

CELIA MARIA SILVA PEDROSA

**DIAGNÓSTICO E SEGUIMENTO DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA
PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**



**Recife
2005**

CELIA MARIA SILVA PEDROSA



**DIAGNÓSTICO E SEGUIMENTO DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA
PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

ORIENTADORA

PROFA. DRA. ELIZABETH MALAGUEÑO DE SANTANA

**RECIFE
2005**

Pedrosa, Celia Maria Silva

Diagnóstico e seguimento de pacientes com leishmaniose visceral americana pela reação em cadeia da polimerase / Celia Maria Silva Pedrosa. – Recife : O Autor, 2005.

83 folhas : il., tab., fig.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2005.

Inclui bibliografia anexos e apêndices.

1. Medicina tropical – Parasitologia. 2. Doenças parasitárias – Leishmaniose visceral americana – Teste diagnóstico. 3. Indivíduos com suspeita da doença – Reação em Cadeia da Polimerase – Sangue da medula óssea e sangue periférico. 4. PCR, sangue periférico – Critério de cura. I. Título.

**616.993
616.9364**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-276**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

PROF. AMARO HENRIQUE PESSOA LINS

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROF. CELSO PINTO DE MELO

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROF. JOSÉ TADEU PINHEIRO

DIRETOR SUPERINTENDENTE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS

PROFA. HELOÍSA MENDONÇA

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
EM MEDICINA TROPICAL**

PROFA. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

PROFA. MARIA ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COELHO

CORPO DOCENTE

PROFA. CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO

PROFA. ELIZABETH MALAGUEÑO DE SANTANA

PROFA. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO

PROFA. GERUSA DREYER VIEIRA

PROF. JOAQUIM ALFREDO ALVES NORÕES

PROFA. MARIA AMÉLIA VIEIRA MACIEL

PROFA. MARIA DE FÁTIMA PESSOA MILITÃO DE ALBUQUERQUE

PROFA. MARIA ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COELHO

PROF. RICARDO ARRAES DE ALENCAR XIMENES

PROFA. SÍLVIA MARIA DE LEMOS HINRICHSEN

PROFA. VERA MAGALHÃES DA SILVEIRA



RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

CÉLIA MARIA SILVA PEDROSA

No dia 12 de dezembro de 2005, às 14h00, na Sala Prof. Murillo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – C.C.S./UFPE, os Professores: Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda Filho (Depto. de Clínica Médica-UPE – Membro Externo), Prof.^ª Dr.^ª Eliana Maria Maurício da Rocha (Depto. de Patologia-UFAL – Membro Externo), Prof.^ª Dr.^ª Heloísa Ramos Lacerda de Melo (Depto. de Medicina Clínica-UFPE – Membro Interno), Prof.^ª Dr.^ª Maria Amélia Vieira Maciel (Depto. de Medicina Tropical-UFPE – Membro Interno) e Prof.^ª Dr.^ª Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti (Instituto de Ciências Biológicas-UPE – Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüíram a doutoranda CÉLIA MARIA SILVA PEDROSA sobre a sua Tese intitulada "Diagnóstico e seguimento de pacientes com Leishmaniose visceral americana através da Reação em Cadeia da Polimerase". Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda Filho

Aprovada

Prof.^ª Dr.^ª Eliana Maria Maurício da Rocha

Aprovada

Prof.^ª Dr.^ª Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Aprovada

Prof.^ª Dr.^ª Maria Amélia Vieira Maciel

Aprovada

Prof.^ª Dr.^ª Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Aprovada

Demócrito de Barros Miranda Filho
Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda Filho

Eliana Maria Maurício da Rocha
Prof.^ª Dr.^ª Eliana Maria Maurício da Rocha

Heloísa Ramos Lacerda de Melo
Prof.^ª Dr.^ª Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel
Prof.^ª Dr.^ª Maria Amélia Vieira Maciel

Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti
Prof.^ª Dr.^ª Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado às *crianças*,
vítimas silenciosas da leishmaniose visceral,
espalhadas pelas mais diferentes regiões do mundo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes**, Coordenador do Curso de Mestrado e Doutorado em Medicina Tropical da UFPE, por sua incansável disponibilidade em nos ajudar em todas as etapas de nossa formação.

À **Profa. Elizabeth Malagueño de Santana**, pela orientação, ensinamentos e sugestões.

