

Introdução

Em março de 1995, foi realizado um *workshop* sobre o controle da leishmaniose visceral (LV) no *London School of Hygiene and Tropical Medicine*. O *workshop* fez parte de um projeto de pesquisa financiado pela *Overseas Development Administration-ODA* do Reino Unido, tendo sido organizado e patrocinado conjuntamente pela Organização Mundial da Saúde-OMS e Organização Pan-Americana da Saúde-OPAS, com apoio adicional da Comissão da Comunidade Européia e do *International Development Research Center* do Canadá.

O propósito do *workshop* era:

- (1) Produzir um manual simples de controle da leishmaniose visceral (LV) para comunidades, médicos, médicos veterinários, trabalhadores de saúde pública e pesquisadores.
- (2) Disponibilizar amplamente o manual nas regiões endêmicas e facilitar sua tradução aos idiomas locais.
- (3) Aliar os esforços de controle no Novo e Velho Mundos, e tornar o manual aplicável em ambos.

Existem muitas publicações que tratam do controle de doenças infecciosas, não sendo este o primeiro a focalizar a LV. Entretanto, duas características do *workshop* internacional e do presente relatório são singulares:

- (1) Durante o *workshop*, os subgrupos interativos definiram e responderam á perguntas específicas que defrontam os que trabalham nos diferentes níveis de controle da LV.
- (2) O texto encontra-se dividido em seções, que correspondem às diferentes funções dos indivíduos.

O presente manual não constitui um debate acadêmico sobre os enigmas da pesquisa. Foi projetado de maneira a fornecer um resumo utilizável das questões práticas mais comuns dos que trabalham com LV. Tudo que é preciso para usar o manual é consultar a seção do seu interesse. As Seções 1 a 9 podem ser utilizadas separadamente (com exceção dos resumos relativos ao material, no fim de cada seção), mas, quando necessário, consulte as outras seções indicadas nas referências cruzadas.

Na primeira tentativa com esse tipo de manual, é inevitável que ocorram erros e omissões.

Por favor, envie suas sugestões de aprimoramento do manual ou solicitações de outro *workshop* sobre o tema a quaisquer dos seguintes endereços.

Jorge Arias

OPAS/OMS
S.E.N. Lote 19
70800-400 Brasília, DF
BRASIL
Telefone: +55-61 312-6518
Fax: +55-61 321-1922
Internet: jorge@opas.org.br

Philippe Desjeux

Division of Control of Tropical Diseases
World Health Organization
CH-1211 Genebra 27
SUIÇA
Telefones: +41 22 791-3870/3903
Fax: +41 22 791-4777
Internet: desjeuxp@who.ch

Michael A. Miles

Applied Molecular Biology Unit
Department of Medical Parasitology
London School of Hygiene & Tropical Medicine
Keppel Street
Londres, WC1E 7HT, Reino Unido
Telefone: +44 171 927-2340
Fax: +44 171 636-8739

com resultado sorológico positivo deve ser eliminado, uma vez que certamente é portador ativo da infecção e contribuirá à disseminação da doença humana.

Em geral, os exames parasitológicos são menos sensíveis do que os sorológicos, mas mesmo esses últimos podem falhar, não detectando alguns cães infectados, especialmente aqueles nos estágios iniciais da LV canina.

7.5. Quais são as medidas necessárias de educação de saúde/publicidade?

A primeira prioridade é treinar profissionais de saúde no desempenho eficaz das funções necessárias em cada nível de controle da doença (trabalhadores de atenção primária à saúde, médicos, técnicos de diagnóstico laboratorial, médicos veterinários, etc.).

As escolas e outras organizações (como as comunidades religiosas) devem ser utilizadas como pontos de entrada nas comunidades, para informar e motivar as comunidades a controlar a LV humana (e canina), explicando os benefícios do controle.

Toda atividades de educação de saúde deve ser acompanhada de apoio clínico e intervenção precoce.

Todos os meios de comunicação (cartazes, folhetos, rádio, TV, fotografias, vídeos) devem ser utilizados nas atividades de educação de saúde.

7.6. Quais são as medidas de controle prioritárias?

As intervenções devem ser avaliadas em termos de custo e viabilidade.

A primeira prioridade é o tratamento precoce dos casos de LV humana identificados nas atividades de detecção passiva.

A segunda prioridade é o aprimoramento das atividades de detecção, diagnóstico e tratamento dos casos humanos, especialmente quando o único reservatório é o homem.

A terceira prioridade é o treinamento do pessoal envolvido nas atividades de controle.

Quando o vetor é reconhecidamente endofílico e o número de casos é alto, a borrifação intradomiciliar com inseticidas residuais é uma medida eficaz de controle e a próxima prioridade.

Quando os cães domésticos são os hospedeiros reservatórios, questiona-se, atualmente, a eficácia da detecção e eliminação dos cães infectados como única medida primária de controle (ver Seção 9).

Os diferentes componentes das campanhas de controle da LV devem ser (a) coordenados e integrados (ver Seção 8); (b) implementados na sua totalidade (sem interrupções por falta de recursos); e (c) mantidos durante tempo suficiente para terem o impacto esperado (em geral, vários anos, para a LV).

7.7. Como integrar as medidas de controle da LV aos outros programas de controle de doenças?

A borrifação intradomiciliar com inseticidas deve ser coordenada com outros programas que visam controlar outras doenças transmitidas por artrópodes, como os vetores de malária, doença de Chagas, dengue, encefalite B japonesa, etc.

O controle da LV canina deve ser integrado ao controle da raiva e da hidatíose.

7.8. Que medidas especiais são necessárias nas epidemias?

É indispensável um plano local de ação visando a sustar a epidemia. Esse plano deve ser atualizado anualmente, à luz de novas informações. Deve incluir dispositivos para angariar fundos e alocar recursos nacionais, regionais e locais, para rápido diagnóstico, tratamento e intervenção. Quando o homem é o único reservatório, a primeira prioridade é o tratamento rápido e eficaz dos doentes, a fim de sustar a disseminação da epidemia. É indispensável implementar medidas de controle de vetores e reservatórios, contanto que se tenham informações suficientes acerca do ciclo epidêmico. Uma medida adicional de controle das epidemias é a borrifação espacial por ultra baixo volume (UBV) com inseticidas. O uso de UBV garante a redução imediata, embora de curta duração (apenas algumas horas) e dispendiosa, de grandes populações de flebotomos. Para efeitos de mais longo prazo, é necessário repetir as borrifações a intervalos curtos (em geral, em dias consecutivos, seguidas de borrifações uma ou duas vezes por semana, durante vários meses). Os programas de conscientização da população devem empregar todos os meios disponíveis (imprensa escrita, folhetos informativos, rádio, cartazes, TV, programas educacionais, etc.), em todos os níveis. A população em risco deve receber informações práticas acerca do diagnóstico e tratamento.

7.9. Como avaliar o êxito dos programas de controle?

Pode ser difícil quantificar a diminuição do número de flebótomos e, por si só, essa quantificação não é suficiente para avaliar o êxito das medidas de controle.

O melhor critério de avaliação é a redução anual do número de casos clínicos na população humana.

7.10. Quais são os serviços e o material mínimo/especial necessários nas intervenções de saúde pública (conduta de casos, controle de vetores e cães)?

Estoques de drogas; formulários de notificação; reagentes e material de diagnóstico; inseticidas residuais, material para proteção individual; material para borrifação de inseticidas; treinamento, material didático, folhetos, cartazes e, se possível, material áudio-visual para educação da população; material e reagentes para a eliminação humanitária dos cães infectados.

8. LV e o Ministério da Saúde

8.1. Qual é a infra-estrutura e o quadro de pessoal mínimo/especial necessário nos níveis de atenção primária, secundária e terciária de saúde?

Nível de Atenção Primária. Em geral, corresponde aos postos de saúde, ambulatórios e centros de atenção primária à saúde, que deveriam ter um trabalhador de saúde. Essas unidades são responsáveis pela detecção e notificação dos casos suspeitos.

Nível de Atenção Secundária. São os centros de saúde, que deveriam ter médico, enfermeira, técnico de laboratório e equipe de controle de vetores e, conforme o caso, pessoal de controle de reservatórios animais. Os centros de saúde são responsáveis pela confirmação e pelo tratamento de casos clínicos suspeitos, bem como pelo controle dos vetores e, conforme o caso, controle dos reservatórios. As unidades de atenção secundária à saúde devem assegurar o acompanhamento dos pacientes tratados.

