

## Apêndice 4

### Cultura de *Leishmania* a partir de aspirados ou espécimes biológicos

Sempre que possível, use meios de cultura a base de agar-sangue, como para se obter o isolado inicial da *Leishmania*, uma vez que são os mais confiáveis. Na LV, os isolados são obtidos, principalmente, a partir de aspirados de medula óssea, baço ou linfonodo. O material aspirado é retirado de maneira asséptica, com anticoagulante e inoculado num dos meios de cultura descritos a seguir. Não devem ser inoculados grandes volumes do aspirado de medula óssea ou baço, uma vez que contem substâncias que inibem o crescimento dos promastigotas de *Leishmania*. Inocule, usando precauções assépticas, duas ou, no máximo, três gotas de aspirado de baço ou medula óssea, em cada tubo de cultura. Inocule vários tubos e encube-os a 25°C, ou menos. Em geral, são necessários 7–10 dias para se obter um resultado positivo. As culturas que permanecerem negativas após dez dias devem ser repicadas em meio de cultura fresco e examinadas conforme anteriormente descrito. Descarte qualquer cultura que ainda estiver negativa após 20 dias.

### Receitas de meios de cultura

#### *Solução Salina Tamponada com Prolina (PBSS)*

Embora a PBSS não seja precisamente um meio de cultura, é componente da maioria dos meios descritos a seguir. Assim, deve se ter um estoque de PBSS sempre disponível. Sua composição é a seguinte:

KCl	0,4 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,06 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 gr
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,185 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 gr
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 gr
NaCl	8,0 gr
L-prolina	1,0 gr
vermelho de fenol	0,001 gr
água destilada	1000 ml

Dissolva os ingredientes, um de cada vez, em aproximadamente 70 ml de água destilada. Ajuste o pH em 7.2 usando alguns cristais de Tris (Tris[hidroximetil]-aminometano), complete o volume até 1.000 ml, coloque em frascos de tamanho conveniente, bem tampados. Esterilize em autoclave, a 121 °C, durante 15 minutos. De preferência, armazene a 4 °C, embora a solução possa ser guardada durante vários meses, em temperatura ambiente.

### *Meio “sloppy” de Evans*

Um dos melhores meios de cultura para isolar a *Leishmania* de pacientes com LV é o meio “sloppy” de Evans.

PBSS (ver anterior)	85 ml
Peptona bacteriológica	0,1 gr
Extrato de carne bovina	0,03 gr
Sangue desfibrinado de coelho*	15 ml
Agar (simples, sem nutrientes)	0,3 gr

Misture os ingredientes (*omita o sangue desfibrinado de coelho*) num frasco com tampa de rosca. Esterilize em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos; deixe resfriar até 50 °C adicione o sangue e, a seguir, uma solução de gentamicina, até uma concentração de 50 µg/ml de meio de cultura (por exemplo, 5 mg de gentamicina em 100 ml de meio pronto, conforme descrito acima). Misture bem e coloque, em quanto ainda está derretido, em tubos ou frascos estéreis adequados (recomenda-se 3 ml num frasco de 7 ml de capacidade). Inocule profundamente o material aspirado do paciente no agar “sloppy”.

### *Meio bifásico de agar-sangue*

#### (a) Meio NNN

Fase sólida. Aqueça 1,4 gr de agar (simples, sem nutrientes), 0,6 gr NaCl e 90 ml de água destilada, juntos, num frasco. Mantenha o conteúdo bem misturado até o agar derreter. Transfira o agar derretido para um frasco com tampa de rosca e esterilize-o em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Resfrie a mistura até 50 °C, adicione 10 ml de sangue desfibrinado de coelho, aos quais foram adicionados 5 ml de gentamicina e, a seguir, coloque a mistura, ainda derretida, em

---

\* Sangue de coelho coletada assepticamente e agitada com contas estéreis de vidro, para remover a fibrina.

tubos ou frascos de cultura estéreis. Coloque os tubos ou frascos inclinados até que o agar torne a endurecer e, a seguir, transfira-os ao refrigerador.

Fase líquida. Em geral, consiste da água de condensação que se forma ao longo das paredes dos tubos ou frascos inclinados. Na prática, no entanto, a maioria dos técnicos acrescenta uma fase líquida adicional, como PBSS ou mesmo água destilada. Nesse caso, não adicione mais do que 5 gotas ao condensado obtido num frasco de 7 ml. Inocule o material do paciente na porção líquida do meio de cultura.

(b) Meio USMARU (meio de agar-sangue DIFCO)

Fase sólida. 4 gr de base de agar-sangue 'Bacto' em 100 ml de água destilada. Prepare como o meio NNN, incluindo o sangue desfibrinado de coelho e a gentamicina. A fase líquida também é idêntica à do NNN.

*Observações:*

*Uso de outros sangues, além do de coelho, nos meios bifásicos.*

Se não for possível obter sangue de coelho, vale a pena tentar usar outro sangue disponível. Devem ser usados desfibrinados ou com anticoagulante, mas sempre inativados pelo calor antes de serem usados e, se possível, aumentando a concentração do agar-agar, no meio de cultura, para 2 %.

**Armazenamento.** Armazene os tubos preparados a 4 °C. Os meios de cultura devem ser utilizados até uma semana após serem preparados e, de preferência, descartados após três semanas de armazenamento a 4 °C. Os meios de cultura que não contêm sangue podem ser armazenados a temperatura ambiente, durante vários meses.