Aos meus **pacientes**, cujo estímulo me fez ultrapassar os sucessivos empecilhos.

A **Dra. Celina Lacet**, cujo incentivo e disponibilidade foram fundamentais na elaboração do projeto de pesquisa.

Aos colegas e amigos **Drs. Gilberto Fontes, Eliana Maria M. da Rocha, Marione Cortez Pessoa e Daniel Gitaí**, que estiveram presentes em todas as dificuldades relativas à natureza própria do trabalho de pesquisa.

Aos colegas do Hospital Escola **Dr. Hélvio Auto**, pelo apoio durante toda a realização deste estudo.

À equipe que integra o Serviço de Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, chefiada pelo **Prof. Eduardo Ramalho**, cujo trabalho foi importante na elaboração desta tese.

Meu agradecimento especial à **Profa. Dra. Eliana Maria M. da Rocha**, por ter cedido o laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas da UFAL onde parte das reações foi feita.

Ao **Prof. Wendell Almeida**, cuja valiosa colaboração foi importante para a conclusão desta pesquisa.

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)** e a CAPES, cuja ajuda financeira foi decisiva na execução do projeto de pesquisa e para o curso.

A **Dra. Maria de Fátima Torres Thomas**, que cuidadosamente fez a versão do resumo, para a língua inglesa.

Às **Dras. Terezinha Tenório e Vânia Andrade**, que tornaram mais agradável minha permanência em Recife.

Aos meus **amigos**, que pacientemente me acolheram quando tudo parecia desalentador e impossível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Leishmaniose visceral como problema de saúde pública.....	02
1.1.1 Expansão territorial.....	02
1.1.2 Aspectos relacionados à transmissão.....	07
1.2 Leishmaniose visceral americana como problema clínico.....	09
1.2.1 Aspectos relacionados ao tratamento e à alta.....	17
1.3 Justificativa.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	24
3.1 Desenho do estudo.....	25
3.2 Local e população do estudo.....	25
3.3 Tamanho da amostra.....	26
3.4 Definição das variáveis.....	26
3.4.1 Definição dos grupos.....	26
3.5 Coleta de dados.....	28
3.5.1 Admissão hospitalar.....	28
3.5.2 Alta.....	28
3.5.3 Seguimento.....	29
3.6 Padronização das técnicas.....	29
3.6.1 Extração do DNA total.....	31
3.6.2 Detecção do DNA do parasito através de PCR.....	32
3.6.3 Visualização e fotodocumentação dos produtos de amplificação.....	33
3.7 Análise estatística.....	33
3.8 Aspectos éticos.....	34
RESULTADOS.....	35
4.1 Característica geral da amostra.....	36
4.2 Resultado da PCR de pacientes admitidos com a hipótese de diagnóstico de	

LVA.....	40
4.2.1 Teste aplicado no sangue aspirado da medula óssea.....	40
4.2.2 Teste aplicado no sangue periférico.....	42
4.2.3 Pacientes com e sem LVA.....	42
4.2.3.1 Validade da PCR testada no sangue aspirado da medula óssea.....	42
4.2.3.2 Validade da PCR no sangue periférico.....	43
4.2.3.3 Concordância da PCR em sangue periférico e medular.....	43
4.3 Avaliação em um grupo de pacientes com LVA através da técnica da PCR e pela redução das vísceras, durante a evolução da doença.....	44
4.4 Comparação entre os pacientes sem LVA e com PCR positiva (falso positivos) e PCR negativa.....	46
4.5 Comparação entre pacientes com LVA que tiveram o sangue testado pela PCR com aqueles que não tiveram.....	47
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	59
8. ANEXO.....	72
9. APÊNDICES.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	– ácido desoxirribonucléico
DP	– desvio padrão
EDTA	- ácido etileno diamino tetra acético
FG	– fentograma
GFX	– gama cephadex
HEHA	– Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto
IFI	- Imunofluorescência indireta
Kb	– kilobite
LVA	- leishmaniose visceral americana
μL	– microlitro
Mg/mL	– miligrama por mililitro
mL	– mililitro
mm ³	– milímetro cúbico
OMS	– Organização Mundial de Saúde
Pb	– pares de bases
PCR	– Polimerase Chain-Reação (Reação em Cadeia da Polimerase)
PPD	- Derivado protéico purificado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
RCD	– rebordo costal direito
RCE	– rebordo costal esquerdo
Rpm	– rotações por minuto
SMF	- sistema monocítico fagocitário
SUS	- superintendência de saúde
TA	- temperatura ambiente
TBE	– tampão tris-ácido bórico – ácido etileno diaminotetracético
TE	– tampão tris-ácido clorídrico – ácido etileno diaminotetracético