Nível de Atenção Terciária. São os hospitais, que deveriam ser responsáveis pela conduta dos casos graves que precisam ser internados. Os hospitais são responsáveis pela coleta de dados e pela vigilância ativa.

Nível Central. É o Ministério da Saúde, cujas responsabilidades incluem:

- formulação das políticas de saúde pública e das diretrizes de implementação das estratégias nacionais;
- administração financeira e análises de custo-eficácia;
- administração do pessoal;
- fornecimento de materiais: drogas, inseticidas, reagentes para o diagnóstico, material de borrifação;
- treinamento;
- elaboração e distribuição do material de treinamento;
- coleta, análise e divulgação dos dados;
- supervisão geral, avaliação do programa de controle e articulação com outros programas de controle;
- medidas de controle de epidemias;
- cooperação bi- e multilateral;
- articulação com instituições de pesquisa.

8.2. Quais são os serviços e o material mínimo/especial necessários para cada atividade e em cada nível?

As informações acerca do material e dos serviços necessários em cada nível podem ser encontradas na seção pertinente deste documento assim como nos respectivos apêndices.

8.3. Que material de educação de saúde é necessário e como deveria ser divulgado?

Qualquer possibilidade de educação de saúde deve ser aproveitada, e o material deve ser distribuído através de todos os meios de comunicação de massa. O alvo da educação de saúde deve ser cuidadosamente escolhido. As pessoas precisam ter uma percepção clara das possível vantagens do controle da doença. Deveriam ser enviadas diretrizes similares às descritas no presente volume aos níveis apropriados, as quais deveriam ser apoiadas por programas de treinamento.

8.4. Como pode ser assegurado o fornecimento de drogas, inseticidas e reagentes essenciais?

- (a) Incluindo as drogas necessárias de primeira e segunda linha na lista de Drogas Essenciais.
- (b) Negociando contratos competitivos de longa duração para o fornecimento de inseticidas.
- (c) Alocando recursos para as drogas e os inseticidas necessários ao controle da LV, em orçamento separado, a fim de evitar interrupção e manter a continuidade das medidas de controle.
- (d) Quando possível e especialmente no caso de epidemia, criando uma força-tarefa local para coordenar e supervisionar a distribuição e o uso de reagentes, drogas e inseticidas.

8.5. Que recursos de apoio são necessários para enfrentar a epidemia?

- (a) Elaboração de um plano estratégico e designação da força-tarefa.
- (b) Manter estoques de drogas, reagentes, inseticidas e material.
- (c) Disponibilidade de pessoal de reserva para implementar o plano de emergência.
- (d) Apoio logístico, inclusive transporte.

- (e) Envolvimento rápido das outras infra-estruturas: quando não existe uma unidade específica de leishmaniose, outras infra-estruturas existentes de saúde devem ser utilizadas, como a de malária, etc.
- (f) Formulários especiais para a notificação de casos.
- (g) Material de treinamento e educação de saúde.

8.6. Que rede mínima de notificação/comunicação da doença é necessária?

- (a) O meio mínimo essencial de comunicação é a voz (telefone ou rádio), em todos os níveis.
- (b) Comunicação escrita adicional é necessária, em todos os níveis (*courier*, correspondência, fax).
- (c) No nível central, são necessários computadores para a coleta e análise dos dados (e para correio eletrônico, *e-mail*).

8.7. Que atividades de monitoramento das atividades de controle são necessárias?

- (a) Registro das variações no número de casos (por mês e ano), como mudanças na incidência, possivelmente, quando as flutuações na população são acentuadas, porém conhecidas a partir dos dados censitários.
- (b) Controle externo de qualidade, para as atividades de diagnóstico.
- (c) Acompanhamento dos pacientes tratados.
- (d) Monitoramento do uso dos recursos.
- (e) Monitoramento da disponibilidade de pessoal.

8.8. Quais são os benefícios da prevenção e do controle da doença?

- Diminuição do custo de tratamento e hospitalização.
- Continuidade na renda familiar.
- Manutenção da mão-de-obra e da produção.
- Diminuição da morbidade e da mortalidade.
- Continuidade na educação das crianças.
- Ausência de conseqüências sociais.
- Ausência de rupturas na comunidade.
- Manutenção da renda proveniente do turismo.
- Atenção à saúde mais eficaz em relação ao seu custo.

9. LV e o Pesquisador

9.1. São necessárias mais pesquisas (aplicadas, básicas) em LV?

São necessárias mais pesquisas básicas e aplicadas.

9.2. Caso afirmativo, quais deveriam ser os objetivos da pesquisa?

As necessidades prioritárias de pesquisa em LV são as seguintes:

- (a) Desenvolvimento de novas terapias (por exemplo: drogas ou terapias imunológicas) para a LV humana, de preferência drogas que possam ser administradas pela via oral, em dose única ou poucas doses, a preço baixo e sem efeitos colaterais significativos.
- (b) Produção de um exame de diagnóstico da LV, que seja simples, específico, rápido, barato e muito sensível, para a detecção dos anticorpos, de preferência para uso em campo.
- (c) Produção de vacinas eficazes contra a LV.
- (d) Identificação da estratégia sustentável mais apropriada para o controle do vetor (avaliação dos mosquiteiros impregnados de inseticida).
- (e) Análise custo-eficácia das estratégias de controle da LV.
- (f) Métodos aprimorados de diagnóstico e tratamento do PKDL.
- (g) Identificação e quantificação dos fatores de risco envolvidos na aquisição da LV.
- (h) Avaliação do impacto da eliminação dos cães (parasitológica e/ou sorologicamente positivos) na transmissão da LV.
- (i) Desenvolvimento de indicadores da densidade populacional do vetor, para uso em áreas endêmicas e epidemias.
- (j) Compreensão dos mecanismos de resistência da *Leishmania* às drogas.
- (k) Compreensão dos mecanismos das epidemias.

9.3. Qual é a ordem de prioridade dos objetivos de pesquisa?

A ordem de prioridade varia conforme as necessidades de cada país. Cada país deve priorizar as atividades de pesquisa como melhor atender às suas necessidades.

As prioridades gerais de pesquisa e aquelas que terão maior impacto no controle da LV são: desenvolvimento de novas drogas, novos métodos de diagnóstico e novas vacinas, aliado a estudos para analisar as intervenções mais eficazes em relação ao custo. Assim, as prioridades gerais de pesquisa são as relacionadas no parágrafo 9.2., anterior.

9.4. Quais são as fontes de financiamento dessa pesquisa?

Exemplos de fontes conhecidas de financiamento:

- Governos nacionais e agências governamentais.
- Commission of the European Communities
Rue de la Loi 200
B-1049 Bruxelas
BÉLGICA
- International Development Research Centre
P.O. Box 8500
Ottawa, K1G 3H9
Canadá
- National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892-0425
Estados Unidos da América
- Overseas Development Administration
94 Victoria Street
London, SW1E 7JL
Reino Unido
- Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)
World Health Organization
CH-1211 Geneva 27
Suíça
- The Wellcome Trust
183 Euston Road
London, NW1 2BE
Reino Unido

Existem muitas outras fontes potenciais de financiamento, incluindo organizações locais de caridade, patrocinadores comerciais e outras organizações internacionais não-governamentais, as quais devem ser investigadas quando se procura obter financiamento para pesquisa prioritária.

Apêndices

- Apêndice 1:** Distribuição geográfica da LV
- Apêndice 2:** Diferenças regionais da epidemiologia da LV
- Apêndice 3:** Impregnação de mosquiteiros com inseticida
- Apêndice 4:** Cultura de *Leishmania* a partir de aspirados ou espécimes biológicos
- Apêndice 5:** Coloração por Giemsa e hematologia
- Apêndice 6:** Teste de formol-gel
- Apêndice 7:** Teste de aglutinação direta (DAT)
- Apêndice 8:** Teste de imunofluorescência indireta de anticorpos (IFI)
- Apêndice 9:** ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*
- Apêndice 10:** Intradermoreação de Montenegro
- Apêndice 11:** Estoques de drogas, custos e restrições à importação
- Apêndice 12:** Inseticidas e seu uso

Apêndice 1

Distribuição geográfica da LV

61 países

1.1. América Central e América do Sul (11)

Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Venezuela.

