

APENDICE 4

Cultivo de *Leishmania* a partir de muestras de aspirados o de biopsias

En lo posible, utilizar un medio de cultivo de agar con sangre porque son los más fiables para los primeros aislamientos de *Leishmania*. En el caso de la LV, los aislamientos suelen hacerse a partir de aspirados de médula ósea, bazo o ganglios linfáticos. El material aspirado se extrae asépticamente (los aspirados de médula ósea y de bazo se introducen en un anticoagulante) y se inoculan en uno de los medios de cultivo que se describen a continuación. No inocular grandes volúmenes de aspirados de médula ósea o de bazo, porque éstos contienen sustancias inhibitoras del crecimiento de los promastigotes de *Leishmania*. Tomando precauciones de asepsia, inocular dos o, como máximo, tres gotas de aspirado esplénico o de médula ósea en cada tubo para cultivo. Inocular varios tubos e incubar a 25°C o menos. Examinar con un microscopio una pequeña gota de medio de cultivo extraído asépticamente de cada tubo cada 48 horas para examinar el desarrollo de promastigotes. La mayor parte de los cultivos que darán resultado positivo lo harán a los 7-10 días. Los que sigan dando resultado negativo a los 10 días deben traspasarse a ciegas en un medio de cultivo fresco y luego examinarse como antes. Desechar todo cultivo que siga dando resultado negativo al cabo de 20 días.

Preparación de medios de cultivo

Solución de sales equilibrada con prolina (PBSS)

Aunque éste no es un medio de cultivo completo en sí mismo, es un componente de la mayor parte de los medios descritos a continuación, y debe disponerse siempre de existencias del mismo; su composición es:

KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,06 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,185 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
NaCl	8,0 g
L-prolina	1,0 g
Rojo fenol	0,001 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes uno por vez en aproximadamente 70 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 con unos pocos cristales de Tris (Tris[hidroximetil]-aminometano); añadir agua destilada hasta obtener un volumen de 1000 ml, distribuir en botellas con tapa roscada y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacenar preferentemente a 4°C, aunque la solución se puede conservar varios meses a temperatura ambiente.

Medio de Evans aguado «Sloppy Evans»

Uno de los mejores medios de cultivo para el aislamiento de *Leishmania* de pacientes con LV es el de «Sloppy Evans».

Solución de sales equilibrada con prolina (PBSS) (véase más arriba)	85 ml
Peptona bacteriológica	0,1 g
Extracto de carne vacuna	0,03 g
*Sangre de conejo desfibrinada	15 ml
Agar (simple, no nutritivo)	0,3 g

* Sangre de conejo recogida asépticamente y agitada con cuentas de vidrio estériles para eliminar la fibrina.

Mezclar los ingredientes (salvo la sangre de conejo desfibrinada) en una botella con tapa roscada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, enfriar hasta llegar a unos 50°C, añadir la sangre, luego una solución de gentamicina para alcanzar la concentración final de 50 µg/ml de medio (es decir, 5 mg de gentamicina en 100 ml del medio completo como el descrito más arriba). Mezclar bien y distribuir mientras siga líquido en tubos o frascos estériles apropiadas (idealmente 3 ml en un frasco de 7 ml de capacidad). Inocular profundamente en el agar blando el material aspirado del paciente.

Medio bifásico de agar con sangre

a) Medio de NNN

Fase sólida: calentar 1,4 g de agar (simple, no nutritivo), 0,6 g de NaCl y 90 ml de agua destilada, juntos, en un matraz; mantener el contenido bien mezclado hasta que se funda el agar. Transferir el agar fundido a un frasco con tapa de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.; enfriar hasta que llegue a 50 C, añadir 10 ml de sangre de conejo desfibrinada a la que se hayan añadido 5 mg de gentamicina; distribuir en tubos de cultivo o frascos estériles mientras esté fundido, colocar los tubos o frascos en posición inclinada, hasta que el agar se haya fijado; transferir luego a una nevera.

Fase líquida: clásicamente, ésta consiste en el agua que se condensa en el ángulo inferior que forma el plano inclinado con la pared del recipiente, pero en la práctica la mayor parte de los técnicos añaden una fase líquida como la solución de sales equilibradas con prolina (PBSS), o incluso agua destilada estéril. Si se añade líquido, no deben añadirse más de 5 gotas en el fondo de la pendiente formada en un frasco de 7 ml. Inocular el material del paciente en la porción líquida del medio.

b) Medio de USMARU (medio de Difco de agar con sangre)

Fase sólida: 4 g de base de «Bacto» de agar con sangre y 100 ml de agua destilada. La preparación es como la del medio de NNN, inclusive con la adición de sangre de conejo desfibrinada y gentamicina. La fase líquida también es igual a la del NNN.

Notas

Utilización de sangre diferente que la de conejo en medio bifásico. Si no se puede obtener sangre de conejo, vale la pena probar con otra sangre disponible. Las de oveja, caballo o la humana se han utilizado todas con cierto éxito. Utilizarlas desfibrinadas o con un anticoagulante, pero siempre inactivadas por acción del calor (56°C durante 30 min.) antes de la utilización y, si es posible, aumentar a 2% la concentración de agar-agar en el medio.

Almacenamiento. Almacenar a 4°C los tubos preparados; estos medios se utilizan preferentemente una semana después de haberse añadido la sangre, e idealmente deben desecharse al cabo de tres semanas de conservación a 4°C. El medio sin la sangre puede conservarse varios meses a temperatura ambiente.