TNF	- Fator de necrose tumoral
TRALd	- Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i>
UFAL	– Universidade Federal de Alagoas
UFPE	– Universidade Federal de Pernambuco
UV	- luz ultravioleta
V/cm	– Volt por centímetro

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição por sexo e faixa etária dos pacientes admitidos com a hipótese de diagnóstico de LVA no Hospital Escola Dr. Hélyvio Auto (Maceió-AL), no período de abril de 2003 a março de 2005...	36
TABELA 2	Classificação dos indivíduos em caso e não caso de LVA, conforme critério de diagnóstico em 162 pacientes admitidos no Hospital Escola Dr. Hélyvio Auto, de abril de 2003 a março de 2005	37
TABELA 3	Distribuição por sexo e faixa etária dos pacientes admitidos com LVA no Hospital Escola Dr.Hélyvio Auto (Maceió-AL), no período de abril de 2003 a março de 2005.....	38
TABELA 4	Resultado da PCR em sangue aspirado da medula óssea de pacientes com e sem parasitos à microscopia óptica.....	40
TABELA 5	Resultado da PCR em sangue periférico de pacientes com e sem parasitos à microscopia óptica.....	42
TABELA 6	Resultado da PCR em aspirados medulares de pacientes com e sem LVA antes do início do tratamento.....	43
TABELA 7	Resultado da PCR em sangue periférico de pacientes com e sem LVA.....	43
TABELA 8	Comparação entre os resultados da PCR em sangue aspirado da medula óssea e sangue periférico de pacientes com e sem LVA.....	44
TABELA 9	Resultado da PCR em sangue periférico de pacientes antes e após o tratamento para LVA.....	45
TABELA 10	Média do tamanho do fígado e do baço na admissão e ao término do tratamento e média de redução, em 30 pacientes que tiveram o sangue periférico testado pela PCR.....	45
TABELA 11	Média de redução do tamanho do fígado e do baço na admissão (Ad), comparada com o término do tratamento (TT).....	46

RESUMO

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma protozoose sistêmica que acomete pessoas de ambos os sexos e predomina em menores de 15 anos de idade. O diagnóstico fundamenta-se nos dados clínicos, na epidemiologia, na visualização microscópica do parasito em aspirados teciduais (com sensibilidade variável), nos testes sorológicos (que apresentam limitações) e, mais recentemente, na reação em cadeia da polimerase (PCR). Com o objetivo de testar a validade da PCR no diagnóstico da LVA, 162 indivíduos admitidos no hospital Hospital Escola Dr. Hélvio Auto (HEHA) em Maceió-Alagoas, com hipótese de diagnóstico de LVA foram incluídos no estudo 56,2% do sexo masculino e 43,8% do sexo feminino, com idades entre quatro meses a 66 anos, (média de 13 e mediana de 8,5 anos); 65,4% de procedência rural e 34,6% urbana. A doença foi confirmada em 104 casos (64,4%), dos quais 55,8% eram do sexo masculino e 44,2% feminino, com idades variando entre 7 meses e 66 anos, (média de 12,9 e mediana de 9,5 anos). O aspirado medular, obtido em 99 dos 104 casos, foi submetido à microscopia óptica. Amastigotas de *Leishmania* foram identificadas em 86 (87%) dos pacientes. Em 13 (13%) pacientes, nos quais não foram encontrados parasitos no aspirado medular, pela microscopia óptica, e em cinco que não fizeram esse exame, o diagnóstico fundamentou-se no quadro clínico e na resposta favorável ao tratamento. A maioria, 89,4% foi tratada com N-metilglucamina; 2,8% receberam apenas anfotericina B e 7,7% iniciaram o tratamento com antimonial, sendo substituído, posteriormente, por anfotericina B. Durante o estudo, quatro pacientes faleceram: dois em decorrência da própria doença e os demais por falta de resposta ao tratamento com glucantime e a anfotericina B. A PCR foi processada em amostras de sangue medular e periférico em pacientes com e sem LVA, avaliando, assim, a sensibilidade e especificidade do teste e sua concordância com a microscopia óptica. A PCR foi positiva em sangue medular de 100% dos pacientes com parasitos à microscopia óptica e em 61,5% dos que não foram observados parasitos. A concordância entre a visualização ou não do parasito no aspirado medular e a PCR ser positiva foi considerada sofrível (Kappa=0,41). Comparando-se os resultados da PCR obtidos nos aspirados da medula com os do sangue periférico, a concordância foi considerada ótima (Kappa=0,88). Indivíduos doentes e não-doentes de LVA tiveram o sangue aspirado da medula e o sangue periférico processado pela PCR. O teste foi positivo em todos os aspirados medulares dos doentes e em 58,5% dos que não tinham a doença, ficando a especificidade em 41,5%. No sangue periférico, o teste foi positivo em 96,7% dos doentes e em 59,2% dos não doentes. Para avaliar a utilidade da PCR como critério de cura, 30 pacientes tiveram o sangue periférico processado pela PCR, antes e ao

