = hongos N = Ningún crecimiento

de 160 medios, de los cuales 100 fueron positivos y 60 negativos repartidos en las tres categorías antes mencionadas. Esto hace un porcentaje de positividad de 62%. El cuadro 3 presenta las frecuencias y los porcentajes de positividad y negatividad, para cada cepa utilizada. Las improntas que se hicieron sobre las heridas de los hamsters, también presentaron un 62% de positividad (Cuadro 3).

En la figura 4 pueden verse las frecuencias y porcentajes del total de tubos positivos y negativos, y cómo se repartieron viendo desde el punto de vista de una u otra variable. Los valores exactos que corresponden a esta gráfica, pueden verse en el cuadro 4.

En la figura 4 (p48) se representó el total de tubos (160), con una barra. Esta barra se divide básicamente en cultivos positivos y cultivos negativos, que incluyen los contaminados por hongos y bacterias (B), y los que nunca presentaron crecimiento. Luego se hicieron más subdivisiones en la misma barra, para visualizar la distribución de los cultivos desde el punto de vista de cada variable, o combinación de variables.

En la barra del Total, se ve que más de la mitad de los medios (62%), fueron colonizados con éxito por Leishmania. De los tubos negativos, los más numerosos fueron los que nunca presentaron crecimiento, seguidos por los

contaminados por hongos, y por último, una pequeña cantidad contaminados por bacterias.

Cualquiera de los tratamientos aplicados, o la interacción de varios a la vez, pudo favorecer el crecimiento de Leishmania en el medio. Se aplicó la prueba de Chi-cuadrado (X^2) a las distribuciones por variables, para los cultivos positivos y negativos. Los resultados de esta prueba están en el Cuadro 5. Con la contaminación de bacterias no se hicieron pruebas estadísticas, por tratarse de sólo cinco tubos (Cuadro 4).

En la segunda barra (figura 4), puede verse que L. mexicana tuvo más medios positivos (75%) que L. braziliensis (52%). Hubo 25 medios de L. braziliensis (28%) que nunca mostraron crecimiento, contra 8 tubos sin crecimiento (11%) para L. mexicana. El número de tubos negativos, especialmente los negativos sin crecimiento, presentaron diferencias debidas a la especie (Cuadro 5). L. braziliensis tuvo una positividad (capacidad de colonización) menor que L. mexicana ($p < 0.025$).

La barra siguiente de la figura 4 representa los mismos tubos, pero distribuidos según otra variable, la del método de muestreo. El aspirado y la biopsia presentaron frecuencias muy parecidas, tanto para medios positivos (51 y 49 tubos) como para medios sin crecimiento (16 y 17 tubos) y contaminados (13 y 14 tubos). No hubo diferencias

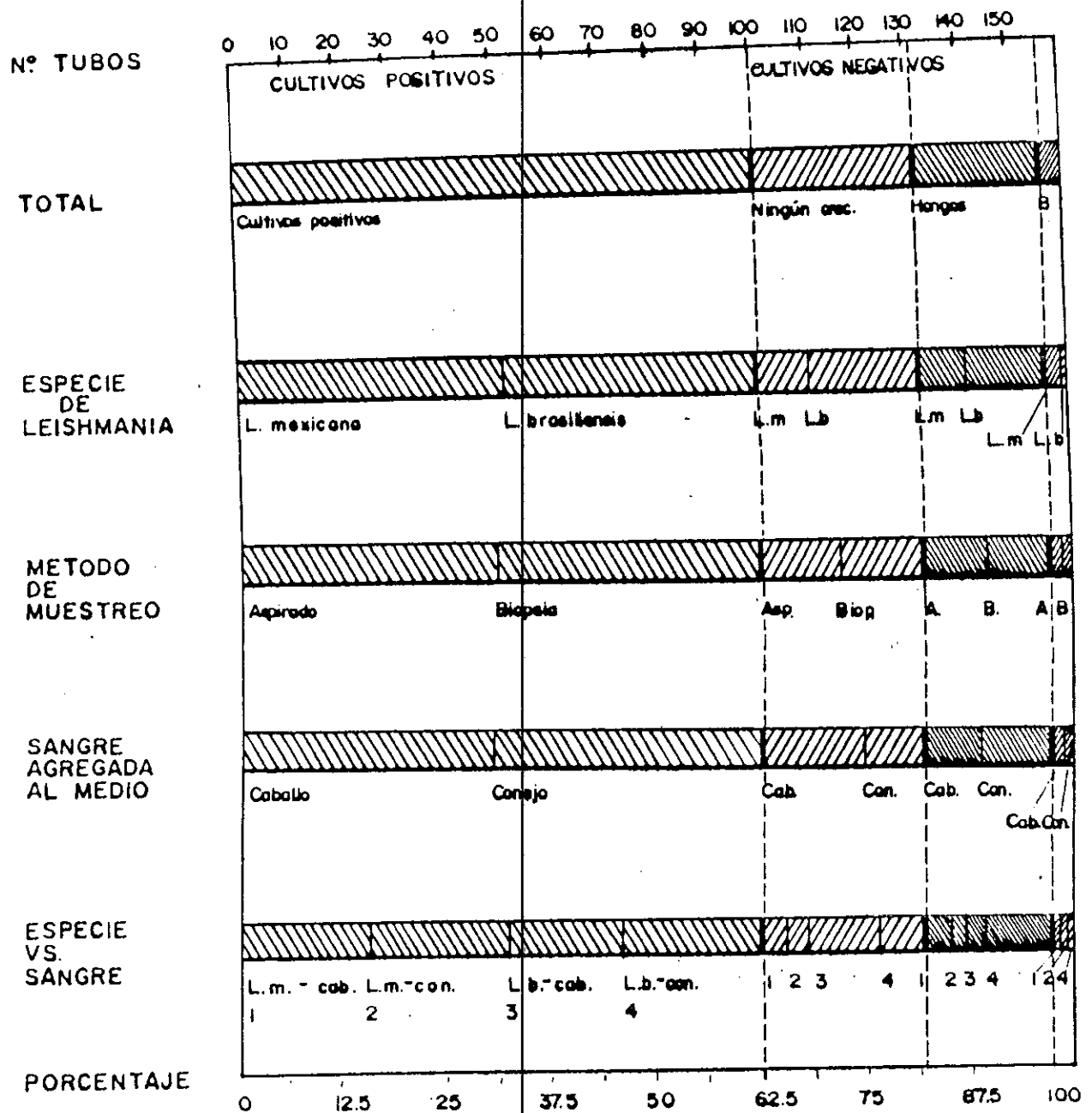
significativas al comparar aspirado con biopsia (Cuad.5).

Al ver la barra para la variable de sangre utilizada en el medio (Figura 4), puede notarse que también tienen frecuencias parecidas, excepto que más medios con sangre de caballo no presentaron crecimiento (21 tubos vs 12 tubos), y más medios con sangre de conejo se contaminaron con hongos (13 tubos vs 9 tubos). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas (Cuadro 5).

Dado que los aspirados y las biopsias se distribuyeron de una forma tan parecida, se quiso ver la distribución de los medios con la combinación de las otras dos variables: especie de Leishmania con tipo de sangre en el medio. En esta nueva distribución (última barra de la figura 4), los cultivos positivos no presentaron diferencias significativas (cuadro 5). Sin embargo, entre los negativos sin crecimiento, los medios inoculados con L. braziliensis con sangre de caballo presentaron frecuencias mayores que las demás combinaciones de especie y sangre en el medio ($p < 0.025$).

Los medios que más se contaminaron con hongos fueron los de L. braziliensis con sangre de conejo (25%). Los medios que menos se contaminaron fueron los de L. mexicana con sangre de conejo (6%). La diferencia entre estos extremos fue significativa ($p < 0.05$), pero no con los grupos intermedios (Cuadro 5).

FRECUENCIAS Y PORCENTAJES DE CRECIMIENTO Y CONTAMINACION DE LOS CULTIVOS DE LEISHMANIA PARA CADA VARIABLE Y PARA EL TOTAL



Cuadro 4

Frecuencias y porcentajes de positividad y negatividad de los medios de cultivo inoculados con Leishmania, para las variables, combinaciones de variables y el total.

VARIABLE	TUBOS +		T U B O S -				TOTAL
			B	Ho	N	Total-	
	f	%*	f %	f %	f %	f %	
Total	100	62	5 3	22 14	33 21	60 38	160
Especie							
L. mexicana	54	75	4 6	6 8	8 11	18 25	72
<u>L. braziliensis</u>	46	52	1 2	16 18	25 28	42 48	88
Método de muestreo							
Aspirado	51	64	2 2	11 14	16 20	29 36	80
Biopsia	49	61	3 4	11 14	17 21	31 39	80
Sangre en el medio							
Caballo	48	60	2 2	9 11	21 27	32 40	80
Conejo	52	65	3 4	13 16	12 15	28 35	80
Especie x Sangre							
L.m - Caballo	26	72	2 6	4 11	4 11	10 28	36
L.m - Conejo	28	78	2 6	2 6	4 10	8 22	36
L.b - Caballo	22	50	0 0	5 11	17 39	22 50	44
L.b - Conejo	24	54	1 2	11 25	8 19	20 46	44

B = Bacterias Ho = Hongos N = Ningún crecimiento
 f = Frecuencia L.m = L. mexicana L.b = L. braziliensis

* Los porcentajes se refieren al total de la columna final. Por ejemplo, para 72 tubos inoculados con L. mexicana, el 75% fueron positivos, y el 25% restante fue negativo, repartido así: 6% contaminado con bacterias, 8% contaminado con hongos y 11% sin crecimiento alguno.

Cuadro 5

Resultados de la prueba de Chi-cuadrado aplicada a las frecuencias de medios de cultivo positivos y negativos, inoculados con Leishmania

ASPECTO EVALUADO	VARIABLE(S)	X ² **	GL	p
CULTIVOS POSITIVOS	Especie	3.246	1	0.050 < p < 0.100
	Método	0.050	1	0.750 < p < 0.900
	Sangre	0.090	1	0.750 < p < 0.900
	Esp x Sangre	5.724	3	0.050 < p < 0.100
CULTIVOS NEGATIVOS				
TOTAL	Especie	5.532*	1	0.010 < p < 0.025
	Método	0.092	1	0.750 < p < 0.900
	Sangre	0.283	1	0.500 < p < 0.750
	Esp x Sangre	5.724	3	0.050 < p < 0.100
Sin crecimiento	Especie	5.860*	1	0.010 < p < 0.025
	Método	0.061	1	0.750 < p < 0.900
	Sangre	1.572	1	0.100 < p < 0.250
	Esp x Sangre	10.208*	3	0.005 < p < 0.010
	1 o 2 vs 3	5.868*	1	0.010 < p < 0.025
	1 o 2 vs 4	0.791	1	0.250 < p < 0.500
	1 vs 2	0.125	1	0.500 < p < 0.750
3 vs 4	3.280	1	0.050 < p < 0.100	
Hongos	Especie	2.911	1	0.050 < p < 0.100
	Método	0.045	1	0.750 < p < 0.900
	Sangre	0.773	1	0.500 < p < 0.750
	Esp x Sangre	6.500	3	0.050 < p < 0.100
	1 vs 2	0.833	1	0.500 < p < 0.750
	1 vs 3	0.116	1	0.500 < p < 0.750
	1 vs 4	2.178	1	0.100 < p < 0.250
	2 vs 3	0.974	1	0.250 < p < 0.500
	2 vs 4	4.804*	1	0.025 < p < 0.050
3 vs 4	2.312	1	0.100 < p < 0.250	

* Dato estadísticamente significativo

** A las pruebas con GL=1 se les aplicó Corrección de Yates.

Especie = Efecto de la especie de Leishmania inoculada.

Método = Efecto del método de muestreo de la lesión.

Sangre = Efecto de la sangre agregada al medio.

Esp x Sangre = Efecto de la interacción de las variables especie y sangre:

1 = L. mexicana - Sangre de caballo

2 = L. mexicana - Sangre de conejo

3 = L. braziliensis - Sangre de caballo

4 = L. braziliensis - Sangre de conejo

B. Curvas de crecimiento:

Esta sección presenta los resultados del desarrollo de los organismos (curvas de crecimiento) en los medios de cultivo. Sólo se toman en cuenta los 100 cultivos positivos.

Se tenían datos para varios días de las curvas de crecimiento, pero para la estadística se usaron solamente ciertos puntos claves. Se consideró de suma importancia conocer el pico máximo de crecimiento, para saber si alguna de las variables facilitaba que los organismos alcanzaran una mayor concentración que los demás. Al mismo tiempo, se comparó el número de días que transcurrían para llegar al pico máximo de crecimiento, pues para ciertos trabajos de laboratorio, como el diagnóstico inicial de un paciente, interesa más un crecimiento rápido para ver en cuantos días es posible ver organismos $> 10^4$, que el máximo de crecimiento. Con esto en mente, también se analizó estadísticamente el número de días que tardó el cultivo en llegar a 10^4 promastigotes/ml, por ser una cantidad en que con toda confianza se puede considerar un cultivo positivo. Por otro lado, para mantener las cepas después del diagnóstico, se prefiere un medio que dure en buenas condiciones el mayor tiempo posible antes de tener que hacer un pase. Para evaluar la durabilidad de los medios utilizados, se contaron los días que estuvo el cultivo con una

concentración de promastigotes mayor de 10^6 .