1.2. Europa (15)

Albânia, Azerbaidjão, Cazaquistão, Chipre, Espanha, França, Geórgia, Grécia, Itália, Malta, Portugal, Tadjiquistão, Uzbequistão.

1.3. Sudeste Asiático (10)

Afganistão, Arábia Saudita, Iêmen, Iraque, Israel, Jordânia, Líbano, Omã, República Árabe da Síria, República Islâmica do Irã.

1.4. África (20)

Algéria, Angola, Camarões, Chade, Djibuti, Egito, Eritreia, Etiópia, Gâmbia, Guiné-Bissau, Malavi, Marrocos, Níger, Quênia, República Árabe da Líbia, República Centro-Africana, Senegal, Somália, Sudão, Tunísia.

1.5. Ásia (5)

Bangladesh, China, Índia, Nepal, Paquistão.

Apêndice 2.1

LEISHMANIOSE VISCERAL ANTROPONÓTICA		
	SUBCONTINENTE INDIANO	ÁFRICA ORIENTAL
<p><u>DOENÇA CLÍNICA</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Incubação • Distribuição etária • Sexo • PKDL • Surtos 	<p>2 semanas a 6 meses crianças, adolescentes, jovens adultos (70 %, 5–30 anos) masculino > feminino frequente frequentes, altos índices de mortalidade</p>	<p>semanas a meses crianças, adolescentes, jovens adultos (75 %, 5–30 anos) masculino > feminino frequente frequentes, altos índices de mortalidade</p>
<p><u>LEISHMANIA</u> Espécies: Locais:</p>	<p><i>L. donovani</i> SFM/sangue/pele normal</p>	<p><i>L. donovani</i> SFM/sangue/mucosa nasal/pele normal</p>
<p><u>VETOR</u> Espécies: Locais:</p>	<p><i>P. argentipes</i> intra- e peridomiciliar (casas e estábulos)</p>	<p><i>P. orientalis/P. argentipes/P. celiae</i> florestas de acácias + cupinzeiros</p>
<p><u>Reservatório</u></p>	<p>seres humanos</p>	<p>seres humanos</p>
<p><u>Biótopo</u></p>	<p>rural (aldeias)</p>	<p>florestas de acácia casas perto dos cupinzeiros</p>

Apêndice 2.3

LEISHMANIOSE VISCERAL ZONÓTICA		
	CHINA	AMÉRICA CENTRAL/AMÉRICA DO SUL
<u>DOENÇA CLÍNICA</u> <ul style="list-style-type: none"> • Distribuição etária • Sexo • Surto 	<p>95 % crianças < 10 anos masculino > feminino não</p>	<p>70 %, crianças < 5 anos masculino > feminino epidemias em áreas suburbanas</p>
<u>Espécies de LEISHMANIA:</u>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum (L. chagasi)</i>
<u>Espécies de VETORES:</u>	<p><i>P. chinensis</i> <i>P. longiductus (peridoméstico)</i> <i>P. major wui</i></p>	<p><i>Lu. longipalpis (peridoméstico)</i> <i>Lu. evansi</i></p>
<u>Espécies de RESERVATÓRIO</u>	cão/ <i>Nyctereutes procyonoides</i>	cão/raposa/marsupiais
<u>BIÓTOPO</u>	pequenas aldeias (rural)	pequenas aldeias (rural) suburbano (condições sanitárias deficientes)

Figuras A e B

Formatos de dois mosquiteiros confeccionados comercialmente para camas. O mosquiteiro retangular (A) tem quatro pontos para amarrar e o mosquiteiro cônico (B), apenas um. As seções a serem medidas para calcular a área de cada mosquiteiro encontram-se indicadas nos desenhos.

Legendas no mosquiteiro retangular:

TOPO #3

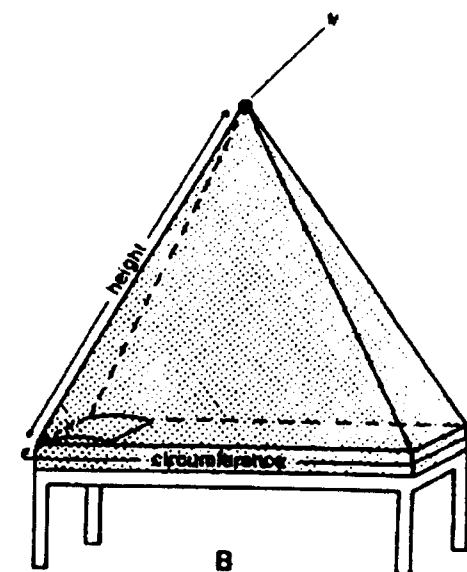
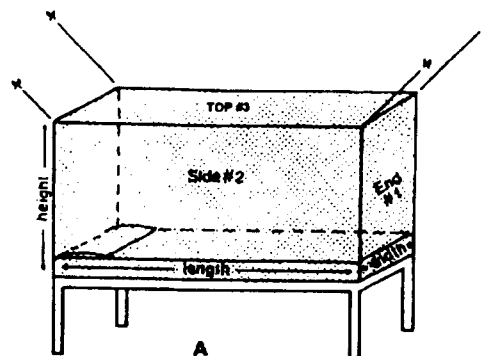
LADO #2

ALTURA (height)

COMPRIMENTO (length)

LARGURA (width)

EXTREMIDADE #1



CIRCUMFERENCE

Legendas no mosquiteiro cônico:

ALTURA (height)

CIRCUNSFERÊNCIA

Apêndice 3

Impregnação de mosquiteiros com inseticida*

O inseticida sempre deve ser misturado com água, e o mosquiteiro deve ser deixado de molho na quantidade apropriada de solução, para que tenha a dosagem necessária depois de secar.

3.1. Cálculo da área do mosquiteiro a ser tratado.

Existe uma grande variedade de mosquiteiros, de confecção doméstica ou industrial, de material grosso/fino e forte/frágil (algodão, náilon, poliéster e outros têxteis), com diferentes tamanhos de malha (número de furos/centímetro quadrado), diferentes espessuras (40, 75, 100 *denier*), graus de resistência, cores, tamanhos (de 8 m² a 25 m²) e formas (cônicos, retangulares, meio-cúbicos, com ou sem entrada ou bainha).

Entretanto, dois tipos principais de mosquiteiros para camas são comercializados. Os mosquiteiros retangulares (Figura A) têm quatro pontos para amarrar, enquanto que os cônicos só têm um. É necessário medir as seções indicadas nas Figuras A e B, para poder calcular a área de cada tipo de mosquiteiro. No Brasil ainda existem mosquiteiros próprios para redes.

3.1.1. Mosquiteiro retangular (Figura A): determine a área de uma extremidade ($S1 = \text{altura} \times \text{largura}, a \times c$), um lado ($S2 = \text{altura} \times \text{comprimento}, a \times b$) e a parte superior ($S3 = \text{largura} \times \text{comprimento}, b \times c$). A seguinte fórmula deverá ser utilizada para estimar a área total a ser tratada: $S = 2 \times (S1 + S2) + S3$.

3.1.2. Mosquiteiro cônico (Figura B): em geral, é pregueado na parte superior, sendo um cilindro e não um cone. Portanto, meça a altura (d), da parte inferior ao topo, e a circunferência, na extremidade mais larga (e). A área total a ser tratada será: $S = e \times d$.

* O seguinte texto foi adaptado de:
WHO/VBC/85.914 e CTD/MAL/SG/VC/BG/93.1

3.2. Quantidade necessária de piretróide de qualidade técnica (ingrediente ativo, i.a.) para tratar a rede (densidade-alvo do depósito):

- permetrina (CE 25 %): a concentração da solução de tratamento deve ser 500 mg i.a./m²;
- deltametrina (CE 2,5 %): 25 mg i.a./m²;
- cipermetrina (CE 10 %): 100 mg i.a./m²;
- lambdacialotrina (CE 2,5 %): 25 mg i.a./m².

3.3. Cálculo da quantidade necessária de piretróide para tratar o mosquito

Depois de determinar a quantidade necessária de produto de qualidade técnica (densidade-alvo do depósito), use a seguinte fórmula para calcular a quantidade necessária de concentrado emulsionável (CE):

$$\frac{\text{densidade-alvo do depósito (g/m}^2\text{)} \times \text{área de filó (m}^2\text{)} \times 100}{\% \text{ de ingrediente ativo no CE}}$$

É preferível usar um concentrado emulsionável do que uma formulação em pó dispersável em água, porque adere melhor ao filó do mosquito e não deixa pó residual.