término da medicação; somente 10% tornaram-se negativos ao fim do tratamento. Esses pacientes foram tratados com N-metilglucamina, exceto um, que teve o antimonial substituído por anfotericina B. O fígado e o baço foram medidos na admissão e ao término do tratamento; ocorrendo redução com significância estatística ($p_{\text{fígado}}$ e $p_{\text{baço}} = 0,000$) quando submetido ao teste T pareado. Por sua elevada sensibilidade, tanto no sangue medular como periférico, sugere-se que a PCR poderá ser usada como teste diagnóstico auxiliar, nos casos suspeitos de LVA, nos quais a microscopia seja negativa. Nesse estudo a PCR não se mostrou útil como critério de cura na avaliação dos pacientes.

ABSTRACT

American visceral leishmaniasis (AVL) is a systemic protozoan infection, which affects people of both sexes, and predominates in those younger than 15 years of age. The diagnosis is based on clinical data, epidemiology, microscopic visualization of the parasite in aspirates (with variable sensitivity), serology tests (with limitations), and more recently, on the polymerase chain reaction (PCR). To evaluate the validity of the PCR on the diagnosis of AVL, 162 individuals admitted to the teaching hospital Helvio Auto, Maceio, Alagoas, suspected of having AVL, were included in the study, 56.2% males and 43.8% females; ages ranging from 4 months to 66 years, (median of 8.5 years); 65.4% from rural and 34.6% from urban areas. The disease was confirmed in 104 (64.4%), of which 55.8% were males and 44.2% females; ages ranging from 7 months to 66 years, (median 9.5 years). Medullar aspirate obtained from 99 of the 104 cases were examined by optic microscopy; *Leishmania* amastigotas were identified in 86 (87%) of patients. In 13 (13%) in which the parasite wasn't found and in 5 that didn't submit to the exam, the diagnosis was based on the clinical manifestations and in favorable response to treatment. The majority, 89.4% was treated with N-methylglucanate; 2.8% received only amphotericin B, and 7.7% started treatment with antimony, which was later changed to amphotericin B. During the study 4 patients died, 2 due to the severity of the disease and the others due to lack of response to treatment. PCR was used in medullar and peripheral blood samples of patients with and without AVL, to evaluate the test's sensibility and specificity and its concordance with optic microscopy. PCR was positive in medullar blood of 100% of the patients with parasites identified by microscopy and in 61.5% of those in which no parasite was seen. The concordance between microscopic visualization and PCR in medullar aspirate was considered tolerable ($Kappa=0.41$). Comparing the results of the PCR obtained from medullar aspirates with those from peripheral blood, the concordance was considered excellent ($Kappa=0.88$). Individuals with and without AVL illness had their medullar and peripheral blood processed by PCR; the test was positive in all of the medullar aspirates of those with the illness and in 58.5% of those without the illness. In the peripheral blood the test was positive in 96.7% of those with the illness and in 59.2% of those without. The concordance between having the disease and having a positive PCR from medullar and peripheral blood was considered excellent ($Kappa=0.88$). To evaluate PCR as criterion for cure, 30 patients had their peripheral blood processed by PCR before and the end of treatment; only 10% converted to negative. These patients were treated with N-methylglucanate, except one, in which the antimony was

switched to amphotericin B. The liver and spleen of the patients were measured upon admission and at the end of treatment; statistically significant reduction was observed in both organs ($P = 0.000$) by the matched T test. Because of the high sensibility demonstrated by PCR in both medullar and peripheral blood, it is suggested that it can be used as a supplementary test for cases of suspected AVL in which microscopy is negative. In this study PCR was not usefull as a cure criterion in the evaluation of patients.

INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose visceral como problema de saúde pública

1.1.1 Expansão territorial

As leishmanioses são doenças parasitárias com manifestações clínicas variadas, distribuídas por todo o mundo, causadas por muitas espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*.

A leishmaniose visceral americana (LVA), também chamada Calazar, tem como agente etiológico um protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CHAGAS et al., 1937).

A etiologia da leishmaniose visceral (LV) foi elucidada no início do século XX por Sir William Boog Leishman, cientista britânico que descreveu formas encontradas na polpa esplênica de um soldado irlandês, morto pela febre Dum-Dum no Royal Victoria Hospital, em Netley, na Inglaterra (LEISHMAN, 1903).

Acredita-se ser a doença mais antiga que as publicações oficiais de sua descoberta. Conforme relatos, existia na Índia uma “febre malárica perniciosa” conhecida pelos nativos como calazar, ou doença negra. Assim chamada pelo escurecimento da pele nas formas crônicas da doença (RODRIGUES DA SILVA, 1957).

Conforme dados da WHO (1998), as leishmanioses são endêmicas em 88 países, destes 66 estão situados no Velho Mundo, enquanto 22 encontram-se no Novo Mundo. Estima-se em 350.000.000 os indivíduos expostos ao risco de adquirir a infecção, e que existam 12.000.000 casos sob todas as formas clínicas da doença. Acredita-se que surjam a cada ano aproximadamente 500.000 casos de LV (DESJEUX, 1996). A maioria destes é oriunda de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 1996).

A freqüência da doença passou a preocupar as autoridades sanitárias desde a década de 1990, pela elevação da incidência, a urbanização e a expansão da endemia, fenômeno observado em todo o mundo. Consideram-se fatores responsáveis pela expansão, a migração da zona rural para a urbana ou da zona urbana para a rural, em conseqüência de projetos agroindustriais, conflitos entre os povos, fenômenos naturais (OMS, 1996a).

Em estudo desenvolvido na localidade de Fulbaria Thana, povoado localizado em Bangladesh, no período de 2000 a 2002, observou-se incidência anual de 2%, com um percentual de mortalidade elevado, principalmente entre as mulheres (19%). Os doentes vivem em comunidades pobres da zona rural, com dificuldade de acesso aos serviços de saúde, e parte dos que chegam aos serviços não dispõem de recursos para custear o tratamento. O retardo no tratamento dos pacientes aumenta o risco de complicações e morte, prolonga a transmissibilidade da doença, por serem os doentes os próprios reservatórios da mesma (antroponose). Quando atendidos, são priorizados as crianças e os homens. As mulheres apresentam morbidade e mortalidade elevadas, possivelmente pela desnutrição, gravidez e lactação, além do tratamento ser para elas postergado (AHLUWALIA et al., 2003).

No leste da África, a migração é a responsável pela disseminação da LV antroponótica. Refugiados e trabalhadores temporários procedentes de região não- endêmica, vivendo em área endêmica, ao retornarem para suas localidades de origem, levam consigo o parasito, estabelecendo dessa forma uma nova região endêmica. Estes fatos foram relatados por Seaman et al. (1996) quando avaliaram a epidemia que ocorreu no sul do Sudão e que causou 100.000 mortes em uma população de 1.000.000 de indivíduos.

Na região do Mediterrâneo, os poucos casos notificados procediam da zona rural, porém, com o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida, a LV tornou-se importante pela associação com esta infecção, surgindo uma nova entidade, que é a co-infecção (COSTA et al., 1996).

No Brasil, o primeiro caso de LV data de 1913 em um paciente oriundo do Mato Grosso, diagnosticado em Assunção, no Paraguai (OPAS, 1996). Segue-se a observação de Rodrigues da Silva (1957) de alguns casos ocorridos nas províncias de Salta e do Chaco, na Argentina. Posteriormente, Penna (1934), pesquisando a febre amarela no Brasil, em pacientes falecidos com menos de 10 dias de doença, encontrou 41 casos de leishmaniose visceral evidenciados histologicamente, em material de viscerotomia. Os pacientes provinham do Norte e Nordeste, sendo 15 do Ceará, nove da Bahia, cinco de Sergipe, quatro de Alagoas, três do Piauí, três do Pará, um do Rio Grande do Norte e um de Pernambuco.