A los tubos positivos se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) trifactorial. Esta prueba permitió comparar el efecto de las tres variables (especie de Leishmania, método de obtención de la muestra, y sangre utilizada en el medio), tomándolas individualmente, y en combinaciones de dos o tres variables a la vez (Cuadro 6). En el cuadro 7, se resumieron los aspectos en los que se dieron diferencias significativas. Es de señalar que el método de muestreo: aspirado o biopsia, nunca mostró diferencias significativas, por lo menos para los aspectos que se evaluaron. El tipo de sangre agregado al medio solamente mostró diferencias significativas en cuanto al pico máximo. Los medios con sangre de conejo llegaron a concentraciones máximas mayores que los de sangre de caballo.

La mayor cantidad de diferencias significativas se encontraron entre las especies: L. mexicana y L. braziliensis. Tanto el número de días para alcanzar una concentración de 10^6 promastigotes/ml, como el número de días para llegar al pico máximo, dan una idea de rapidez de crecimiento. En ambos casos L. mexicana tuvo un crecimiento más rápido que L. braziliensis. El número de días con una concentración mayor que 10^6 promastigotes/ml, da una idea de durabilidad. En este caso fue L. braziliensis la especie que duró casi 4 días más que L. mexicana.

Cuadro 6

Resultados del ANDEVA trifactorial (especie x método de muestreo x sangre) para el pico máximo de crecimiento, # de días para alcanzar el pico, # de días para llegar a 10^6 promastigotes/ml, y # de días sobre 10^6 promastigotes/ml.

PICO MAXIMO PROMASTIGOTES/ML					
Fuente de variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif. de F
Efectos principales	2.18×10^{13}	3	7.26×10^{12}	4.143	0.008*
Especie	1.74×10^{12}	1	1.74×10^{12}	0.993	0.322
Método de Muestreo	2.43×10^{12}	1	2.43×10^{12}	1.384	0.242
Sangre	1.69×10^{13}	1	1.69×10^{13}	9.625	0.003*
Interacciones dobles	2.74×10^{12}	3	9.13×10^{11}	0.521	0.669
Especie-Método	9.20×10^9	1	9.20×10^9	0.005	0.942
Especie-Sangre	1.14×10^{11}	1	1.14×10^{11}	0.065	0.799
Método-Sangre	2.59×10^{12}	1	2.59×10^{12}	1.476	0.228
Interaccion. triples	1.73×10^{12}	1	1.73×10^{12}	0.987	0.323
Esp-Método-Sangre	1.73×10^{12}	1	1.73×10^{12}	0.987	0.323
Error explicado	2.62×10^{11}	7	3.75×10^{10}	2.140	0.047*
Error residual	1.61×10^{14}	92	1.75×10^{12}		
Error total	1.87×10^{14}	99	1.89×10^{12}		
# DE DIAS PARA LLEGAR AL PICO MAXIMO					
Efectos principales	1602.753	3	534.251	9.946	0.000*
Especie	1471.709	1	1471.709	27.398	0.000*
Método de Muestreo	84.131	1	84.131	1.566	0.214
Sangre	25.974	1	25.974	0.484	0.489
Interacciones dobles	245.171	3	81.724	1.521	0.214
Especie-Método	50.656	1	50.656	0.943	0.334
Especie-Sangre	9.821	1	9.821	1.283	0.670
Método-Sangre	184.006	1	184.006	3.426	0.067
Interaccion. triples	0.054	1	0.054	0.001	0.975
Esp-Método-Sangre	0.054	1	0.054	0.001	0.975
Error explicado	1847.978	7	263.997	4.915	0.000*
Error residual	4941.862	92	53.716		
Error total	6789.840	99	68.584		

Cuadro 6 (Cont.)

# DE DIAS PARA LLEGAR A 10 ⁶ PROMASTIGOTES/ML					
Fuente de variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif. de F
Efectos principales	565.093	3	188.364	8.786	0.000*
Especie	564.435	1	564.435	26.328	0.000*
Método de muestreo	0.137	1	0.137	0.006	0.936
Sangre	0.038	1	0.038	0.002	0.937
Interacciones dobles	31.594	3	10.531	0.491	0.689
Especie-Método	15.790	1	15.790	0.737	0.393
Especie-Sangre	17.440	1	17.440	0.813	0.369
Método-Sangre	0.000	1	0.000	0.000	0.999
Interaccion. triples	23.943	1	23.943	1.117	0.293
Esp-Método-Sangre	23.943	1	23.943	1.117	0.293
Error explicado	620.631	7	88.662	4.136	0.001*
Error residual	1972.359	92	21.439		
Error total	2592.990	99	26.192		
# DE DIAS SOBRE 10 ⁶ PROMASTIGOTES/ML					
Efectos principales	457.495	3	152.498	2.369	0.076
Especie	355.919	1	355.919	5.529	0.021*
Método de Muestreo	1.273	1	1.273	0.020	0.888
Sangre	100.752	1	100.752	1.565	0.214
Interacciones dobles	117.039	3	39.013	0.606	0.613
Especie	65.638	1	65.638	1.020	0.315
Método de Muestreo	2.769	1	2.769	0.043	0.836
Sangre	47.508	1	47.508	0.738	0.393
Interaccion. triples	223.552	1	223.552	3.473	0.066
Esp-Método-Sangre	223.552	1	223.552	3.473	0.066
Error Explicado	798.086	7	114.012	1.771	0.103
Error residual	5922.664	92	64.377		
Error total	6720.750	99	67.886		

* = Estadísticamente significativo

Especie = Efecto de especie: L. braziliensis vs L. mexicana

Método de Muestreo = Efecto del método de obtención de la muestra: aspirado vs biopsia.

Sangre = Efecto de la sangre agregada al medio: caballo vs conejo

Cuadro 7

Resumen de los resultados significativos del ANDEVA trifactorial (Cuadro 6).

PARAMETRO	RESULTADOS SIGNIFICATIVOS	P	PROMEDIOS
Pico máximo de crecimiento	Medios con sangre de conejo llegaron a mayores concentraciones que medios con sangre de caballo	0.008	Conejo = 1.55×10^8 promastigotes/ml Caballo = 7.08×10^7 promastigotes/ml
Número de días para llegar al pico máximo	<u>L. braziliensis</u> tardó más en llegar a su máximo que <u>L. mexicana</u>	0.000	<u>L. braziliensis</u> = 18.22 días <u>L. mexicana</u> = 10.48 días
Número de días para llegar a 10^6 promastigotes/ml	<u>L. braziliensis</u> tardó más que <u>L. mexicana</u>	0.000	<u>L. braziliensis</u> = 9.07 días <u>L. mexicana</u> = 4.30 días
Número de días sobre 10^6 promastigotes/ml	<u>L. braziliensis</u> duro más que <u>L. mexicana</u>	0.021	<u>L. braziliensis</u> = 23.7 días <u>L. mexicana</u> = 19.91 días

Ninguna interacción de dos o tres variables mostró diferencias significativas.

Dado que sólo las variables actuando independientemente mostraron diferencias significativas, sólo se hicieron las curvas de crecimiento que les corresponden. Para hacerlo se decidió poner en la curva el punto máximo promedio de crecimiento para la variable, en el número de días promedio que tardó en llegar al pico. Además, se hicieron las medias y las medianas de los días 3, 7, 14, 21, 28, 35, y 42 de crecimiento.

La razón para usar estas dos medidas de tendencia central se debe a que tanto al inicio de las curvas de crecimiento como al final, se daban valores "negativos", es decir, menores de 1×10^4 promastigotes/ml. En realidad, no podía saberse si había 0 o hasta 9,999 organismos/ml. En el inicio de las curvas de crecimiento, es obvio que el número de organismos no era 0, puesto que a los pocos días los organismos se podían detectar con el hemocitómetro, y seguían su crecimiento logarítmico. Por esta razón, en las medias se utilizó 1×10^3 como cantidad representativa de los tubos "negativos". Esta cantidad se eligió al azar, como pudo elegirse cualquier otra entre 0 y 9,999. Con este criterio, se calcularon las medias, desviación estándar y error estándar para los días mencionados, y se hicieron las gráficas.

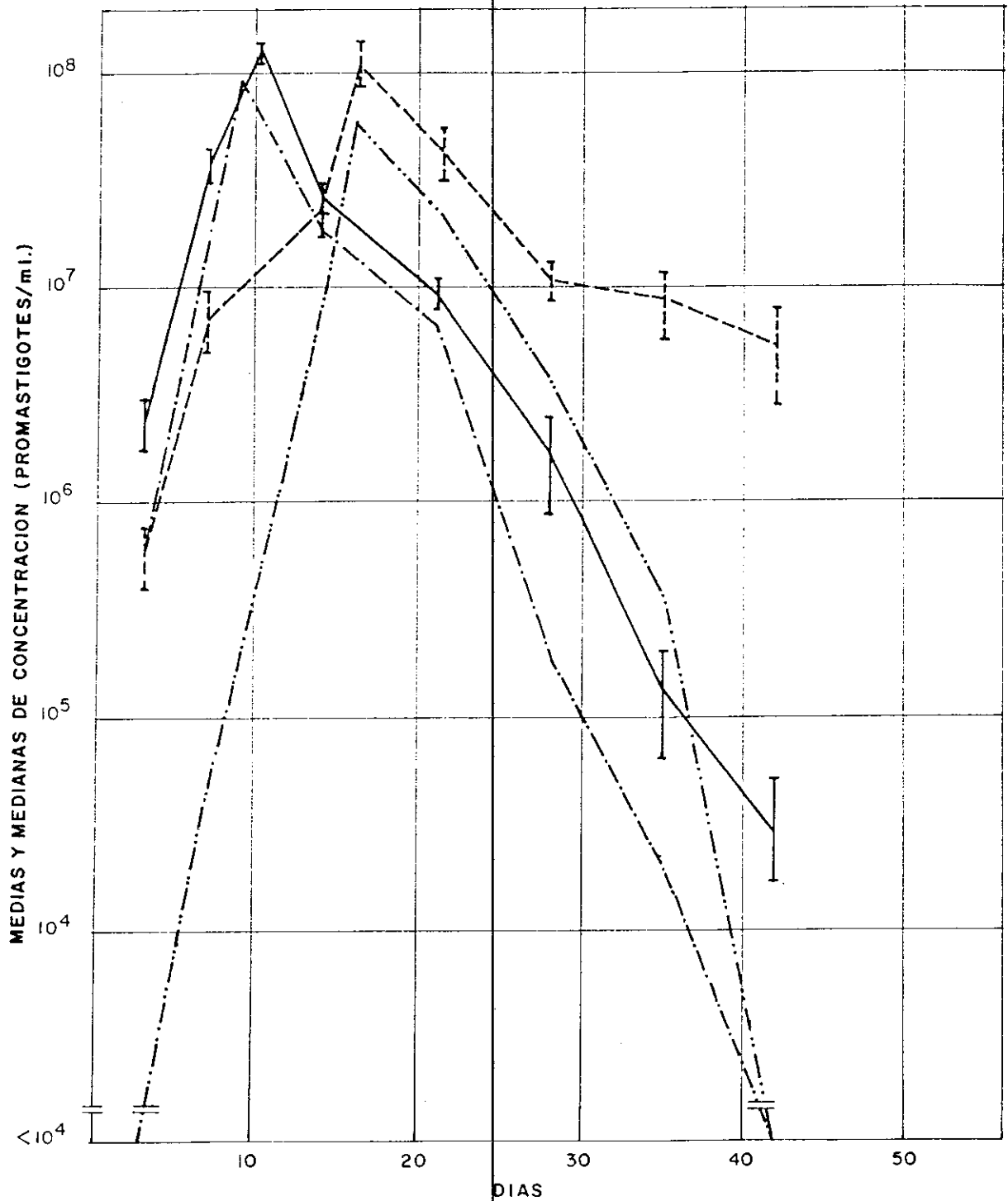
Para evitar el error, que seguramente se cometió al usar una cantidad fija con los tubos "negativos" e incluirla en la media, se ubicó la mediana de los valores de crecimiento, y se hicieron las gráficas respectivas.

En la Figura 5 se pueden ver las curvas de crecimiento para la primera variable: especie. Las líneas que contienen puntitos, corresponden a las curvas trazadas con base en medianas. Puede verse que las dos líneas de las medianas no alcanzan valores tan altos como los de las medias, pero en general siguen el mismo patrón. Tanto la curva de L. mexicana como la de L. braziliensis se parecen, pero la de L. braziliensis esta desfasada unos siete días respecto de la de L. mexicana, lo que concuerda con los resultados de la estadística, sobre número de días para llegar a 10^6 , al pico máximo, y número de días sobre 10^6 (Cuadros 6 y 7).

En la Figura 6 estan las curvas de crecimiento para la segunda variable: método de obtención de la muestra. En el análisis estadístico no hubo ninguna diferencia significativa (Cuadro 6) entre aspirado y biopsia. Esto se confirma con esta figura, donde los picos máximos están muy cercanos, y el resto de las líneas se entrecruzan repetidamente. En este caso las medianas se parecen entre sí, y las medias también se parecen entre sí.