3.4. Impregnação

- Num recipiente não absorvente, como um saco ou uma bacia de plástico, coloque a quantidade de água necessária para saturar o mosquito, sem escorrer. Um mosquito confeccionado com filó de algodão absorve uma quantidade considerável de água, enquanto que o de nylon não é absorvente e, portanto, precisará de muito menos água para o tratamento com inseticida. Em geral, são necessários 30 ml de água/m² de filó, para os mosquitos de algodão, e 30 ml de água/2 m² de filó, para os de nylon.
- Use luvas e misture cuidadosamente a quantidade calculada de piretróide com a quantidade predeterminada de água, deixando o mosquito de molho (assegure-se de que a mistura cobre totalmente as

fibras) no líquido (emulsão de inseticida), até o filó estar totalmente impregnado.

- Remova o excesso de líquido esfregando e torcendo o mosquiteiro, a fim de obter uma distribuição uniforme do inseticida, por todo o mosquiteiro. O excesso de solução deve ser recolhido.
- Deixe o mosquiteiro secar à sombra, numa área limpa, sobre uma superfície não absorvente, como sacos de polietileno, na posição horizontal, a fim de impedir que o líquido de impregnação escorra. Também pode se deixar secar o mosquiteiro dentro de casa, sobre um colchão sem forrar. **Não use estendedor para secar o mosquiteiro.**
- Quando o mosquiteiro estiver seco, estará pronto para ser usado. O mosquiteiro pode ser guardado durante alguns dias, em papel pardo de embrulho, para uso futuro.

3.5. Precauções

- Use luvas para evitar o contato do inseticida com a pele, especialmente as mucosas. Em caso de contato acidental com o inseticida, enxágüe com bastante água e qualquer sensação de queimadura desaparecerá em algumas horas, sem deixar seqüelas.
- Mantenha todo material longe do alcance das crianças (para impedir o contato com a boca).
- Não lave o mosquiteiro durante a época de transmissão da doença, caso contrário, refaça o processo de impregnação após cada lavada. Embora parte do inseticida permaneça no filó, é mais seguro repetir cuidadosamente o processo de impregnação toda vez que o mosquiteiro é lavado.
- Não disponha de qualquer resto de solução de inseticida em lagos, rios ou criadouros de peixes, uma vez que os piretróides são tóxicos para os animais de sangue frio.
- Só use mosquiteiro resistente ao fogo.

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 ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,06 gr
KH ₂ PO ₄	0,06 gr
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,185 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 gr
MgCl ₂ .6H ₂ 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.

Apêndice 5

Coloração por Giemsa e hematologia

Corante de Giemsa

Reagentes

- Solução de corante de Giemsa (por exemplo, BDH/Merck Ltd., Hunter Boulevard, Magna Park, Lutterworth, Leicestershire, R66; Produto 35086).
- A qualidade do corante de Giemsa varia conforme o lote. Antes de ser utilizado, cada novo lote deve ser verificado usando um organismo conhecido.
- Água destilada tamponada com fosfato, pH 7.2.

KH_2PO_4	0,7 gr
Na_2HPO_4	1,0 gr
água destilada	1,0 litro

- Álcool metílico puro (Analar). Deve ser armazenado em frascos muito bem tampados, para evitar a absorção de água.

Método

1. Prepare esfregaço fino como para os exames rotineiros de hematologia. Assegure-se de que o esfregaço tem uma boa área de leitura (*tail*) e que não alcança a borda lateral da lâmina.
2. Deixe o esfregaço secar ao ar e fixe-o com álcool metílico, durante um minuto.
3. Elimine o excesso de álcool metílico e coloque o esfregaço de encontro à lâmina sobre uma bandeja de corar.
4. Usando uma seringa de 20 ml e agulha romba, dilua o corante concentrado de Giemsa 1:10 com água destilada tamponada. Misture bem e extraia o ar.
5. Infiltre cuidadosamente o corante, usando a seringa e agulha, sob a lâmina, assegurando-se de que nenhuma bolha grande de ar ficou presa. Core durante 25–30 minutos.

6. Após corar, enxágüe rapidamente as lâminas na água corrente e deixe escorrer na posição vertical. Os possíveis parasitas devem ser examinados, em maior detalhe, usando lentes de imersão em óleo. As objetivas de imersão em óleo, de 50X ou 63X, são muito úteis no exame preliminar. Pelo menos 1.000 campos devem ser examinados por um microscopista qualificado.

Observações:

Recomenda-se o método da seringa para a diluição do corante de Giemsa (parágrafo 4, anterior), pois assim que o corante é diluído na água, inicia-se sua precipitação, que é acelerada pela exposição ao ar. Portanto, essa diluição deve ser preparada imediatamente antes de o espécime ser corado; não se deve corar usando corante diluído de estoque. Além disso, quando o espécime é corado nessa posição, na bandeja, se reduz a quantidade de precipitado, e qualquer precipitado que houver desloca-se para longe do esfregaço. Na procura de parasitas intracelulares, é importante que os esfregaços tenham sido corretamente corados.

É **imprescindível** utilizar água tamponada, com pH 7.2, para diluir o corante empregado para parasitas sangüíneos. Só é possível diferenciar o parasita nuclear do material citoplasmático nesse pH alcalino.

Determinação de volume globular (VG) (hematócrito)

O volume globular (VG) é o percentual do volume sangüíneo ocupado pelos eritrócitos. Um baixo VG é indicativo de anemia. Para determinar o VG, um tubo capilar heparinizado é enchido, diretamente, com sangue capilar (por exemplo, de punção com lanceta no dedo ou orelha) ou com sangue venoso coletado com anticoagulante. Uma extremidade do tubo é selada com Plasticina ou por meio de calor. Use a ação capilar para encher os tubos, deixando 10–15mm vazios na ponta do tubo que será selada. O tubo é centrifugado numa centrífuga de hematócrito (a 12.000g), com a ponta selada do tubo encostada na borda externa de borracha da bandeja de centrifugação. Centrifugue durante 5 minutos e leia o VG no leitor de micro-hematócrito colocando a base da camada de hemácias no zero e o topo da camada de plasma nas linhas 100. A posição da linha prateada é ajustada para tocar na interface entre eritrócitos/leucócito/plaquetas, e o volume globular é lido na escala.

O VG (hematócrito) é a relação hemácias depositadas/volume de sangue.

Contagem de leucócitos

Fluido para diluição dos leucócitos:

Ácido acético glacial	2 ml
Azul de metileno a 1 %	1 - 2 gotas
Água destilada	até 98 ml

Após a lise dos eritrócitos, corar os leucócitos. Para a lise, adicionar 20 µl de sangue a 0,38 ml de fluidos de diluição de leucócitos (1 em 20): misturar cuidadosamente. Encher a câmara de contagem do hemacitômetro e deixar descansar em câmara úmida, durante dois minutos. Contar todos os leucócitos numa área de 4 mm².

Contagem de leucócitos

$$= \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^6}{\text{volume contado (0,4)}} = \text{número contado} \times 50 \times 10^6/\text{l}$$

Exemplos de contagens normais de leucócitos, em diferentes grupos etários:

Grupo Etário	Contagem normal de leucócitos
Crianças < 1 ano	6-18 x 10 ⁹ /l
Crianças de 1 a 10 anos	5-14 x 10 ⁹ /l
Adultos	4-11 x 10 ⁹ /l

Determinação de hemoglobina (método de cianometahemoglobina)

Solução para diluição do sangue (solução de Drabkin, pH 7.0 - 7.4)

Cianeto férrico de potássio	200 mg
Cianeto de potássio	50 mg
Di-hidro-ortofosfato de potássio	140 mg
Nonidet P40	1 ml
Água destilada	até 1 litro

Armazenar a temperatura ambiente, em câmara escura (não congelar). *Essa solução é muito tóxica.*

A solução pode ser preparada dissolvendo comprimidos concentrados dos componentes ou diluindo uma ampola do concentrado comercializado.

Adicionar 20µl de sangue coletado com anticoagulante a 4 ml de reagente, misturar bem e deixar descansar a temperatura ambiente, durante três minutos. A densidade ótica é lida no colorímetro, em 540 nm, contra a solução do reagente. Além disso, mede-se separadamente a densidade ótica de um padrão de referência da cianometaemoglobina contra o reagente puro.