Em consequência dos achados de Penna, foi criada pelo Instituto Oswaldo Cruz uma comissão para realizar pesquisas em LV, sob a orientação do Dr. Evandro Chagas, no Pará, em 1936, através da qual foi diagnosticado o primeiro caso de leishmaniose visceral em vida: tratava-se de um paciente do sexo masculino, procedente de Aracaju (CHAGAS, 1936).

Com a morte do Dr. Evandro Chagas em 1940, desfez-se a comissão que estudava a leishmaniose visceral em nosso país. A partir daí as informações eram dadas por pesquisadores que trabalhavam isoladamente.

Somente em 1953, quando aconteceu o surto epidêmico de Sobral (Ceará), criou-se a “Campanha contra a Leishmaniose Visceral” subordinada ao Ministério da Saúde (MONTEIRO et al., 1994).

O surto de Sobral foi estudado por Deane & Deane (1954; 1955a), quando foram notificados 354 casos de LV. Esse estudo evidenciou o papel epidemiológico da raposa (*Lucalopex vetulus*) como reservatório do parasito, quando se conseguiu infectar flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* a partir desses animais.

Em 1954, foi criado o Departamento Nacional de Endemias Rurais, pela fusão dos serviços nacionais de Malária, Febre Amarela, Peste e Leishmaniose (PRATA,1990). Neste mesmo ano observou-se em Jacobina, na Bahia, um foco de leishmaniose visceral com

características de alta endemicidade, estabelecendo-se aí um novo centro de estudos da doença.

As atividades de controle nessa época consistiam na detecção e eliminação de cães doentes, tratamento dos casos humanos e aplicação de inseticidas de ação residual no domicílio (DEANE, 1958). Estes trabalhos foram mantidos até 1964, sendo então suspensos.

A partir da década de 1980 tem surgido relato de surtos em várias capitais do Nordeste brasileiro. Em 1981, Teresina, começou a notificar casos de LV e em 1984 observou-se que dos 1.509 casos notificados no Piauí, 60% eram da capital. O período em que ocorreu o processo epidêmico e a concomitância com a seca, e conseqüente emigração de pessoas e animais domésticos de região endêmica para o local onde ocorreu a epidemia, sugere que o movimento migratório foi o fator desencadeante da epidemia (COSTA, 1990). Em Natal, o surto começou em 1989 e se estendeu até 1992 (JERONIMO et al., 1994).

Na década de 1980, São Luís, recebeu migrantes que fugiam da seca no Piauí e Ceará, como também famílias da zona rural do próprio Estado. Em 1982 observou-se que a LV tornou-se endemo-epidêmica, levando ao registro de 1089 casos em 15 anos (MENDES et al., 2002).

Em Roraima os primeiros casos autóctones de LV datam de 1989. Sabe-se atualmente que dos oito municípios existentes no Estado, a protozoose já foi encontrada em seis (GUERRA et al., 2004).

Em 1980, quando o número de casos em vários Estados chamou a atenção das autoridades sanitárias, a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) retomou as ações de campo (MONTEIRO et al., 1994). A SUCAM deparou-se com a intensificação do foco já bem estabelecido no Nordeste (92,6% de todos os casos), tendo sido detectados novos focos na região Sudeste, como Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo, sugerindo expansão da endemia (MARZOCHI et al. 1994). Na região Sul,

foram encontrados casos no Paraná e na região Centro-Oeste, nos Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (FNS, 1996).

Desde os achados de Penna até o fim da década de 1970, a protozoose distribuía-se preferencialmente pela zona rural, porém nos últimos anos a leishmaniose visceral vem ocorrendo em região urbana de várias cidades de médio e grande porte, além das cidades de São Luís, Teresina e Natal, já anteriormente descritos. Foi observado também em Santarém (Pará), Aracaju no Estado de Sergipe, Montes Claros e Belo Horizonte no Estado de Minas Gerais, Corumbá no Estado de Mato Grosso do Sul (VIEIRA & COELHO, 1998) Araçatuba e Birigüi no Estado de São Paulo (KATZ et al., 2000) e região central do Estado do Tocantins (BORGES et al., 2003). O encontro de *L. longipalpis* no Sul do Brasil, em áreas onde esse flebotomíneo não havia sido descrito anteriormente, contribui para explicar o aparecimento de novos focos da doença (MARZOCHI et al., 1994).