En la Figura 7 se pueden ver las curvas de crecimiento

**CURVAS DE CRECIMIENTO IN VITRO DE
LEISHMANIA MEXICANA Y L. BRAZILIENSIS
EN MEDIO DE EVANS**

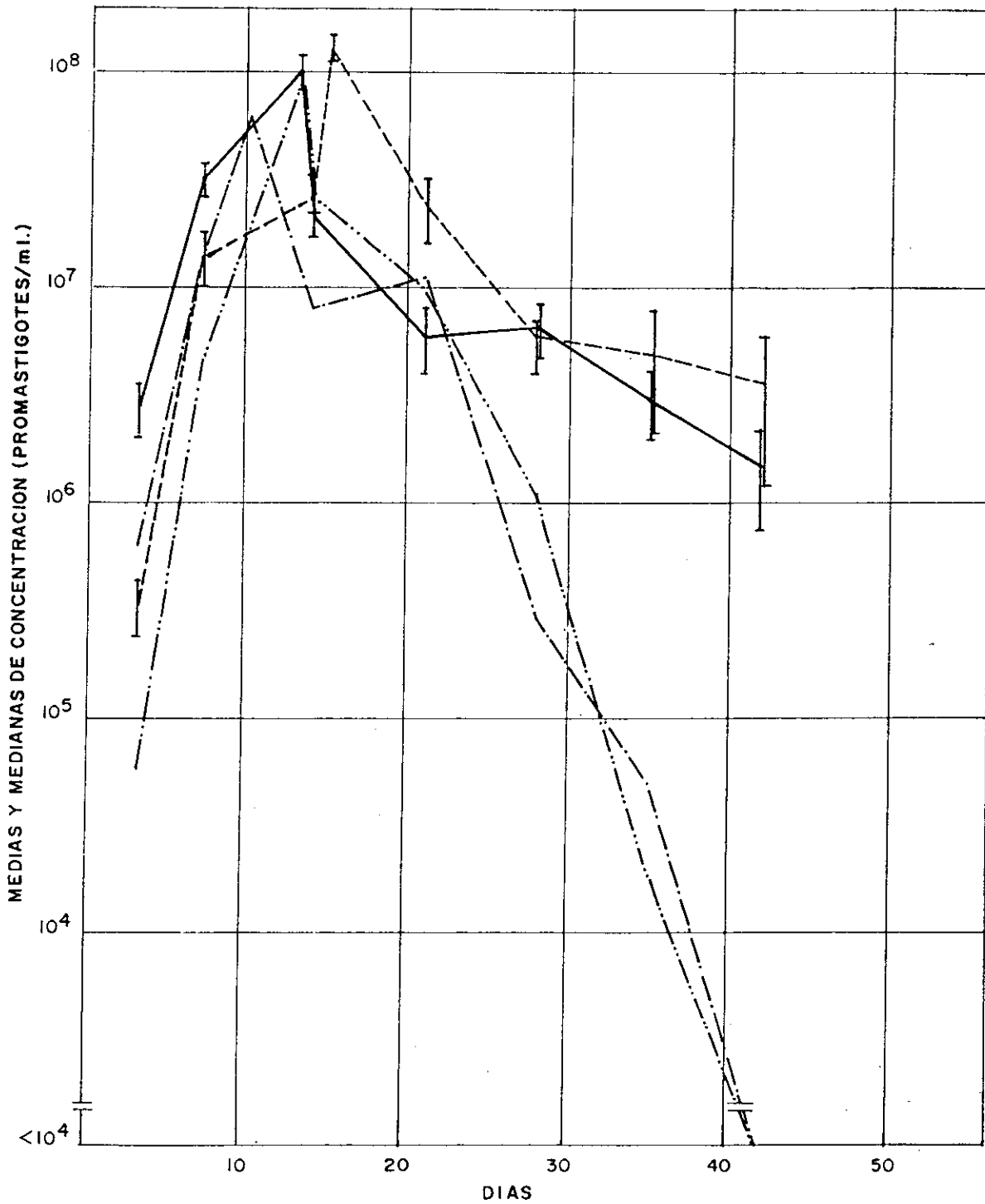


SIMBOLOGIA

- L.m.m (MEDIA) ± ERROR STANDARD
- L.b.b (MEDIA) ± ERROR STANDARD
- · - · - L.m.m (MEDIANA)
- · · · · L.b.b (MEDIANA)

- L.m.m = LEISHMANIA MEXICANA MEXICANA
- L.b.b. = LEISHMANIA BRAZILIENSIS BRAZILIENSIS

**CURVAS DE CRECIMIENTO IN VITRO DE
LEISHMANIA**
A PARTIR DE AMASTIGOTES TOMADOS DE LA PATA DE UN
HAMSTER POR ASPIRADO O POR BIOPSIA.



SIMBOLOGIA

- | | | | | |
|-----------|-----------------|---|----------------|-----------------|
| — | ASP. (MEDIA) | ⊕ | ERROR STANDARD | ASP. = ASPIRADO |
| - - - | BIOP. (MEDIA) | ⊕ | ERROR STANDARD | BIOP. = BIOPSIA |
| - · - · - | ASP. (MEDIANA) | | | |
| - · · · - | BIOP. (MEDIANA) | | | |

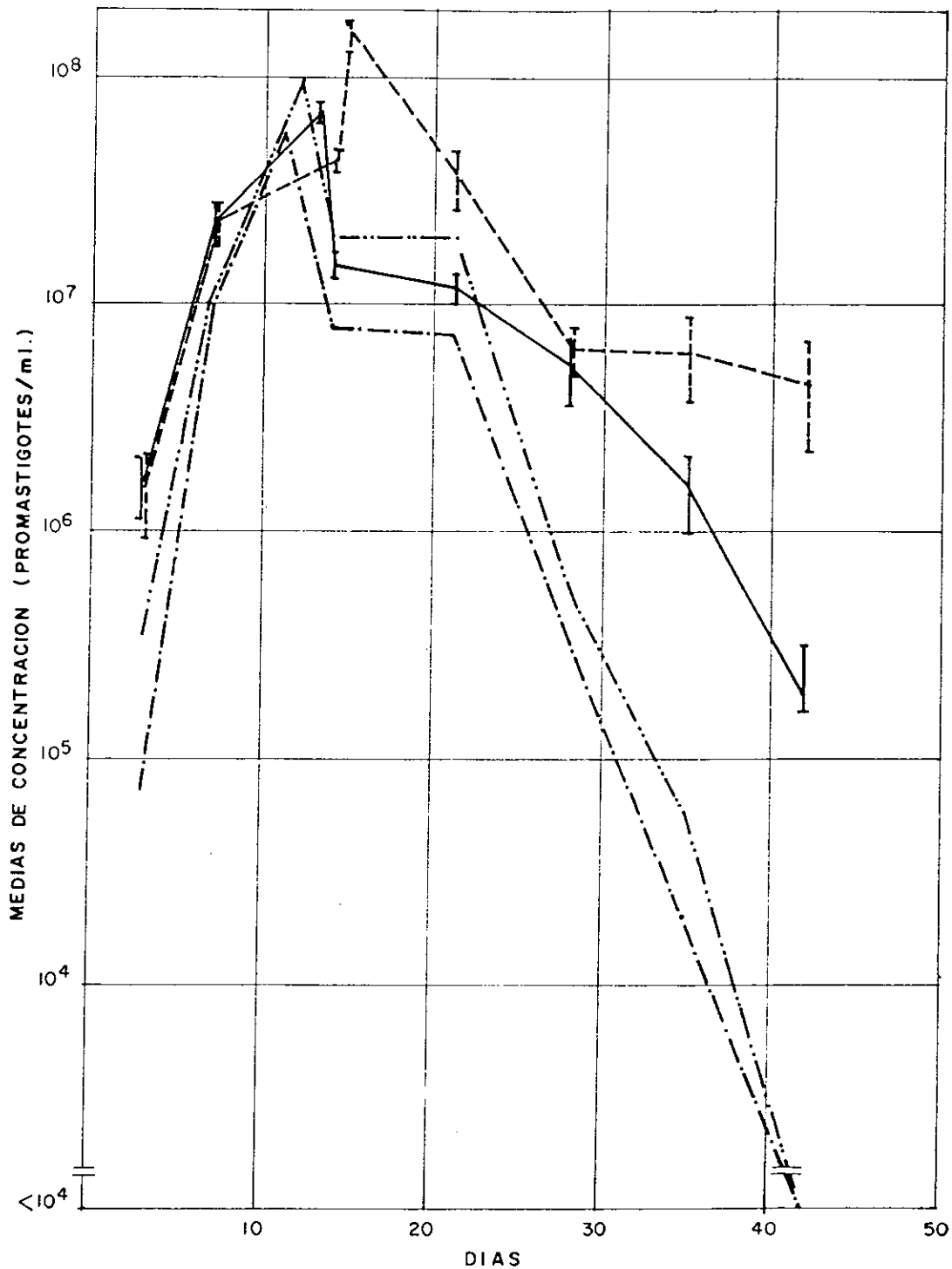
para la tercera variable: tipo de sangre agregada al medio. Estadísticamente estas curvas no tienen una diferencia significativa, excepto por el pico máximo ($p < 0.008$). Los medios enriquecidos con sangre de conejo llegaron a concentraciones máximas significativamente mayores que los medios enriquecidos con sangre de caballo. En efecto, puede verse tanto para las medianas como para las medias, que la curva de los medios enriquecidos con sangre de caballo va siempre abajo de la de sangre de conejo.

Dado que las únicas dos variables que parecieron afectar el crecimiento de Leishmania fueron la especie y el tipo de sangre agregado al medio, se decidió agregar una figura con las curvas de crecimiento de la combinación de las dos variables, aunque estas interacciones no mostraron diferencias significativas (Cuadro 6). La figura 8 muestra las medias, y la figura 9 las medianas. En esta figura en especial se ve el desfasamiento del crecimiento que hubo al inicio entre L. mexicana y L. braziliensis, y el pico siempre mayor de los medios enriquecidos con sangre de conejo, respecto de los enriquecidos con sangre de caballo.

Comparación de donadores de sangre:

Como se mencionó con anterioridad, al hacer los medios con sangre de conejo o caballo, se pensó en comparar no sólo conejo vs. caballo, sino entre los tres conejos

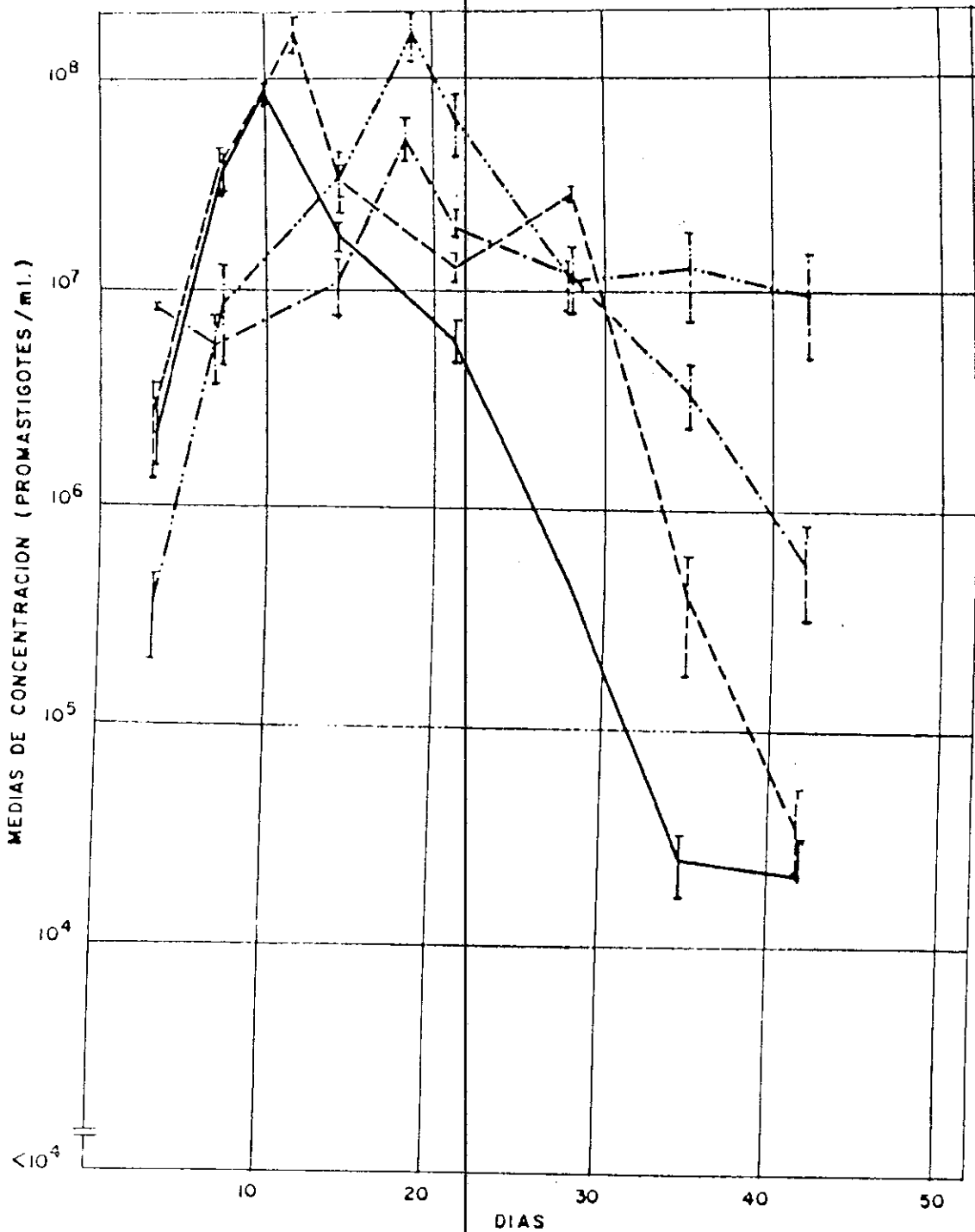
**CURVAS DE CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA
EN MEDIOS DE CULTIVO CON SANGRE DE
CONEJO O SANGRE DE CABALLO**