A concentração de hemoglobina (gr/l) é calculada da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Densidade ótica do espécime do teste} \times \text{concentração do padrão} \times \text{fator de diluição}}{\text{Densidade ótica do padrão}} = 100$$

Variações normais:

Grupo Etário	Concentração de hemoglobina
Crianças de 1 a 6 anos	110 – 140 gr/l
Homens adultos	130 – 180 gr/l
Mulheres adultas	115 – 165 gr/l

Proteína sérica total

Reagente de Biureto:

Sulfato de cobre (5 H ₂ O)	3 gr
Tartarato sódico de potássio	9 gr
Iodeto de potássio	5 gr
NaOH	24 gr
Água destilada	até 1 litro

Reagente de tartarato alcalino:

Tartarato sódico de potássio	9 gr
Iodeto de potássio	5 gr
NaOH	24 gr
Água destilada	até 1 litro

Adicionar 0,1 ml de soro a 5 ml de reagente Biureto.

Adicionar 0,1 ml de soro a 5 ml de solução de tartarato alcalino.

Deixar descansar os tubos de ensaio a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Calibrar o espectrômetro com um filtro de comprimento de onda de 540 nm, usando 5 ml de reagente de Biureto, e subtrair o valor da densidade ótica da solução de tartarato alcalino.

A proteína total do espécime do paciente pode ser lida a partir da curva de calibração preparada com cinco diluições da solução protéica concentrada ou um soro de controle contendo uma quantidade conhecida de proteína. Existem soluções concentradas liofilizadas, contendo quantidades conhecidas de proteína total, disponíveis comercialmente.

Apêndice 6

Teste de formol-gel

Adicione duas gotas de solução concentrada de formalina (40 % p/v) a aproximadamente 1 ml de soro. No teste positivo, o soro fica branco e se solidifica, formando um gel. No teste negativo, o soro não sofre qualquer mudança e a gelificação só ocorre após algum tempo (30 minutos). A solidificação do soro, sem esbranquecimento, é considerada um resultado negativo para a LV.

O teste de formol-gel também pode ser efetuado com quantidades muito pequenas de soro, numa lâmina de vidro. Misture uma gota de soro e uma pequena gota de solução concentrada de formalina e verifique se ocorre esbranquecimento e solidificação do soro em gel.

Apêndice 7

Teste de aglutinação direta (TAD)

Organismo: Cultura *in vitro* de promastigotas de (uma cepa local de) *L. donovani* / *L. infantum* / *L. chagasi*.

Reagentes:

Solução de Locke:	Glicose	0,25 % (p/v)
	Cloreto de sódio	0,9 % (p/v)
	Cloreto de potássio	0,04 % (p/v)
	Cloreto de cálcio	0,02 (p/v)
	Bicarbonato de sódio	0,02 (p/v)

Solução salina em citrato	Cloreto de sódio	8.77 gr
	Água destilada (completar ate)	1000 ml
	Ajustar o pH para 7.4 adicionando 0,056 M de citrato tri-sódico (16,46 gr/1000 ml).	

Diluyente: Usar solução salina em citrato pH 7.4, contendo 1 % (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor* e 0,1 M de 2-mercapto-etanol (0,2 M para os cães).

Preparação do antígeno:

1. Coletar as promastigotas por centrifugação a 4000 g durante 10 minutos, a 4 ° C.
2. Lavar (5x) a resuspensão em solução fria de Locke e centrifugar a 3.200g durante 10 minutos, a 4 ° C.
3. Preparar a solução de tripsina (0,4 % (p/v) tripsina 1:250 - Difco) em solução de Locke, ajustar o pH para 7.7.
4. Adicionar a solução de tripsina as promastigotas sedimentadas, na proporção de um volume de promastigotas para 20 volumes de solução de tripsina.

* O soro de feto bovino pode ser substituído, no diluyente, por gelatina a 0,2 %. Adicionar a gelatina à solução salina em citrato para alcançar uma concentração final de 0,2 % (p/v); aquecer a 56 ° C, durante 10 minutos, para dissolver a gelatina; deixar esfriar a temperatura ambiente e, a seguir, adicionar 2-mercapto-etanol.

5. Misturar completamente os promastigotas e, a seguir, incubar a 37 ° C, durante 45 minutos.
6. Centrifugar a suspensão (3.200g – 10 minutos) e, a seguir, lavar (5x), conforme o parágrafo 2, anterior.
7. Resuspender o sedimento em solução fria de Locke, até uma concentração de aproximadamente 2×10^8 células/ml.
8. Adicionar o mesmo volume de formaldeído a 2 %, em solução fria de Locke. Deixar descansar a 4 ° C, durante a noite.
9. Centrifugar a 3.200g – 10 minutos, a 4 ° C. Lavar o sedimento em solução salina em citrato fria. Re-suspender até a mesma concentração, conforme o parágrafo 8, anterior.
10. Adicionar corante azul de Coomassie até uma concentração final de 0,1 % (p/v). Misturar em agitador magnético, a velocidade moderada, durante 90 minutos.
11. Centrifugar (3.200 g – 10 minutos) e lavar o depósito (2x) em solução salina em citrato.
12. Resuspender em solução salina em citrato, contendo formaldeído a 0,4 %, até formar o mesmo volume do parágrafo 10, anterior.
13. Armazenar a 4 ° C, protegido da luz. **NÃO CONGELAR.**

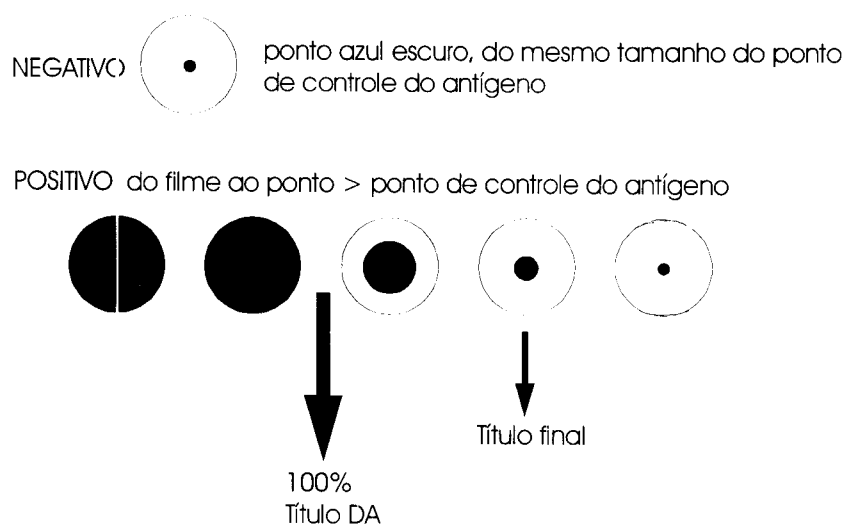
Procedimento para realizar o teste TAD

1. **Usar placas de microtitulação** com poços em forma de “V” e **não** de “U”. Preparar as placas de microtitulação, preencher o formulário correspondente: número da placa, data e código da amostra.
2. Diluir o soro a ser testado 1/100 com solução salina em citrato/FCS/2-mercaptoetanol como diluente. Incubar a 37 ° C, durante 30 minutos.
3. No caso de placa de microtitulação com 12 fileiras, pipetar 50µl de diluente em cada poço, com exceção do poço n° 2.
4. No poço n° 2, pipetar 100 µl da diluição 1:100 do soro sendo testado (ver parágrafo 1, anterior).
5. Transferir 50 µl do poço n° 2 ao poço n° 3, misturar e, a seguir, transferir 50 µl do poço n° 3 ao poço n° 4. Continuar essa operação em série, em toda a placa, descartando os 50 µl retirados do poço n° 12, no fim da placa.
6. Os soros de controle positivo e negativo devem ser sistematicamente incorporados a poços separados.

7. Sacudir suavemente o antígeno TAD para re-suspender os organismos e, a seguir, pipetar 50µl de antígeno no poço n° 12, 50µl de antígeno no poço n° 11 e assim por diante, até colocar antígeno em todos os poços.
8. Cobrir a placa com tampa ou filme plástico, incliná-la suavemente no sentido horário e anti-horário, durante 60 segundos e incubá-la durante a noite, a temperatura ambiente, na posição horizontal, onde não haja perigo de sacudidas. Evitar, cuidadosamente, derramar líquido de um poço para outro.

Leitura do teste: Colocar a placa de microtitulação sobre uma folha simples de papel branco ou uma caixa de luz, e observar a placa de cima para baixo. O teste deve ser lido, separadamente, por duas pessoas.