Em Alagoas, a doença predomina na zona rural, acometendo, sobretudo crianças de regiões afastadas da sede do município. Dos 102 municípios existentes no Estado, a leishmaniose visceral já foi notificada em 89% deles. Nos últimos cinco anos os municípios que mais notificaram casos foram Arapiraca, Palmeira dos Índios, Traipu Cacimbinhas, Igaci, Santana do Ipanema e São José da Tapera, sendo os três primeiros situados no agreste e os demais, no sertão alagoano. É a segunda causa de internação no Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto, hospital mantido pelo serviço público, considerado referência pelo Serviço Único de Saúde (SUS) para internamento de pacientes com doenças infecciosas e parasitárias no Estado de Alagoas (comunicação pessoal, Núcleo de Vigilância Epidemiológica do Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto).

1.1.2 Aspectos relacionados à transmissão

Para pesquisadores mais antigos como Deane & Deane (1955a), a leishmaniose visceral, é uma zoonose de canídeos, que acomete o homem, tornando-se uma antroponose.

Na América Latina os canídeos são as principais espécies consideradas reservatório da LV (DEANE & DEANE, 1954; LIMA et al., 2004). Uma vez infectado, o cão pode permanecer sem sintomas, ou posteriormente desenvolver a doença (ARIAS et al., 1996; LIMA et al., 2004). A prevalência da infecção nos cães que vivem em região endêmica varia de 1–36% (MOREIRA et al., 2003).

A leishmaniose visceral em canídeos (LVC) revela-se por emagrecimento, lesões cutâneas caracterizadas por queda do pêlo, descamação e ulceração, estas em geral pequenas localizadas no focinho, orelhas e cauda. Com a evolução da doença, observa-se também conjuntivite, ceratite, edema das patas, alongamento das unhas, diarreia e, na fase final, paresia das patas posteriores e caquexia (DEANE & DEANE, 1955b; LIMA et al., 2004). Cães e raposas podem apresentar intenso parasitismo cutâneo favorecendo, dessa forma, a infecção de flebotomíneos (DEANE & DEANE, 1954). Alguns estudos incriminam as galinhas (*Gallus gallus*) como fator de risco para a leishmaniose visceral urbana, porém os resultados são conflitantes; em algumas situações atuam como agentes zooprofiláticos (ALEXANDER, et al., 2002). Moreira et al. (2003), estudando fatores de risco para LVC, em zona urbana encontraram maior risco de infecção para cães com mais de um ano de idade.

Estudiosos lembram a necessidade de se investigarem outros animais. Recentemente foi encontrado em uma região não-endêmica para LV, Cotia Estado de São Paulo-Brasil, um gato (*Felis catus*) com uma lesão nodular no nariz, foram observadas amastigotas no esfregaço da lesão. O material foi submetido a PCR e, em seguida, feito o seqüencialmente que identificou o parasito como *Leishmania (Leishmania) chagasi* (SAVANI et al., 2004).

A transmissão da leishmaniose visceral nas Américas é feita por flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912), que são encontrados desde o sul dos Estados Unidos da América do Norte até o norte da Argentina na América do Sul (OPAS, 1996).

Na região Nordeste do Brasil, onde se concentra o maior número de casos, o *L. longipalpis* foi identificado em todos os focos, além daqueles localizados na região Norte, Sudeste e Centro-Oeste. Portanto, a distribuição do *L. longipalpis* corresponde à da leishmaniose visceral, sendo muito mais abundante nas zonas endemo-epidêmicas do que naquelas onde a incidência da doença é esporádica (DEANE & DEANE, 1955b). Em todos os focos de leishmaniose visceral a *L. longipalpis* é a espécie predominante, entretanto a *L. evansi* foi encontrada infectada naturalmente (OPAS, 1996).

A fêmea do *L. longipalpis* faz seu repasto sanguíneo nos animais e no homem, a qualquer hora do dia ou da noite, entretanto picam muito mais à noite sendo maior a atividade hematofágica entre 21 e 22 horas (DEANE, 1956). Aproximadamente após cinco dias do repasto sanguíneo, a fêmea põe seus ovos em lugares úmidos e ricos em matéria orgânica (SHERLOCK, 1994).