SIMBOLOGIA

- | | | |
|---------------|----------------------------|------------------|
| ———— | MEDIAS SANGRE DE CABALLO | ± ERROR STANDARD |
| ----- | MEDIAS SANGRE DE CONEJO | ± ERROR STANDARD |
| - · - · - · - | MEDIANAS SANGRE DE CABALLO | |
| · · · · · | MEDIANAS SANGRE DE CONEJO | |

**CURVAS DE CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA MEXICANA O L. BRAZILIENSIS
EN MEDIOS DE CULTIVO CON SANGRE DE
CABALLO O CONEJO. MEDIAS**

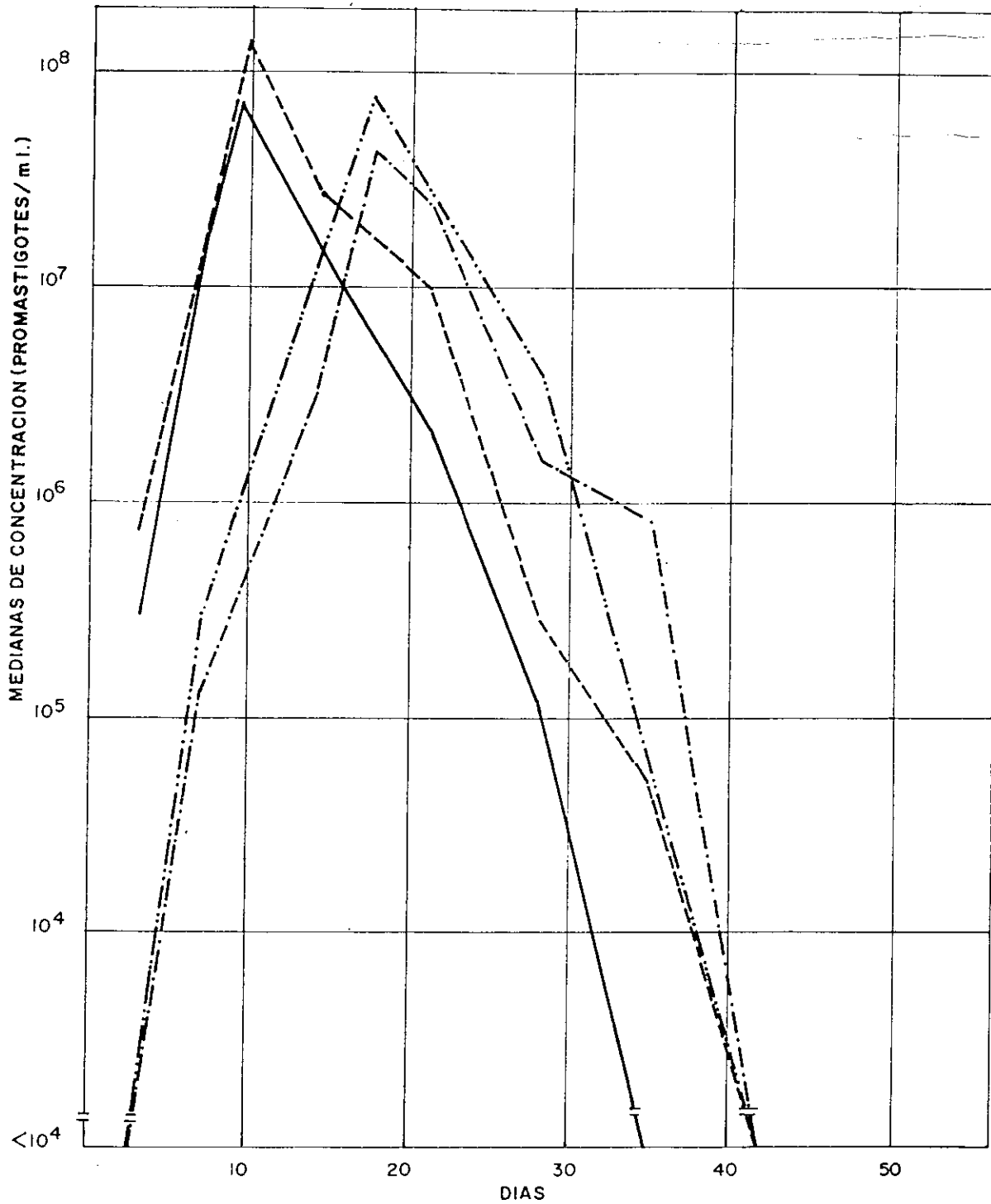


SIMBOLOGIA

—●—	L.M. - CAB. MEDIAS	⊥	ERROR STANDARD
- - -△-	L.M. - CON. MEDIAS	⊥	ERROR STANDARD
—■—	L.B. - CAB. MEDIAS	⊥	ERROR STANDARD
- - -◇-	L.B. - CON. MEDIAS	⊥	ERROR STANDARD

L.M.	=	LEISHMANIA MEXICANA
L.B.	=	LEISHMANIA BRAZILIENSIS
CAB.	=	SANGRE DE CABALLO
CON.	=	SANGRE DE CONEJO

**CURVAS DE CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA MEXICANA O L. BRAZILIENSIS
EN MEDIOS DE CULTIVO CON SANGRE DE
CONEJO O CABALLO. MEDIANAS**



SIMBOLOGIA

- L. m. - CAB. (MEDIANAS)
- - - L. m. - CON. (MEDIANAS)
- · - · - L. b. - CAB. (MEDIANAS)
- · - · - L. b. - CON. (MEDIANAS)

- L. m. = LEISHMANIA MEXICANA
- L. b. = LEISHMANIA BRAZILIENSIS
- CAB. = SANGRE DE CABALLO
- CON. = SANGRE DE CDNEJO

utilizados y los dos caballos. Sin embargo, casi todos los medios de cultivo del caballo (b) se contaminaron, por lo que la comparación intraespecífica se pudo hacer sólo con los conejos. Para esta comparación se usó un Análisis de Varianza unifactorial, para verificar si existía diferencia significativa entre los tres conejos, y luego una prueba de Tukey para averiguar dónde estaba la diferencia, o sea cuál conejo tiene la sangre más adecuada para agregarla a los medios de cultivo. Estas pruebas se aplicaron solamente al pico máximo y al número de días sobre 10^4 .

Los resultados de las pruebas estadísticas pueden verse en los cuadros 8 y 9. Los tres grupos de medios enriquecidos con sangre de conejo fueron estadísticamente iguales respecto del número de días sobre 10^4 promastigotes/ml (Cuadro 8). Sin embargo, sí hubo diferencia significativa ($p=0.025$) en cuanto a los picos máximos. Para averiguar cuáles de los conejos diferían de los demás, se aplicó la prueba de Tukey a los picos máximos. Los picos máximos de los medios con sangre de los conejos (b) y (c) son estadísticamente iguales (Cuadro 9), y son significativamente mayores que los picos máximos de los medios a los que se les agregó la sangre del conejo (a). Las figuras de las curvas de crecimiento correspondientes son la 10 y la 11. En ambas puede verse claramente que la

Cuadro 8

Resultados del ANDEVA que compara el pico máximo de crecimiento y # de días sobre 10^6 , de los medios conteniendo sangre de los tres conejos utilizados.

PICO MAXIMO EN PROMASTIGOTES/ML					
Fuente de variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif. de F
Entre grupos	2.26×10^{12}	2	1.30×10^{12}	3.968	0.025*
Dentro de grupos	1.39×10^{14}	49	2.85×10^{12}		
Total	1.62×10^{14}				
# DE DIAS SOBRE 10^6 PROMASTIGOTES/ML					
Entre grupos	196.433	2	98.216	1.295	0.283
Dentro de grupos	3717.008	49	75.857		
Total	3913.442	51			

* = Estadísticamente significativo, pasa a Prueba de Tukey.

Cuadro 9

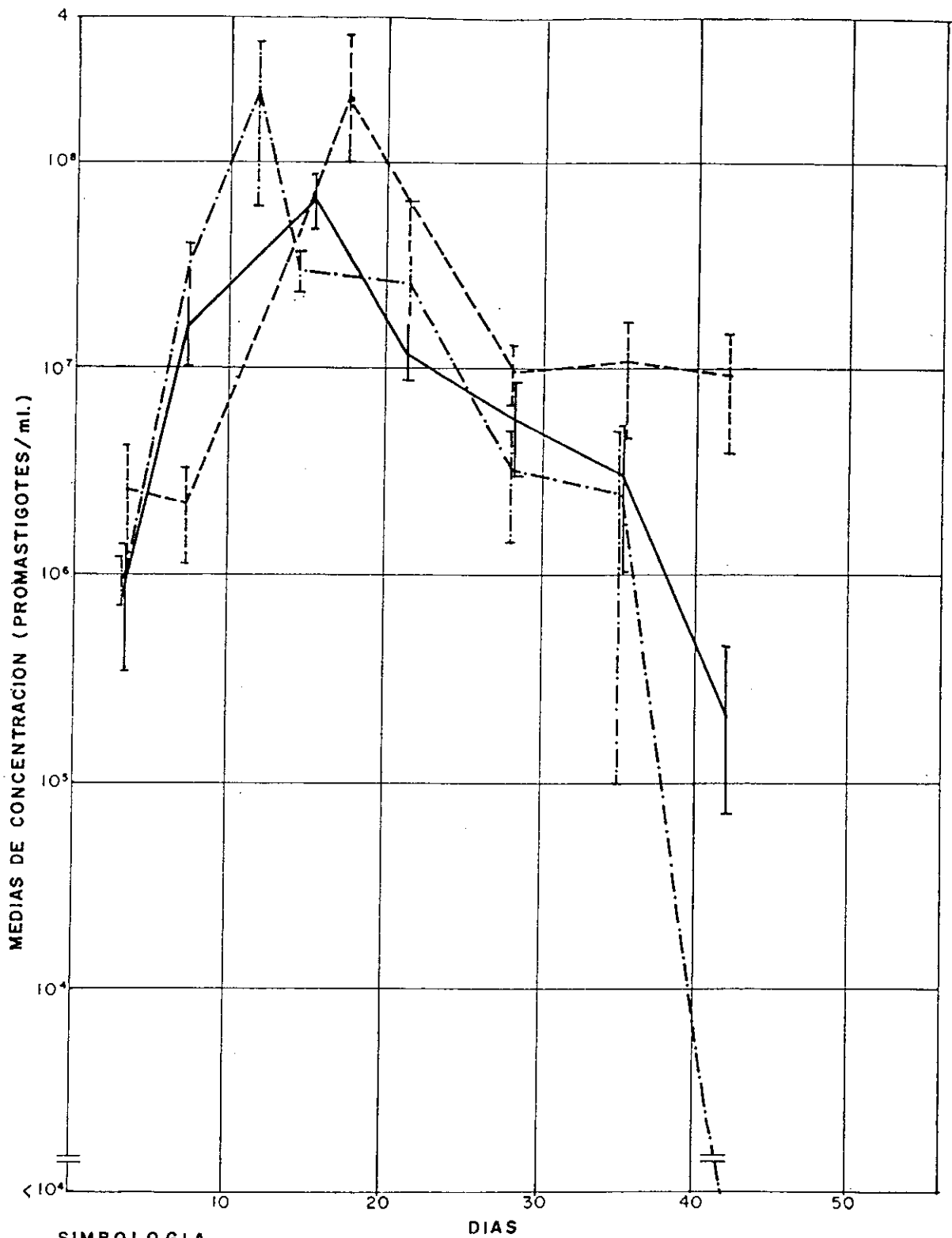
Resultados de la Prueba de Tukey comparando el pico máximo de crecimiento de los tubos conteniendo sangre de los tres conejos utilizados.

Media	Conejo	a	b	c
6.68×10^7 promastigotes/ml	a			
2.03×10^8 promastigotes/ml	b	*		
2.18×10^8 promastigotes/ml	c	*		

Pico conejo(a) < Pico conejo(b) = Pico conejo(c)

curva de los medios enriquecidos con sangre del conejo (a) tiene un pico máximo significativamente menor que los picos máximos de las otras dos curvas. El conejo (a) murió durante la extracción de la sangre.