Figura:



Ponto final: Esse é o último poço onde é possível ver aglutinação, ou seja, o poço anterior a um “botão” azul, de bordas bem delineadas, transparente, no fundo do poço, como aquele visto no poço de controle sem-soro (poço n° 1).

Em geral, os títulos $\geq 1/3200$ são considerados positivos para a LV humana (títulos menores são usados, algumas vezes, para a LV canina).

As placas de microtitulação podem ser utilizadas novamente após a leitura do teste, contanto que sejam lavadas, cuidadosamente, com sulfato dodecílico de sódio a 0,25 %, enxaguadas com água destilada e secadas ao ar. Se possível, recomenda-se usar placas novas.

Apêndice 8

Teste de imunofluorescência indireta de anticorpos (IFI)

Reagentes:

Solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2

NaCl	8 gr
KH ₂ PO ₄	0,2 gr
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,88 gr
KCl	0,2 gr
Água destilada	1000 ml

(Pode ser preparada numa concentração 10X superior à da receita anterior, para melhor armazenamento de longo prazo.)

PBS/Tween a 0,05 % (PBS/T)

Solução de PBS	99,95 ml
Tween 20	0,05 ml

PBS/T/leite em pó a 2 % (PBS/T/M)

Solução de PBS/T	100 ml
Leite desnatado em pó (baixo teor de gordura)	2,00 gr

OBS/glicerol a 10 % (v/v)

Solução de PBS	90,00 ml
Glicerol	10,00 ml

A) Princípio:

O “antígeno de Manguinhos” é utilizado para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* (visceral) e *Leishmania braziliensis* (cutânea). Tem apresentado resultados bastante satisfatórios no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina

Consiste na reação inicial de soros com parasitas (*Leishmania*), fixados em lâmina de microscópica para fluorescência. Numa etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescentes (isotianato de fluoresceína).

B) Material necessário:

- * Soros controle: positivo e negativo;
- * PBS;
- * Conjugado anti-globulina marcada com isotianato de fluoresceína;
- * solução de azul de Evans 0.1 % em PBS;
- * Glicerina tamponada pH 0.6;
- * Água destilada;
- * Lâminas para IF;
- * Lamínulas;
- * Microplacas e micropipetas;
- * Cubas de lavagem;
- * Câmara úmida;
- * Microscópio de fluorescência.

C) Metodologia

- I. Ferver as lâminas e lamínulas em água destilada por 30 min., após a água entrar em ebulição;
- II. Deixá-las estocadas em álcool comercial até o momento de uso, quando deverão ser cuidadosamente secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente;
- III. Pingar 10 ml antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo das lâminas;
- IV. Deixar secar durante 30 min. em temperatura ambiente (evitar atritos com a parte superior da lâmina onde se encontram os parasitos fixados);
- V. Diluir os soros teste (1:40 e 1:80) e os controles positivo e negativo (1:40), em PBS;
- VI. Adicionar 10 ml das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo:
 - A. Os soros controle devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura;
 - B. Deve-se tomar cuidado com as diluições de soro para que não se misturem durante a incubação;
- VII. Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 min./37° C;

- VIII. Lavar as lâminas 3 vezes em PBS em cubas de lavagem (3), 5 minutos em cada banho;
- IX. Lavar rapidamente as lâmina (uma vez) em água destilada;
- X. Colocar as laminas por aproximadamente 10 min/37° C para secar (não exceda muito nesta etapa);
- XI. Diluir o conjugado fluorescente, previamente titulado (vide bula do conjugado), em PBS contendo 0.004% de azul de Evans;
- XII. Adicionar 15 ml da diluição do conjugado em cada orifício da lâmina;
- XIII. Incubar as lâminas 3 vezes com PBS em cubas de lavagem (5 min. para cada banho);
- XIV. Lavar rapidamente as lâminas 1 vez em água destilada;
- XV. Colocar as lâmina por aproximadamente 10 min/ 37° C para secar (não exceda muro nesta etapa);
- XVI. Montar as laminas com glicerina tamponada e lamínulas;
- XVII. Levar as laminas ao microscópio de fluorescência e:
 - A. Focalizar o orifício do soro controle negativo e observar a fluorescência;
 - B. Focalizar o orifício do soro controle negativo e observar o "background" (coloração de fundo) do teste;
 - C. Focalizar os orifícios dos soros teste e considerar reativo aqueles que apresentarem fluorescência mais intensa que o "background", observando no orifício do soro controle negativo (considerar não reativo os soros que apresentarem fluorescência semelhante ao do controle negativo);
 - D. Serão considerados reativos todos os soros que apresentarem positividade a partir da diluição 1/40, inclusive.

Apêndice 9

ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

Reagentes:

Tampão de Ligação (TL)

Na ₂ CO ₃	1,59 gr
NaHCO ₃	2,93 gr
NaN ₃	0,2 gr
Água destilada	até 1 litro

(Pode ser preparada numa concentração 10X superior à da receita anterior, para melhor armazenamento de longo prazo.)

TL/leite em pó a 2 %

TL	100 ml
Leite desnatado em pó (baixo teor de gordura)	2,00 gr

Solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2

NaCl	8 gr
KH ₂ PO ₄	0,2 gr
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,88 gr
KCl	0,2 gr
Água destilada	1000 ml

(Pode ser preparada numa concentração 10X superior à da receita anterior, para melhor armazenamento de longo prazo.)

PBS/Tween a 0,05 %

Solução de PBS	99,95 ml
Tween 20	0,05 ml

PBS/T/leite em pó a 2 % (PBS/T/M)

Solução de PBST	100 ml
Leite desnatado em pó (baixo teor de gordura)	2,00 gr

Tampão de fosfato em citrato, pH 5.5

Solução A

Ácido Cítrico	2,1 gr
Água destilada	até 100 ml

Solução B

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,5 gr
Água destilada	até 100 ml

Adicionar 48,5 ml da Solução A á 51,5 ml da Solução B.

Solução de substrato (para o conjugado de HRP peroxidase)

Hydrocloreto de O-fenillenediamina (OPD)	0,040 gr
Tampão de fostato em citrato, pH 5.5	100 ml
Peróxido de hidrogênio (a 3 %)	30 µl

Preparação do antígeno do ELISA

A promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi* são cultivada em meio líquido, e a promastigotas da fase log são coletada numa concentração de aproximadamente 1×10^6 células/ml. As células sedimentadas são lavadas (3x), de preferência a 4 °C, com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) e congeladas a -20 °C. O sedimento congelado é descongelado a temperatura ambiente e resuspendido em água destilada estéril, numa concentração de 1:40 (v/v). As células são rompidas mediante congelamento rápido em nitrogênio líquido e descongelamento em água a 37 °C (3x). Se possível, aplica-se ultra-som durante 15 segundos (5x). As células rompidas são centrifugadas em alta velocidade (por exemplo, 10.000 g), a 4 °C, durante 15 minutos, e o supernadante é armazenado congelado, a -20 °C, para uso como antígeno no ELISA.

Revestimento dos poços do ELISA

São usadas placas de microtitulação de poliestireno ou similares, mas sempre as recomendadas especificamente para o ELISA. A diluição de antígeno utilizada no revestimento dos poços é determinada por um experimento em “tabuleiro de xadrez”, usando diferentes diluições do antígeno, contra controles positivos e negativos do soro, bem como várias diluições experimentais diferentes do conjugado. As diluições do antígeno são preparadas em tampão de carbonato para ligação, pH 9.6. Para revestir os poços, pipeta-se 100 µl de antígeno diluído nos poços, que são mantidos a 4 ° C até o dia seguinte. Os poços são lavados (3x) com PBS e bloqueados com tampão de ligação/leite em pó a 2 %, durante uma hora, a 37 ° C, sendo lavados novamente (3x) com PBS.