**CURVAS DE CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA
EN MEDIOS DE CULTIVO ENRIQUECIDOS CON
SANGRE DE TRES CONEJOS DIFERENTES. MEDIAS**

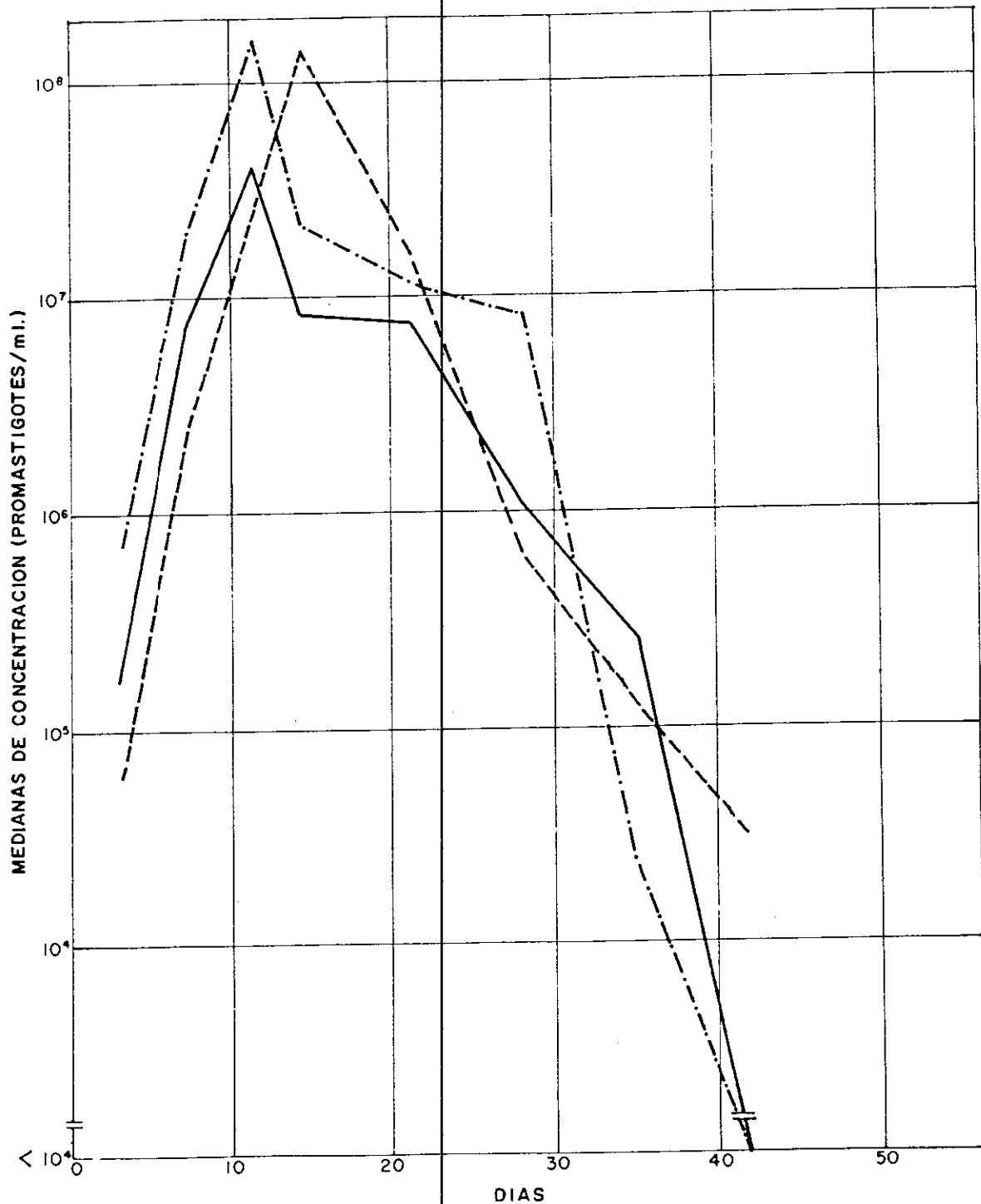


SIMBOLOGIA

- CONEJO A (MEDIAS) ± ERROR STANDARD
- - - - - CONEJO B (MEDIAS) ± ERROR STANDARD
- · - · - CONEJO C (MEDIAS) ± ERROR STANDARD

FIGURA 10

**CURVAS DE CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA
EN MEDIOS DE CULTIVO ENRIQUECIDOS CON
SANGRE DE TRES CONEJOS DIFERENTES. MEDIANAS**



SIMBOLOGIA

- CONEJO A (MEDIANAS)
- CONEJO B (MEDIANAS)
- · - · - CONEJO C (MEDIANAS)

IV. DISCUSION

A. Determinación de especie:

El problema principal que se afrontó en la determinación de especie de Leishmania que había sido inoculada en los hamsters, fue que para diez de las cepas no se tenían datos de pruebas de isoenzimas o de hibridización del DNA del citoplasto. Para estas cepas se usó el método de medición del área de lesión contra el tiempo (Wilson et al. 1979), mientras se les hacían las otras pruebas. A diferencia del estudio de referencia, en este trabajo se tuvo la desventaja de que no se sabía el inóculo inicial ni el tipo de inoculación que se les aplicó a los hamsters. Esto hace un poco menos confiable la comparación de medidas de estos hamsters con los del de referencia. Sin embargo, el método pareció ser efectivo para las cepas problema, pues al recibir posteriormente los resultados de las pruebas de ADN e isoenzimas, estas coincidieron perfectamente con lo que se había supuesto.

Esto sugiere que el tamaño de la lesión de las patas de los hamsters puede servir como indicador para diferenciar entre cepas de L. mexicana y L. braziliensis, por lo menos temporalmente, hasta que se pueden hacer pruebas de ADN o isoenzimas. L. mexicana presenta lesiones mucho mayores que

L. braziliensis. Sería recomendable construir curvas de crecimiento de referencia para los hamsters de las cepas guatemaltecas, para hacer más confiable el método.

Es necesario señalar que este sistema no es infalible. Se demostró que puede ser ventajoso medir el cambio en el número de parásitos viables en modelos murinos según la edad de la lesión (Hill et al. 1983). Esto se debe a que los cambios en el tamaño de la lesión también dependen de la respuesta inmune del huésped a la infección del parásito. Por lo tanto, el monitoreo del aumento o disminución en el tamaño de la lesión puede dar impresiones inexactas o hasta falsas sobre el verdadero progreso de la enfermedad en el animal. Aún con esta desventaja, creo que este criterio puede ser útil para hacer una primera distinción entre las dos especies de Leishmania mencionadas.

B. Porcentajes de positividad y negatividad:

1. Por cepas

El haber logrado un 90% de positividad, por el crecimiento de 18 de las 20 cepas utilizadas, es un resultado satisfactorio, pero se esperaba un 100%, ya que se consideró que todos los hamsters utilizados eran positivos para la enfermedad. De las dos cepas que no crecieron, una fue de L. mexicana y la otra de L. braziliensis. En el caso de L. braziliensis esto podía esperarse, pues ya se mencionó que

muchas veces las cepas de esta especie no crecen "in vitro". Sin embargo, no se esperaba ésto de una cepa de L. mexicana, la GA-004. Pueden haber varias razones para que esta cepa no haya crecido: Esta cepa no fue caracterizada ni por el método de hibridización del ADN del cinetoplasto, ni por el de isoenzimas (Cuadro 2), por lo que puede tratarse en realidad de una cepa de L. braziliensis, lo que explicaría que no hubiera crecido. Por otro lado, se trataba de la lesión con mayor antigüedad, con más de un año y un mes de duración, por lo que probablemente tenía muy pocos amastigotes.

De cualquier forma, sería importante hacerle un seguimiento a los pacientes de los que se aislaron estas cepas. En un estudio (Marinkelle 1981), se determinó que las cepas de pacientes, que no pudieron aislarse en medio de cultivo NNN, o que no duraron más de tres semanas en los cultivos, provocaron en los pacientes leishmaniasis mucosa 10 a 15 años más tarde.

2. Medios positivos:

- Comparación con datos reportados:

El porcentaje de positividad del total de medios inoculados fue 62%. El 38% restante se distribuyó entre contaminación por bacterias, por hongos, y medios en los que nunca se vio ningún crecimiento. Este valor de positividad es comparable a los resultados de otros estudios que se presentaron en el Cuadro 1, para cultivos. El rango de estos resultados

va de 18.8% a 67%, por lo que el 62% obtenido cae entre los más altos.

Las improntas también presentaron una positividad de 62%. Este resultado sí es mayor que los del cuadro 1 para impronta: 18.7 y 38.2%. Esto puede ser porque las lesiones del humano son distintas a las del hámster. En este último, la lesión puede abrirse como un libro para hacer la impronta contra los tejidos. Además, como la lesión del hámster no se ulcera, es probable que los tejidos tengan muchos más líquidos que la lesión humana. Otra posibilidad es que al haber llenado de solución salina la lesión del hámster, antes de abrirla para hacer la biopsia, la solución puede haber liberado muchos amastigotes, y fue más fácil verlos al microscopio.

- Efecto de las variables en la positividad:

Se pensó que cualquiera de las tres variables (especie de Leishmania, método de extracción de la muestra y tipo de sangre agregado al medio), podría haber afectado la positividad.

a. Especie:

Esta fue la única variable que afectó significativamente. Como ya se mencionó, se esperaba mayor positividad en las cepas de L. mexicana, y así fue.

b. Método de muestreo:

Los resultados del método de obtención de muestra fueron

muy similares. De los cien tubos que fueron positivos, 51 fueron aislados por aspirado y 49 por biopsia, (64 y 61% de positividad, respectivamente) sin que la diferencia fuera significativa. Estos resultados son mayores que los de la literatura, que reportan para aspirado porcentajes de positividad de 57.6 y 55%, y para biopsia 49.4 y 48% (Weigle et al. 1987; Arana, B. et al. 1987). Estos resultados sugieren que la efectividad del aspirado y la biopsia pueden ser mayores en lesiones de hamsters que en úlceras de humanos. Sin embargo, los porcentajes más altos también pueden deberse a que en este estudio se tenía la seguridad de que se trataba de leishmaniasis, y en los estudios citados podía tratarse también de otras enfermedades.

Se podría haber esperado que la biopsia fuera más efectiva en cuanto a positividad, porque al sacar mayor cantidad de tejido, saldrían muchos más amastigotes que en el aspirado. Sin embargo, al hacer la "limpieza" del tejido de la biopsia, y la centrifugación, se pueden haber perdido muchos amastigotes. Además, se hizo una dilución de los amastigotes de la biopsia, tratando de que al inocular quedara el sobrenadante con una concentración similar a la del aspirado, del orden de 10^3 . Si se hubiera inoculado el líquido resultante de la maceración de la biopsia, sin la limpieza en la centrifuga, y se hubiera comparado con el aspirado, probablemente se habrían encontrado más amastigotes en la biopsia que en

el aspirado. Por otro lado, aunque la lesión se vea grande, puede estar ya pobre en amastigotes, aunque aún siga en crecimiento (Hill et al. 1983), por lo que el aspirado puede resultar eficaz para sacar los pocos que hay. De esta forma, aunque el trozo de biopsia sea grande, no implica necesariamente una gran cantidad de amastigotes.

Dado que ambos métodos tienen una positividad estadísticamente similar, se puede recomendar cualquiera de los dos para el aislamiento de las cepas de Leishmania. Sería recomendable usar el aspirado cuando no se quiere matar el hámster, pues se puede hacer sin tener que remover la pata del animal. Además, el aspirado implica el uso de menos material y se manipula menos la muestra. Por otro lado, la biopsia es recomendable cuando se quieren hacer improntas o estudios histológicos de las lesiones.

c. Sangre utilizada en el medio:

La sangre utilizada en el medio también pudo afectar la positividad. Es posible que algunos elementos presentes en la sangre de conejo o caballo facilitara o impidiera el cambio de amastigote a promastigote, o el crecimiento inicial de los organismos en los medios de cultivo. Sin embargo, aunque los medios enriquecidos con sangre de conejo presentaron más positividad que los que contenían sangre de caballo (52 y 48 respectivamente), la diferencia no fue significativa. Por lo tanto, los resultados sugieren que ambos tipos de sangre

son igualmente efectivos para aislar cepas de Leishmania en medios de cultivo, aunque más adelante se harán otras consideraciones.

3. Medios sin crecimiento:

- Efecto de las variables en los medios sin crecimiento:

a. Especie:

Estos fueron los medios en los que no se detectó crecimiento, pero que tampoco presentaron contaminación, sino que se mantuvieron limpios. Tal como era de esperarse, la mayoría de los tubos en esta categoría, 25, pertenecen a L. braziliensis, por lo que la diferencia fue significativa. De los ocho medios sin crecimiento que pertenecen a L. mexicana, siete son de la cepa GA-004 de la que se habló antes, y el otro no se inoculó por error. Si la cepa GA-004 en realidad fue L. braziliensis, entonces todos los medios sin crecimiento de organismos pertenecen a esta especie. Como la cepa se perdió, nunca se sabrá a que especie perteneció.

b. Método de muestreo:

Se descartó el efecto que el método de extracción de la muestra pudo tener en el fracaso para aislar unas cepas, por tener frecuencias tan parecidas (16 tubos aspirado, 17 tubos biopsia), y no ser diferentes estadísticamente.

c. Sangre agregada al medio:

La distribución de las frecuencias de los medios sin crecimiento, para la variable sangre, no fue tan pareja como

la anterior: Los medios con sangre de caballo tuvieron 21 tubos negativos, y los de sangre de conejo solamente 12 tubos (Cuadro 4). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Cuadro 5). Sería de esperar que los medios con sangre de caballo fueran más exitosos porque esta sangre había sido inactivada, y no fue así. Se supone que de esta manera los promastigotes tendrían más probabilidad de sobrevivir, puesto que el complemento había sido inactivado. Además, se ha establecido que algunos elementos del suero de la sangre son responsables de la muerte de promastigotes "in vitro" (Mansour et al. 1973; Navin et al. sin publicar), y también "in vivo" (Hill et al. 1983). También se descubrió que hay elementos de la sangre que se destruyen al calentarla a 80°C durante 15 minutos, que son necesarios para el mantenimiento y cultivo de Leishmania (Marin et al. 1982). En este estudio, la sangre se calentó solamente a 56°C durante media hora, por lo que probablemente la temperatura no fue tan alta como para causar el efecto mencionado. Por otro lado, cabe la posibilidad de que la sangre de conejo sea más rica en nutrientes, o los tenga en las cantidades óptimas para el establecimiento de Leishmania en el medio de cultivo. En todo caso, la diferencia entre ambas no fue significativa.

d. Interacción de especie con sangre agregada al medio:

Se encontró que la frecuencia de medios negativos sin crecimiento inoculados con L. braziliensis en medios enriquecidos

con sangre de caballo, fue significativamente mayor que las demás combinaciones (Cuadro 5). Esto sugiere que no es tan recomendable usar sangre de caballo en medio de Evans, para aislar cepas de L. braziliensis. Para cepas de L. mexicana, da igual si se usa sangre de caballo o de conejo. Sin embargo, como al aislar las cepas no se sabe cuál de las dos especies de Leishmania se trata, se sugiere el uso de la sangre de conejo en los medios, para obtener una positividad mayor.

- Posibles causas de la falta de crecimiento:

Hay varias hipótesis para explicar esta falta de crecimiento en 21% de los medios inoculados.

a. Número de organismos en el inóculo:

Se sabe que la positividad depende del número de organismos del inóculo. Un inóculo muy pobre en amastigotes puede ser positivo hasta unas 3-4 semanas después de la inoculación (Neva 1982). El recuento de amastigotes extraídos de las muestras fue difícil. Se trató de identificarlos por su tamaño (unos 5 μ), y por ser verde brillante y tener movimiento browniano. En el caso de L. mexicana esto fue relativamente fácil, por ser numerosos los amastigotes, y por ser un poco más grandes que los de L. braziliensis. Esto concuerda con la literatura (Zuckerman y Lainson 1977), que habla de que es posible diferenciar estas dos especies por el tamaño de sus amastigotes. Este problema podría evitarse usando algún

tinte para visualizarlos, como el cristal violeta (Wilson et al. 1979).

b. Antigüedad de la lesión de los hamsters:

En el cuadro 2 se puede ver que el rango de las lesiones iba entre 99 y 401 días. La detección de los parásitos es inversamente proporcional a la duración de la lesión cutánea humana (Cuba Cuba et al. 1984b). Se han obtenido porcentajes de aislamiento mayores de lesiones de menos de un mes de duración, que de lesiones más antiguas (Hendricks et al. 1979). Diferentes métodos de diagnóstico probados son menos sensibles, para lesiones de más de seis meses de duración (Weigle et al 1987). Estos estudios se refieren a lesiones en humanos, pero el concepto podría ser aplicable a los hamsters. Como sus lesiones eran bastante antiguas, pueden haber estado pobres en amastigotes.

c. Lugar de toma de muestra:

Tal vez no se tomó la muestra de todos los lugares posibles. Por lo menos tres hamsters inoculados con L. mexicana presentaron metástasis (cepas GA-163-1, GA-171-1 y GA-176-1). La enfermedad se diseminó hacia la cara, orejas, espalda y cabeza. Es posible que la lesión primaria estuviera más pobre en amastigotes que las secundarias. Aunque con L. mexicana no se tuvo mayor problema para aislar las cepas, habría sido interesante comparar el número de amastigotes entre las lesiones primarias y las provocadas por la metástasis de los

parásitos. En el caso de L. braziliensis, no hubo metástasis cutánea. Sin embargo, se ha reportado que en hamsters inoculados con esta especie, principalmente con L. b. braziliensis, los parásitos tienden a visceralizarse (Cuba Cuba et al. 1984a; Wilson et al. 1979). Los órganos afectados son el hígado en primer lugar, y luego el bazo. Al igual que con L. mexicana, habría sido recomendable tomar muestras de estos órganos, pues pudieron tener más amastigotes que las lesiones primarias.

d. Cambio amastigote-promastigote:

Podría ser que aunque se hubieran inoculado suficientes amastigotes en el medio, estos no hayan podido efectuar el cambio a promastigotes. Esto podría deberse a muchas causas: Es posible que los amastigotes hayan estado muertos en la lesión, o que la exposición al cloroformo con que se mató al hamster también los haya afectado. Se afirma que la habilidad de amastigotes individuales para transformarse y dividirse depende de un número de factores que incluyen la calidad de la sangre utilizada, y el status del animal del que se extraen (Hill 1983).

e. Otros factores en el medio:

Por último, es posible que los amastigotes sí se transformaran a promastigotes, pero que estos no pudieran crecer adecuadamente. Elementos del suero sanguíneo, como la IgM, pueden haber causado la aglutinación o muerte de los

promastigotes (Navin et al. sin publicar).

4. Medios contaminados con hongos o bacterias:

- Comparación con datos reportados:

Un 17% de los medios se contaminó, la gran mayoría con hongos. Este porcentaje es bastante elevado en comparación con otros estudios (Cuba Cuba et al. 1894b; Weigle et al. 1987), en los que se reportó un 10 y 11.11% de contaminación de los cultivos.

Los hongos y las bacterias pudieron provenir de las lesiones, pues muchas veces éstas tienen infecciones secundarias. La contaminación por levaduras es bastante común especialmente cuando el material se aísla de heridas de animales o humanos (Kimber et al. 1981). En el presente estudio, se vieron más infecciones secundarias en las patas de los hamsters inoculados con L. mexicana, probablemente porque la lesión es mucho más grande, y a que su respuesta celular es bastante pobre (Zuckerman y Lainson 1977).

Por otro lado, considero que el origen más probable de la contaminación fue el ambiente. No se contó con una campana adecuada. Lo ideal habría sido una de flujo laminar. Sin embargo, en condiciones de campo y en la mayoría de laboratorios, no se cuenta con este tipo de equipo, por lo que se pueden esperar cultivos contaminados.

La contaminación también pudo deberse a que los medios pudieron estar contaminados desde antes de ser inoculados,

con esporas de hongos de crecimiento lento. Algunos medios control refrigerados que habían pasado la prueba de esterilidad, presentaron contaminación por hongos semanas después, sin haber sido inoculados con muestras de hamsters. Sería recomendable hacer la prueba de esterilidad durante más días para evitar este error.

- Efecto de las variables en la contaminación:

En el análisis por variables, las variables actuando por sí solas no mostraron diferencias significativas (Cuadro 5). Se habría esperado más contaminación en las biopsias, porque se manipulan más que los aspirados, pero la contaminación fue exactamente igual. Al ver la interacción de especie x sangre agregada al medio, los medios inoculados con L. braziliensis en medios con sangre de conejo, fueron en los que más contaminación por hongos se dio, aunque sólo fue estadísticamente distinto en comparación con L. mexicana en sangre de conejo, que fue el que menos se contaminó con hongos. Esto sugiere que fue la especie la que hizo la diferencia. Por ser más pequeña la lesión de L. braziliensis, es más difícil manipularla, y da lugar a que se contamine más.

C. Curvas de crecimiento:

1. Observación de los cultivos:

Considero que en general, el recuento de los promastigotes de los cultivos con el hemocitómetro fue satisfactorio.

Sin embargo, como la cantidad de medios que se observaban diariamente era elevado (unos 40 tubos), este sistema puede ser tedioso y llevar mucho tiempo. Se requiere que sea la misma persona la que haga el recuento diariamente, pues cada una puede tener un criterio distinto para hacerlo. De esta manera, el método es bastante estándar. Aun así, las curvas de crecimiento graficadas con datos diarios mostraron muchas fluctuaciones. Las gráficas presentadas en este trabajo sólo representan promedios de cada cinco días, pero en las de los trabajos de Mayorga (1988) y Fuentes (1988), que muestran datos diarios, pueden verse más claramente las fluctuaciones. Esto sugiere que hubo fuentes de error en el método.

Se cree que la temperatura puede haber afectado el crecimiento. La temperatura no pudo mantenerse constante por falta de una incubadora adecuada. El rango a que se mantuvo (22 a 26°C) pudo dar lugar a fluctuaciones en la velocidad de replicación de los organismos.

Por otro lado, no se llevó un control del pH de los medios de cultivo, y esto también puede haber sido la causa de las fluctuaciones entre un día y otro.

El hecho de haber contado organismos vivos y en movimiento, dificultó el que el conteo fuera totalmente confiable. Sin embargo, si se hubiera hecho el conteo matando los promastigotes con alguna substancia como la formalina, no habría sido posible diferenciar entre organismos vivos con el

flagelo en movimiento, de los muertos, y probablemente el error habría sido mayor. Este problema también se tiene cuando se usan aparatos para contar células, como el Coulter Counter (Berens et al. 1976). Sería interesante hacer un estudio comparando curvas de crecimiento usando ambos métodos.

La alta concentración de promastigotes activos en el hemocitómetro, al ir acercándose al máximo de crecimiento, también dificultó el conteo. La gran cantidad de células muertas al final del ciclo de crecimiento, así como la presencia de debris del medio, también hizo difícil visualizar organismos vivos. Las diluciones que se hicieron facilitaron mucho el conteo. Se propuso que el tener entre 10 y 100 promastigotes en el campo delimitado por el hemocitómetro, es la cantidad óptima para hacer un conteo confiable. Sin embargo, es necesario confirmar esta hipótesis.

Otro problema que se afrontó al hacer el conteo fue el hecho de que aparecieron muchas rosetas de promastigotes en los medios. Cuando la masa de promastigotes es muy grande, es muy difícil poder contar individuos.

Varios investigadores han propuesto razones que llevan a la formación de rosetas. Marin et al. (1982), observaron que el número de rosetas aumenta cuando los cultivos en medio NNN llegaban a la fase estacionaria de crecimiento. También observaron que eran más numerosas en medios que no presentaban

buen crecimiento de promastigotes. Por lo tanto, sugirieron que las rosetas se forman cuando los nutrientes escasean en el medio.

Otros investigadores (Jadín y Creemles 1966), sugirieron que en el centro de la roseta hay un promastigote en proceso de degenerarse, que sirve de fuente de nutrientes esenciales a los demás. Sin embargo, en este estudio se observo que en pequeñas rosetas, de unos diez organismos, no había un promastigote en el centro, sino que todos estaban pegados por el extremo sin flagelo. En otro trabajo (Navin et al. sin publicar), se descubrió que los promastigotes se aglutinan en presencia de IgM del suero, y pueden continuar metabólicamente activos si el complemento de la sangre ha sido inactivado. Esta explicación parece ser más satisfactoria para la formación de las rosetas.

Adicionalmente, se observó que los organismos formaban una nata en la superficie de la fase líquida. Esto se debe a que por ser organismos aerobios, necesitan el oxígeno del aire atrapado en el tubo. También formaban pequeñas colonias en la parte inclinada del agar que sobresalía de la fase líquida. Esta gran concentración de organismos en un área tan limitada, puede haber facilitado la acción de la IgM para la formación de rosetas. Sería interesante comparar el número de rosetas formadas en medios inoculados al mismo tiempo, utilizando tubos de ensayo y otros recipientes como cajas petri o

erlenmeyers, donde el área expuesta al oxígeno es mayor.

Las rosetas pueden deshacerse si se agita el medio. Al sacar la gota diaria de fase líquida, y al hacer las diluciones, se succionaba y volvía a expeler el líquido de las pipetas. Sin embargo, este método no fue totalmente eficaz para romperlas. En un estudio con un medio líquido, Al-Kateeb y Al-Azawi (1981) encontraron que la agitación continua de los medios sumergidos en un baño de agua vibratorio resultó en un acortamiento del tiempo de replicación de los promastigotes. Este sistema también podría ayudar a que no se formaran rosetas, y así se facilitaría el conteo.

El corregir todas las fuentes de error antes mencionadas podría dar por resultado curvas de crecimiento sin tantas fluctuaciones.

Es importante mencionar que se observaron diferencias morfológicas entre los promastigotes de L. mexicana y los de L. braziliensis. Aunque no se hicieron mediciones, se observó que en la fase logarítmica, los primeros eran más grandes, con forma de banano, y con poca movilidad; por el contrario, los segundos eran pequeños y muy móviles. Esto concuerda con las observaciones sobre cepas de L. b. braziliensis aisladas en Belice (Evans et al. 1984).