Realização do ELISA

Preparar uma diluição 1:200 dos soros, em PBS/T/M. Fazer outras diluições, por exemplo, dobrando as diluições se for necessário determinar os títulos dos soros. Adicionar, imediatamente, a cada poço, 100 µl de conjugado das diluições dos soros para cada poço revestido de uma placa ELISA de 96 poços. As placas são incubadas por uma hora a 37° C numa câmara húmida e logo lavadas (3x) com PBS/T. Imediatamente a cada poço deve-se acrescentar 100 µl de conjugado de peroxidase de imunoglobulina G (H + L) anti-humana monoclonal, conjugada com peroxidase, purificada por afinidade, rotulada com peroxidase de raiz-forte (HRP) ou fosfatase alcalina (ALP) em diluição 1:1.000 ou 1:2.000 em PBS/T/M, e incubar a 37 ° C durante uma hora. A diluição ótima do conjugado é determinada mediante titulação em “tabuleiro de xadrez”. No caso de LV canina, utilizar conjugado de imunoglobulina G (H + L) anti-canina de coelho. Após incubação, lavar novamente (3x) as placas com PBS/T e adicionar 100 µl de solução de substrato. Deixar as placas descansar a temperatura ambiente, durante 15 minutos, em câmara escura, e depois sustar a reação adicionando 50 µl de H₂SO₄ 2,5 M. Ler os resultados no leitor de placas do ELISA, usando um filtro de 492 nm, até 30 minutos após o fim da reação. Todas as placas devem incluir soros de controle negativo e positivo. Em geral, os testes são duplicados. As variações diárias nas condições do teste podem ser ajustadas com uma amostra positiva de referência, da seguinte maneira:

$$\frac{\text{densidade ótica da amostra do teste}}{\text{densidade ótica do positivo de referência}} \times 1.$$

Apêndice 10

Intradermoreação de Montenegro

Solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.2)

NaCl	8 gr
KH ₂ PO ₄	0,2 gr
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,88 gr
KCl	0,2 gr
Água destilada	até 1 litro

(Pode ser preparada numa concentração 10X superior à da receita anterior, para melhor armazenamento de longo prazo.)

Diluyente para teste de intradermoreação

NaCl	5 gr
NaHCO ₃	2,75 gr
Fenol	4,0 gr
Água destilada	até 1 litro
estéril	

As promastigotas cultivadas de *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi* são lavadas (3x) com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS), por centrifugação e resuspensão, de preferência a 4 °C. O sedimento final é resuspendido em diluyente para teste de intradermoreação, em concentração entre 5 x 10⁶ promastigotas/ml a 4 x 10⁸ promastigotas/ml. Antes de serem usadas, é necessário diluir as soluções concentradas até 1 x 10⁶ promastigotas/ml. Tanto as soluções concentradas, quanto os antígenos diluídos, podem ser armazenados a 4 °C, durante 12 meses. Pode-se utilizar tiomerosal como fonte alternativa de fenol, para evitar a contaminação. Em muitos países, é possível comprar antígenos para o teste de intradermoreação de fontes comerciais.

Injeta-se 0,1 ml de preparado de antígeno, pela via intradérmica, no antebraço do paciente (após limpar o antebraço com álcool a 70 %). O teste de controle é efetuado injetando solvente, pela via intradérmica, no outro antebraço.

O diâmetro da induração no local da inoculação pode ser delineado 48 ou 72 horas após a inoculação, com uma caneta esferográfica, e a tinta copiada com um pedaço de fita gomada; a fita gomada com a marca de tinta fornece um registro permanente para cada paciente. (Pode-se usar um pedaço de papel umedecido com álcool em lugar da fita gomada.) Um diâmetro médio > 5mm é considerado resultado positivo do teste de intradermorreação.

Em geral, o teste de intradermorreação de Montenegro é negativo em pacientes com LV ativa, mas a reação positiva está associada à cura clínica, podendo ocorrer em pacientes assintomáticos que se presume foram expostos à infecção.

É difícil comparar os estudos anteriores usando testes de intradermorreação, devido à falta de uniformidade nos tipos e nas dosagens de antígenos empregados. É importante usar antígenos corretamente padronizados e avaliados. O desenvolvimento de antígenos para o teste de intradermorreação, sob o patrocínio da OMS, é um avanço significativo nesse respeito.

Apêndice 11

Estoques de drogas, custos e restrições à importação

11.1. Antimoniais Pentavalentes

– **Stibogluconato de sódio (100 mg/ml)**

Wellcome, Hale Court Greencourts Business Park, Styal Road,
Manchester,
M22 5LQ, Reino Unido.
Tel.: + +44.161.435.93.72. Fax: + +44.161.435.93.63.

Custo médio por tratamento de LV: **US\$150**
(20 mg Sb5+/kg/dia, durante 30 dias e peso médio de 60kgs).

– **Antimoniato de Meglumina (85 mg/ml)**

Rhône-Poulenc Rorer, 20 Avenue Raymon Aron,
92165 Antony Cedex, França.
Tel.: + +33.1.40.91.61.23/+ +33.1.40.91.71.44
Fax: + +33.1.40.91.70.91.

Custo médio por tratamento de LV: **US\$120.**

Rhône-Poulenc Rorer, 20 Avenue de Leganes, 62
Apartado 196, 28925 Alcorcon, Madrid, Espanha.
Tel.: + +34.1.685.82.00
Fax: + +34.1.643.16.88.

Rhodia Farma Ltda. Divisão Farmacêutica.
Av. das Nações Unidas, N° 22428
Bairro Jurubuta
04795-100 São Paulo, SP, Brasil
Tel.: + +55.11.546.68.22
Fax: + +55.11.523.69.91

– **Gluconato sódico de antimônio (100 mg/ml)***

Albert Davis Ltd. 4/11 Asaf Ali Road
Nova Delhi, 110002, Índia.
Tel.: + +91.11.32.77.667. Fax: + +91.22.32.70.220
ou + +91.22.32.82.675.

Albert Davis Ltd. 5/11 D. Gupta Lane
Cálcuta.50, Índia.

* Custo médio por tratamento de LV: **US\$16.**

Anoco Pharmaceuticals, Private L.t.d. Brahmapuria,
P.O.M.I.T., Muzaffarpur, Bihar State, 842003, Índia.

* Custo médio por tratamento de LV: **US\$16.**

11.2. Drogas de Segunda Escolha

– **Anfotericina B (50 mg/unidade)**

Bristol, Myers, Squibb, Pharmaceuticals Ltd.
Moreton, Wirral, Merseyside, L46-1QW
Reino Unido.
Tel.: + +44.151.604.23.24
Fax: + +44.151.604.01.89.

– *Bristol, Myers, Squibb, African Division*
Les Collines de l'Arche
90057 Paris La Defense Cedex, França.
Tel.: + +33.1.40.90.63.49
Fax: + +33.1.40.90.91.43
ou + +33.1.40.90.91.90.

Custo médio por tratamento de LV: **US\$60**
(se a dose total = 1g)

* Controle de qualidade em avaliação.

– **Sulfato de aminosidina (500 mg/unidade)**

Pharmacia and Upjohn

Via Robert Koch 12

20152 Milão, Itália.

Tel.: + +39.2.4838.1

Fax: + +39.2.4838.2734.

Custo médio por tratamento de LV: **US\$50**

(se 20 mg/kg/dia, durante 21 dias e peso médio de 60kgs).

– **Isotionato de pentamidina (200 mg/unidade)**

Sedafarme

17, rue d'Orleans

92200 Neuilly sur Seine, França.

Tel.: + +33.1.47.45.05.06

Fax: + +33.1.47.45.39.23

Custo médio por tratamento de LV: **US\$70**

(se 4 mg/kg em dias alternados).

Apêndice 12

Inseticidas e seu uso

As características importantes dos inseticidas residuais formulados são:

- Alta toxicidade biológica para as espécies vetores. A OMS disponibiliza um “kit” de teste, com instruções acerca de como testar a susceptibilidade dos flebótomos.
- Efeito repelente ou irritante tão baixo quanto possível.
- Toxicidade aguda e/ou crônica baixa para os seres humanos e animais domésticos. Quando aplicado corretamente, o risco de contaminação do ambiente externo é mínima.
- Todas as propriedades relacionadas anteriormente, a baixo custo.

Esses critérios são importante na escolha do ingrediente ativo apropriado e da sua formulação.

12.1. Organoclorados

O DDT ainda é considerado uma boa escolha para borrifação residual intradomiciliar, no controle de flebótomos endofílicos, de maneira eficaz em relação ao custo. O composto é estável, de baixo custo, muito eficiente, possui longa ação residual e é relativamente seguro para os operadores e habitantes das casas borrifadas. O DDT, como PM a 75 %, é aplicado na dosagem de 1 a 2 gr de i.a./m². Os flebótomos ainda são muito susceptíveis ao DDT. Em muitos países, a proibição do produto, por motivos de contaminação ambiental, tem dificultado o uso do DDT. Além das considerações político-ecológicas, é indispensável comparar o DDT com outros produtos, levando em conta que os novos produtos oferecem vantagens operacionais e podem ser mais custo-eficazes do que o DDT.