En las fases estacionaria y de declinación, se vieron cambios morfológicos en los promastigotes de ambas especies. Los organismos se fueron volviendo más pequeños y

redondeados, y en muchas ocasiones se vieron promastigotes esféricos. También se observó una marcada reducción de la movilidad de los organismos. Estas mismas observaciones se han reportado con L. donovani y L. tarentolae (Berens et al. 1976; Ray y Ghose 1980; Marin et al. 1982).

2. Dibujo de las curvas de crecimiento:

Anteriormente, se mencionaron las razones para utilizar tanto medianas como medias para representar las curvas de crecimiento. El límite inferior de sensibilidad del hemocitómetro es de 1×10^4 promastigotes/ml. En el inicio del crecimiento de los organismos, los cultivos aparecían como negativos, pero indudablemente no lo estaban, pues luego se podía detectar crecimiento. Por esta razón no se usó 0 para representar a estos cultivos en las medias, sino que se usó 1000 promastigotes/ml como cantidad representativa. El hecho de que todas las curvas trazadas con medianas resultaran con valores menores que las de las medias es importante. Esto sugiere que al escoger 1×10^3 , se puede haber usado un valor demasiado alto, que alteró los verdaderos resultados. Se sugiere entonces que el uso de medianas para hacer las curvas de crecimiento es más adecuado. La única desventaja que tiene el uso de las medianas, es que no se puede calcular el error estándar.

3. Criterios usados para comparar las curvas de crecimiento:

Para evaluar la rapidez de crecimiento, se evaluó el número de días que los organismos tardaron en llegar a 1×10^6 promastigotes/ml. A menor número de días, más rápido sería el crecimiento. Este criterio pareció ser adecuado, pues permitió establecer que una especie creció más rápido que la otra, como se discutirá más adelante. Sin embargo, existen otras formas de evaluar la rapidez de crecimiento. Una forma simple habría sido comparar el número de días transcurridos para que el medio se viera positivo. Otra forma es el calcular el tiempo de generación o replicación, de la fase logarítmica de crecimiento. Este se calcula de acuerdo a la fórmula $TG = T / \{1.44 \times \log(C2/C1)\}$, donde T es el tiempo transcurrido entre el primer (C1) y el segundo (C2) conteos (Franke et al 1985). Sin embargo, se tiene el mismo problema que con el cálculo de las medias. En el caso de que algunos medios tuvieran concentraciones fuera del alcance del hemocitómetro, habría que escoger un valor que los representara. Por otro lado, se podrían haber comparado las pendientes de las rectas de la fase logarítmica pero se habría tenido el mismo problema con los medios "negativos". Por lo tanto, el criterio que se escogió parece haber sido el más adecuado para evitar introducir un error en los cálculos.

Para evaluar la concentración máxima de crecimiento se compararon los promedios respectivos de cada variable. Para poder situarlo en la curva, fue necesario calcular también el

tiempo promedio que transcurrió para alcanzar este pico. Se considera que este análisis fue satisfactorio.

La elección del criterio para la evaluación del tiempo que se puede mantener una cepa en un medio, también es discutible. El objetivo de determinar este valor es poder recomendar el tratamiento que permita mantener las cepas de Leishmania en los medios de cultivo el mayor tiempo posible antes de tener que hacer un pase de la cepa a un medio fresco. Esto es importante no solamente porque ahorra trabajo, sino porque se sabe que las cepas mantenidas "in vitro" mucho tiempo, a menudo pierden su virulencia (Zuckerman y Lainson 1977). En un estudio (Franke et al. 1985), se demostró que los promastigotes de las fases estacionarias del crecimiento son más infectivos que los de la fase logarítmica. Por lo tanto, es recomendable que los pases se hagan durante la fase estacionaria, es decir, posterior al máximo de crecimiento y anterior a la declinación. Se consideró que el límite inferior de la fase estacionaria estaría alrededor de 10^6 promastigotes/ml. Por esta razón, se eligió el número de días que el cultivo se mantuvo sobre 10^6 , para evaluar la durabilidad de las cepas en los medios.

4. Análisis de las curvas de crecimiento:

- Efecto de las variables:

a. Comparación de especies:

Al comparar las curvas de crecimiento de L. mexicana

con las de L. braziliensis, se encontraron la mayoría de diferencias significativas. El patrón de crecimiento que presentaron fue muy parecido, pero L. braziliensis parece haberse desfasado unos cuantos días con respecto a L. mexicana. Esto puede verse en las figuras 5 y 9. Es posible que L. braziliensis tenga un tiempo de generación más largo que L. mexicana en este medio de cultivo. Esto implicaría un metabolismo más lento para L. braziliensis. También podría ser que los requerimientos nutricionales sean diferentes para ambas especies, y que L. braziliensis tuvo deficiencia de algún nutriente, por lo que creció más lento. Sin embargo, estas son solo suposiciones, y no se encontró nada en la literatura que las apoye.

Ya se mencionó anteriormente que fue muy difícil la identificación y conteo de los amastigotes de L. braziliensis. Esto implica que la cantidad de amastigotes inoculados puede haber sido menor de lo que se esperó, y puede haber provocado el desfasamiento observado.

Otra posibilidad es que L. braziliensis puede haber perdido más organismos del inóculo inicial que L. mexicana. Como ya se mencionó, esto puede deberse a que la transformación de amastigote a promastigote no se lleve a cabo en todas las células inoculadas. Por otro lado, los promastigotes que si se transformaron pueden haber sufrido lisis o aglutinación por el complemento o IgM del suero, en mayores cantidades para L.

braziliensis que para la otra especie. Tampoco se encontró en la literatura algo que confirme esto.

El pico máximo de crecimiento fue estadísticamente igual aunque L. mexicana alcanzó un valor ligeramente mayor. El hecho de que ambas cepas sobrepasaran 10^8 promastigotes/ml, sugiere que el medio de Evans es muy satisfactorio para cultivos de organismos en masa.

Respecto de la durabilidad, parece ser que L. braziliensis tarda unos cuatro días más que L. mexicana, en concentraciones $> 10^6$. De cualquier manera, fue sorprendente que las cepas se mantuvieron hasta más de 40 días en el medio de cultivo. Dado que en el MERTUG los pases se hacían cada semana, se esperaba que la duración de las cepas fuera mucho menor de lo que resultó. Al hacer los pases cada ocho días, probablemente se usan concentraciones muy altas de organismos, pues es muy cercano al máximo de crecimiento. Los resultados de este estudio sugieren que los pases se pueden hacer cada 15 días. De esta forma se ahorra tiempo y es posible que se contribuya a mantener la infectividad de la cepa.

b. Comparación de los métodos de extracción de la muestra:

Inicialmente, se pensó que los métodos de extracción de la muestra solo se analizarían desde el punto de vista de los porcentajes de positividad, y no en el análisis de las curvas de crecimiento. Sin embargo, se sabe que el tipo y cantidad

de tejidos del huésped presentes en un medio líquido, influyen profundamente la velocidad de crecimiento de promastigotes de Leishmania (Hill et al. 1983). Aunque a la biopsia se le aplicó un tratamiento de maceramiento y centrifugación, es posible que se inocularan restos de tejidos en los medios. Por lo tanto, se incluyó esta variable en el ANDEVA trifactorial. Ninguna de las comparaciones mostró diferencias significativas. Los resultados sugieren que la biopsia y el aspirado de las lesiones de las patas de los hamsters, son igualmente recomendables no sólo por su porcentaje de positividad, sino porque no afectan significativamente el crecimiento posterior de los promastigotes de Leishmania en los medios de cultivo.

c. Comparación de los dos tipos de sangre agregados al medio de cultivo:

En el estudio de Evans et al. (1984) se recomendó el uso de 15% de sangre de caballo defibrinada e inactivada, agregada al medio de Tobie modificado (Evans 1978). Este medio presentó una mayor positividad de aislamiento de cepas de lesiones humanas, que otros seis medios probados. En este estudio se quiso comprobar si la sangre defibrinada de conejo puede sustituir a la de caballo, respecto de la positividad, y también con respecto del crecimiento "in vitro" de los parásitos.

No encontré diferencia significativa en los porcentajes

de positividad. Por otro lado, los medios enriquecidos con sangre de caballo e inoculados con L. braziliensis presentaron mas medios negativos sin crecimiento.

En las curvas de crecimiento, sólo en el pico máximo se dio una diferencia significativa, de nuevo en favor de la sangre de conejo. Hay varias explicaciones posibles para esto. En primer lugar, la sangre de caballo fue inactivada y la de conejo no. Ambas fueron defibrinadas. La temperatura a que se expuso la sangre para inactivarla, pudo haber destruido algun nutriente necesario para los organismos. Sería interesante hacer una comparación con sangre de conejo defibrinada e inactivada y con sangre de caballo sólo defibrinada, para demostrar si el rendimiento menor se debió a la inactivación de la sangre.

Se supone que es la hemina de la sangre la que utilizan los promastigotes para su crecimiento. La hemina varía con la especie de la que se obtenga. Sin embargo, en los medios de cultivo se ha usado hemina de conejo, cuyo y humano, tanto fresca como comercial (Chaudhuri et al 1982), con buenos resultados. Esto es lógico desde el punto de vista ecológico-evolutivo, porque implica que la Leishmania tiene la capacidad de utilizar la hemina de un rango amplio de hospederos vertebrados. Con este criterio sería de esperarse que los organismos tuvieran la misma capacidad de utilizar la hemina de conejo que la de caballo, y llegar a picos máximos parecidos.

La respuesta puede estar en la concentración de hemina presente en la sangre. Cuando los niveles de hemina en el medio HOHEM sobrepasan los 6 µg/ml, el crecimiento de L. donovani es más lento (Berens et al. 1976). Los caballos de los que se obtuvo la sangre para este trabajo son caballos de carrera, pura sangre. Su dieta es muy especial, y continuamente se les hacen exámenes de sangre para comprobar que no estén anémicos. Probablemente la sangre de estos caballos tenía altos niveles de hemina. Aunque no se conocen los límites óptimos de hemina en el medio de Evans, cabe la posibilidad de que la hemina estuviera muy concentrada y haya afectado el crecimiento de los organismos.

En el mismo estudio, Berens y sus colaboradores reportaron que el crecimiento máximo aumentó con concentraciones mayores de glucosa en el medio. El punto de saturación fue de 2mg/ml, pasado el cual los incrementos posteriores no tuvieron efecto. Una diferencia en la glucosa sanguínea de los conejos con respecto de los caballos puede haber sido otra causa por la que los medios con sangre de conejo llegaron a un pico máximo mayor. En las figuras 7 y 9 se ve que casi toda la curva de sangre de conejo va por sobre la de caballo. Sería recomendable analizar estadísticamente más puntos para ver si se mantiene la superioridad de la sangre de conejo. Paradójicamente, la sangre de un caballo de trabajo probablemente daría mejores resultados que la de los caballos de

carrera utilizados en este estudio.

d. Comparación entre conejos donadores de sangre:

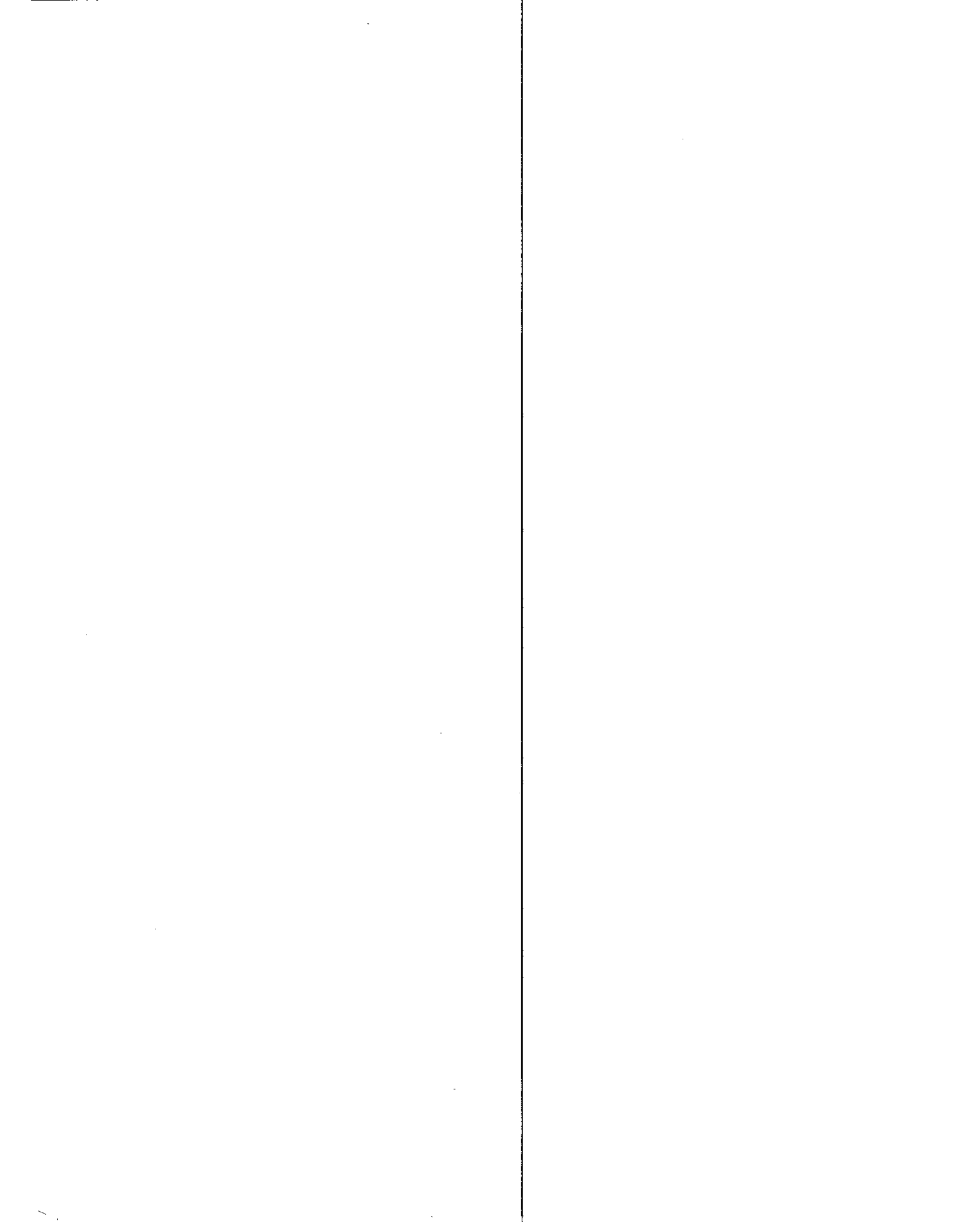
Los dos trabajos que se tenían como referencia para la comparación entre conejos eran contradictorios. Ray y Ghose (1980) afirmaron que hay diferencias entre los individuos donadores de sangre, y Hill et al. (1982) compararon 5 conejos y encontraron que tuvieron igual rendimiento. Los resultados de este estudio concuerdan con Ray y Ghose. Los niveles de hemina y glucosa pueden variar aún entre individuos de la misma especie, según su estado nutricional y de salud. Como ya se mencionó anteriormente, el conejo (a) murió después de extraerle la sangre. Esto puede indicar que su estado de salud puede haber estado mal en comparación de los otros conejos, y a esto se debió el pico máximo menor.