12.2. Inseticidas organofosforados

- As atividades de borrifação não devem se prolongar além de cinco horas por dia, e a atividade da colinesterase deve ser verificada.
- O Malation, PM a 50 %, é aplicado na dosagem de 2 gr de i.a./m². Seu cheiro pode diminuir a aceitação do produto pela comunidade.

12.3. Piretróides sintéticos

Os piretróides foto-estáveis possuem toxicidade muito alta para flebótomos e baixa toxicidade para mamíferos. São empregados na borrifação residual domiciliar, para proteção individual e nebulização espacial.

– Borrifação residual domiciliar

Entre outros, são utilizados os seguinte piretróides:

- deltametrina: FW a 5 % para dosagem-alvo de 25 mg de i.a./m²,
- permetrina: PM a 25 % para dosagem-alvo de 125 mg de i.a./m²,
- cipermetrina: PM a 10 % para dosagem-alvo de 125 mg de i.a./m²,
- cipermetrina: MC a 10 % para dosagem-alvo de 125 mg de i.a./m².

– Mosquiteiros impregnados

- deltametrina: CE a 2,5 % para dosagem-alvo de 25 mg de i.a./m²,
- permetrina: CE a 25 % para dosagem-alvo de 500 mg de i.a./m²,
- lambdacihalotrina: CE a 2,5 % para dosagem-alvo de 25 mg de i.a./m²,
- cipermetrina: CE a 10 % para dosagem-alvo de 100 mg de i.a./m².

O objetivo é reduzir os dois fatores principais de capacidade vetorial, ou seja, contato do homem com o vetor e duração de vida dos vetores. Ao contrário dos mosquiteiros não-impregnados, em que os vetores são desviados para pessoas desprotegidas, os mosquiteiros impregnados funcionam como armadilhas. Os piretróides induzem um efeito rápido atordoante nos flebótomos que entram em contato com as superfícies tratadas. Além disso, os mosquiteiros impregnados fornecem proteção individual. Uma boa cobertura do uso de mosquiteiros

impregnados é necessária à obtenção de um impacto na capacidade vetorial, na transmissão e, indiretamente, na carga de doença da população.

Os piretróides foto-estáveis são particularmente apropriados para a impregnação dos mosquiteiros, porque possuem longa persistência e são relativamente seguros para o homem. A permetrina, deltametrina, lambdacihalotrina e ciperrmetrina estão sendo avaliados como possíveis alternativas de controle de vetores em focos antroponóticos de leishmaniose. A permetrina é mais ativa em poliéster e nylon do que no algodão, mas a deltametrina não apresenta maiores diferenças em função do tipo de material do mosquiteiro.

Entretanto, recomenda-se utilizar poliéster ou uma combinação de poliéster e algodão na confecção de mosquiteiros, devido à sua durabilidade.

Cerca da metade da dose de piretróide será removida na lavagem do mosquiteiro em água fria com sabão. Aliás, lavar os mosquiteiros causa grande perda de inseticida. Após a lavagem, os mosquiteiros precisam ser novamente tratados.

– Ultra baixo volume

A borrifação espasial é efetuada com atomizadores de aerossol frio (ultra baixo volume). Os flebótomos em vôo entram em contato com as pequenas partículas de inseticida suspensas no ar. O efeito letal é rápido, mas muito breve. As condições meteorológicas desfavoráveis podem prejudicar o impacto final. Essa técnica pode ser utilizada para os vetores exofílicos, durante os surtos epidêmicos.

A eficácia do controle químico dos vetores na redução da capacidade vetorial depende mais da ecologia local e do comportamento dos vetores do que da seleção do inseticida a ser utilizado. Além disso, a frequência das aplicações, com cronograma indicando rodadas de pulverização ou reimpregnação, deve ser sincronizada com os picos sazonais de transmissão.*

* O texto anterior é adaptação de:
CTD/MAL/SG/VC/BG/93.1 e
CTD/MAL/SG/VC/WO/93.9.

Abreviaturas

ALAT	alanina aminotransferase
ALP	fosfatase alcalina
ASAT	aspartato aminotransferase
cc	centímetro cúbico
CE	concentrado emulsificante
CL	contagem de leucócitos
cm	centímetro
CMV	citomegalovírus
d.a.	dose-alvo
dl	decilitro (100 ml)
ECG	eletrocardiograma
ELISA	teste imunoenzimático
g	força g (centrifugação)
gr	grama
Hb	hemoglobina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
hr	horas
i.a.	ingrediente ativo
IFI	teste de imunofluorescência indireta
kg	quilograma
l	litro
LCD	leishmaniose cutânea difusa
LV	leishmaniose visceral
M	molar
ME	micro-encapsulado
mg	miligrama
min	minutos
ml	mililitro
mm	milímetro
mMol	milimolar
p/v	peso por volume
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PKDL	leishmaniose cutânea pós-calazar
PM	pó molhável
SFM	sistema fagocítico mononuclear
SFB	soro fetal bovino

TAD	teste de aglutinação direta
TSE	taxa de sedimentação eritrocitária
UBV	atomização por ultra baixo volume
µl	microlitro
VG	volume globular
vol	volume

Ilustrações

Relação e créditos dos diapositivos (em ordem de citação)

1. Espleno hepatomegalia na LV humana (Desjeux).
2. Febre irregular prolongada na LV humana (Bryceson).
3. Lesões cutâneas nodulares na PKDL (El Hassan).
4. Descorção cutânea na PKDL, Sudão (El Hassan).
5. Lesões faciais extensas na PKDL tardia, Sudão (El Hassan).
6. Lesões faciais extensas na PKDL tardia, China (Bryceson).
7. Flebótomo sobre a pele (Meddia).
8. Picadas de flebótomo (Vexenat).
9. Proteção individual por mosquiteiro impregnado com inseticida.
10. O mosquiteiro impregnado com inseticida pode fornecer proteção contra picadas de flebótomo.
11. Grande número de flebótomos (*Lutzomyia longipalpis*) encontrado em galinheiros (Vexenat).
12. Os chiqueiros também podem ser infestados com grande número de *Lutzomyia longipalpis* (Vexenat).
13. Borrifação de abrigos de animais com inseticida residual (Desjeux).
14. Cão aparentemente sadio com LV canina assintomática. Foi detectado grande número de amastigotas na pele da borda das orelhas (Miles).
15. LV canina: perda de pelo em torno dos olhos, no focinho e nas orelhas (Vexenat).
16. Lesões cutâneas e emaciação grave na LV canina (Vexenat).
17. Úlceras cutâneas em torno da boca na LV canina (Vexenat).
18. Patas alongadas e deformadas na LV canina (Desjeux).
19. Secreção purulenta dos olhos na LV canina (Alvar).
20. Ceratoconjuntivite na LV canina (Alvar).
21. Gotas de sangue em papel de filtro para testes sorológicos (Desjeux).
22. Meio de cultura NNN (Alvar).
23. Aspirado de linfonodo (Davidson).
24. Aspirado de baço (Davidson).
25. Amastigotas em medula óssea (Davidson).
26. Amastigotas em medula óssea (Davidson).
27. Amastigotas em aspirado de baço (Davidson).
28. Promastigotas de *Leishmania* crescendo em meio de cultura (Alvar).

29. Inversão (A) da razão albumina/globulina na LV humana, restaurada após tratamento (B) (Bryceson; Meddia).
30. Teste de formol-gel (Peters; Meddia).
31. Teste de aglutinação direta (Evans).
32. Teste de imunofluorescência indireta-IFI (Alvar).
33. Teste imunoenzimático-ELISA (Alvar).
34. Resultado positivo de teste de intradermorreação.
35. Tratamento da LV em áreas remotas do Sudão (Desjeux).
- 36.
37. Aspirado de linfonodo na LV canina (Marty).
38. Operações de campo de controle da LV (Desjeux).

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer:

Aos Drs. Jeff J. Shaw e Odair Genaro pela revisão da tradução ao Português e por seus valiosos comentários.

À Senhora Suzzanne Sobral pela tradução.



Gráfica e Editora Brasil Ltda.

SIG - Q. 08 - Nº 2378 - Fone: 344-1614

Fax: 344-1613 - Brasília-DF