e. Interacción de variables:

Ninguna interacción de variables fue detectada para las curvas de crecimiento, con la prueba estadística aplicada. Se considera entonces que las variables actuaron en forma independiente.

V. CONCLUSIONES

1. Es más difícil aislar L. braziliensis a partir de lesiones de hamsters, que L. mexicana. Su ciclo de crecimiento posterior en los medios de cultivo de Evans es más lento que el de L. mexicana.
2. El aspirado y la biopsia son igualmente efectivos para el aislamiento de amastigotes de Leishmania en medios de cultivo de Evans, a partir de lesiones de hamsters. Pueden usarse indistintamente. El método de obtención de muestra no afecta el ciclo de desarrollo de Leishmania "in vitro".
3. La sangre de conejo defibrinada puede utilizarse en el medio de Evans, en sustitución de la sangre defibrinada e inactivada de caballo, con mejores resultados de positividad y máximo de crecimiento.
4. El crecimiento de Leishmania puede variar de acuerdo al conejo donador de sangre utilizada en el medio.



VI. LITERATURA CITADA

- Al-Khateeb, G.H. y D.M.A. Al-Azawi. 1981. Monophasic liquid medium (GD-NRC) for the cultivation of Leishmania donovani. *Journal of Parasitology* 67(1): 127.
- Arana, B.; M. García; J. Pozuelos; L. Pérez y T. Navin. 1987. Estudio comparativo entre diferentes métodos y lugares de toma de muestras en lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea en Guatemala. En: Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 282.
- Arana, F.A.; A. Caceres y M.F. Torres. 1987. Comparación entre el colorante de Giemsa y de Wright para el diagnóstico directo de la leishmaniasis cutánea. En: Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 283.
- Ash, L.R. y T.C. Orihel. 1980. Atlas of parasitology. American Society of Clinical Pathologists, Chicago 184pp.
- Berens, R.L.; R. Brun y S.M. Krassner. 1976. A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates.

- Journal of Parasitology 62(3): 360-365.
- Calle, J. de D. 1987. Comunicación personal.
- Castes, M. 1987. Inmunidad mediada por células e inmunoterapia en pacientes con leishmaniasis cutánea americana. En: Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 151-156.
- Chaudhuri, G.; T.K. Chatterjee y A.B. Banerjee. 1982. Growth factor requirements for in vitro growth of Leishmania donovani. Indian Journal of Medical Research 76: 157-163.
- Chaves, F.; S. Silva y R. Zeledon. 1982. Comparison of two culture media for the isolation of Leishmania strains. Journal of Parasitology 68(2): 346-347.
- Cedillos, R.A. 1987. Situación actual de la leishmaniasis en las Américas. En: Memorias. VIII Congreso Latinoamericano de Parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 182
- Cuba Cuba, C.A.; P.D. Marsden; A.C. Barreto; I. Roitman; A. Vexenat; L.M.P. de Lima y M.H.P. de Sa. 1984a. Identification of human stocks of Leishmania spp. isolated from patients with mucocutaneous leishmaniasis in Tres Bracos, Bahia, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 78: 708-709.

- Cuba Cuba, C.A.; E.A. Llanos-Cuentas; A.C. Barreto; A.V. Magalhaes; E.L. Lago; S.G. Reed y P.D. Marsden. 1984b. Human mucocutaneous leishmaniasis in Tres Bracos, Bahia Brazil. An area of Leishmania braziliensis transmission I. Laboratory diagnosis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 17(4): 161-167.
- Cuba Cuba, C.A.; M.A. Miles; A. Vexenat; D.C. Barker; D. McMahon-Pratt; J. Butcher y P.D. Marsden. 1985. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Tres Bracos, Bahia, Brazil: Characterization and identification of Leishmania stocks isolated from man and dogs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 36(2): 270-287.
- Evans, D.A. 1978. Kinetoplastida. En: Methods of cultivating parasites "in vitro". Taylor, A.E.R. y J.R. Baker, editores. Academic Press, Londres 55-88.
- Evans, D.A.; S.M. Lancham; C.I. Baldwin y W.Peters. 1984. The isolation and isoenzyme characterization of Leishmania braziliensis subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 78: 35-42.
- Franke, E.D.; P.B. McGreevy; S.P. Katz y D.L. Sacks. 1985. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant Leishmania promastigotes. The Journal of

Immunology 134(4): 2713-2718.

Fuentes, M.A.D. 1988. Evaluación de cinco agentes antimicrobiales para la eliminación de contaminación microbiana en el cultivo de L. braziliensis. Sin publicar.

Grimaldi, G.; C.L. Jaffe; D. McMahon-Pratt y A. Falqueto. 1984. A simple procedure for the isolation of leishmanial parasites and for the recovery of parasite virulence in avirulent stocks. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 78: 560.

Grimaldi, G.; J.R. David y D. McMahon-Pratt. 1987. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 36(2): 270-287.

Grogl, M. y M.F. Torres. 1987. Biología molecular y diagnóstica de la leishmaniasis. En: Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 168-174.

Hendricks, L. y N. Wright. 1979. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's Drosophila Medium. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 28(6): 962-964

- Hill, J.O. 1983. Quantitation of Leishmania tropica major by its ability to form distinct colonies on agar-based media. *Journal of Parasitology* 69(6): 1068-1071.
- Hill, J.O.; R.J. North; y F.M. Collins. 1983. Advantages of measuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 39(3):1087-1094.
- Iovannisci, D.M. y B. Ullman. 1983. High efficiency plating method for Leishmania promastigotes in semidefined or completely-defined medium. *Journal of Parasitology* 69(4): 633-636.
- Jadin, J.M. y J. Creemles. 1966. L'ultrastructure des formes en rosaces de Leishmania tropica, Wright 1903. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale* 46: 349-354.
- Katz, M.; D.D. Despommier y R. Gwadz. 1982. *Parasitic Diseases*. Springer-Verlag, New York 264pp.
- Kelley, P.W.; M. Grogl; W.R. Ballou; J.D. Berman; D. Gordon y E. Rowton. 1987. Leishmaniasis cutánea en el Ejército de Guatemala: una encuesta clínica y epidemiológica. En: *Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical*, Guatemala 183.
- Keppel, A.D. y J. Janovy. 1980. Morphology of Leishmania donovani colonies on blood agar plates. *Journal of Parasitology* 66(5): 849-851.

- Kern, P. 1981. Leishmaniasis. *Antibiotics Chemotherapy* 30: 203-223.
- Kimber, C.D.; D.A. Evans; B.L. Robinson y W. Peters. 1981. Control of yeast contamination with 5-fluorocytosine in the 'in vitro' cultivation of Leishmania spp. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 75(4): 453-454.
- Levine, N.D.; J.O. Corliss; F.E.G. Cox; G. Deroux; J. Grain; etc. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27(1): 37-58.
- Low-a-chee, R.M.; P. Rose y D.S. Ridley. 1983. An outbreak of cutaneous leishmaniasis in Guyana: epidemiology, clinical and laboratory aspects. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 77(3) 255-260.
- Lujan, R. 1987. Experiencias con primates no humanos como modelos experimentales de leishmaniasis. En: *Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala* 163-166.
- Mansour, N.S.; J. Hady y E. McConnell. 1973. A modified liquid medium for Leishmania. *Journal of Parasitology* 59(6):1088-1090.
- Marin, F.; J. García de Lomas; M.P.G. Penarrubia y J. Penalver. 1982. Cultivation of Leishmania: Comparison of different media for promastigote cultivation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 76(6): 607-613.

- Marinkelle, C.J. 1981. The practical importance of culturing Leishmania isolated from patients with cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75(4): 609-610.
- Markell, E.K. y M. Voge. 1981. Medical Parasitology. 5a. ed. W.B. Saunders Co., New York 374pp.
- Mayorga, M.M. 1988. Cultivo de Leishmania braziliensis y L. mexicana: Comparación de diferentes medios de cultivo para promastigotes. Sin publicar.
- Melo, M.N. 1981. Cultivation of Leishmania in chemically defined media. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75(5):756.
- Navin, T.R.; E.C. Krug y R.D. Pearson. Effect of IgM from normal serum on Leishmania donovani promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. Sin publicar.
- Navin, T.R. 1987. Tratamiento de Leishmaniasis. En: Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 177-180.
- Neva, F.A. 1982. Diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis. En: Current cleared topics in infectious diseases, Vol. 3. Remington, J.S. y M.N. Swartz, editores. Mc.Graw-Hill Book Co. 364-380.

- Pearson, R.D. 1984. Leishmaniasis: The pathologic spectrum. Hospital Practice Mayo 100E-100X.
- Ray, R. y A.C. Ghose. 1980. Cultivation of Leishmania donovani in vitro in a high yielding liquid culture medium. Indian Journal of Medical Research 71:203-206.
- Ridley, D.S. 1980. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74(4) 515-521.
- Robles, M. 1987. Tratamiento de leishmaniasis cutánea con criocirugía. En: Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 181.
- Shaw, J.J. y R. Lainson. 1981. The "in vitro" cultivation of members of the Leishmania braziliensis complex. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75(1):127.
- Srivastava, L. y V.K. Srivastava. 1980. Evolution of different culture media for isolation of Leishmania donovani. Journal of Common Disease 12(4): 188-191.
- Steiger, R.F. y E. Steiger. 1976. A defined medium for cultivating Leishmania donovani and L. braziliensis. Journal of Parasitology 62:1010-1011.
- Torres, M.F. 1986. Leishmaniasis en Guatemala 1986. En: Memorias. III Congreso Nacional de Microbiología,

- Guatemala 133-138.
- Torres, M.F. y H. Figueroa. 1987. Historia del género Leishmania. En: Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 151-156.
- Travi, B. 1987. Vectores y reservorios de leishmaniasis tegumentaria: un problema sin resolver. En: Memorias. VIII Congreso latinoamericano de parasitología y I Congreso guatemalteco de parasitología y medicina tropical, Guatemala 157.
- Urjel, R.; M. Recacoechea; C. La Fuente y H. Orellana. 1983. A simple method for the collection of material from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 78:708-709.
- Walton, B.C.; R.W. Intermill y M.E. Hadjuk. 1977a. Differences in biological characteristics of three Leishmania isolates from patients with espundia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 24: 850-855.
- Walton, B.C.; J.J. Shaw y R. Lainson. 1977b. Observations on the "in vitro" cultivation of Leishmania braziliensis. Journal of Parasitology 63(6): 1118-1119.
- Weigle, K.A.; M. de Davalos; P. Heredia; R. Molineros; N.G. Saravia y A. D'Alessandro. 1987. Diagnosis of cutaneous

and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. *Journal of the Tropical Medicine and Hygiene* 36(3): 489-496.

Wilson, H.R.; B.S. Dieckmann; G.E. Childs. 1979. Leishmania braziliensis and Leishmania mexicana: Experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Experimental Parasitology* 47: 270-283.

Windholz, M. editor. 1976. *The Merck Index*. 9a. edición. Merck and Co., Inc., New Jersey 607.

Zuckerman, A. y R. Lainson. 1977. *Leishmania*. En: *Parasitic Protozoa Vol I*. Kreier, J.F. editor. Academic Press, New York 57-125.