Estudos sugerem diferenças intra-específicas entre *L. longipalpis*; há uma forma mais antropofílica, encontrada mais freqüentemente dentro das casas. Mangabeira (1969) descreveu variações morfológicas em flebotomíneos machos de diferentes regiões geográficas do Brasil, sugerindo que o *L. longipalpis* é um complexo de espécies. Isso talvez explique a natureza esporádica da leishmaniose visceral em algumas regiões como na Amazônia e níveis epidêmicos em outras, como no Ceará (LAINSON, 1983).

Os insetos alimentam-se em diversos animais de sangue quente, sugando principalmente o homem, o cão e a raposa. Apesar de não ser domiciliar, pode ser capturado em número elevado dentro das casas e no peridomicílio, em abrigos de animais domésticos,

sendo que, nesses últimos, a densidade é maior do que dentro das casas (SHERLOCK & GUITTON, 1969). A infecção do flebotomíneo é mais eficiente na raposa, seguida pelo cão e por último no homem (DEANE, 1956). Experimentalmente conseguiu-se a infecção de flebotomíneos em doentes humanos, cães e raposa infectados, obtendo-se a evolução do protozoário em todos os casos de forma semelhante, isto é, levando ao bloqueio da faringe (DEANE, 1958).

O desenvolvimento da *Leishmania (Leishmania) chagasi* no intestino anterior do *L. longipalpis* foi descrito por Lainson & Shaw (1988). Os flebotomíneos se tornam infectantes a partir de 15 a 24 horas do repasto no reservatório infectado.

1.2 Leishmaniose visceral americana como problema clínico

2.1.1 Aspectos relacionados ao diagnóstico

Os insetos vetores (flebotomíneos) inoculam a forma promastigota em hospedeiros susceptíveis, estas formas vão infectar macrófagos do SMF e se transformam em amastigotas.

Dentro dos macrófagos as formas amastigotas são abrigadas em fagossomos que se fundem aos lisossomos dando origem aos fagolisossomos, aí ocorrendo mudanças morfológicas, como regressão do flagelo externo e redução do tamanho do corpo e bioquímicas como redução da síntese de macromoléculas e consumo de oxigênio, necessárias a sua sobrevivência no meio intracelular (AWASTHI et al., 2004).

As *Leishmanias* sobrevivem e se multiplicam nesse ambiente, resistindo às substâncias tóxicas aí existentes, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. É possível que uma enzima, a superóxido dismutase, descrita em protozoários da família *Trypanosomatidae*, incluindo o gênero *Leishmania*, desnature metabólitos da respiração

aeróbica das *Leishmanias*, como também dos fagócitos mononucleares. Esses achados sugerem que a ligação das *Leishmanias* aos fagócitos pode resultar em uma menor produção de metabólitos do oxigênio. Além disso, a camada superficial das *Leishmanias* é constituída por moléculas resistentes as hidrolases ácidas (CHANG, 1990).

A multiplicação acontece tanto na forma promastigota como amastigota. A divisão é binária, começando, em geral, pelo flagelo, cinetoplasto e núcleo que precedem a divisão do citossomo. A intensa multiplicação leva à ruptura dos macrófagos com liberação do parasito no meio intercelular, que logo serão fagocitados por outros macrófagos (WIRTH, 1990).

A superfície molecular relacionada à ligação a macrófagos parece ser de glicoconjugados. Foram identificados na superfície do parasito dois tipos de glicoconjugados: o glicolípide (Lipofosfoglican) e uma glicoproteína de 63 kD (gp63), que é uma protease de superfície encontrada em todas as espécies patogênicas examinadas. Essa protease destrói enzimas do hospedeiro que têm propriedades microbicidas (AWASTHI et al., 2004).

Acredita-se que estas glicoproteínas (LPG, gp 63) sejam usadas para degradar imunoglobulinas, fatores do complemento e proteínas lisossomais. A atividade proteolítica dos glicoconjugados parece importante na sobrevivência da amastigota no ambiente ácido do fagolisossoma do macrófago (AWASTHI et al., 2004).

Este gênero possui uma mitocôndria conhecida como cinetoplasto, composta por dois tipos de moléculas circulares de DNA, um círculo maior e outro menor; este cinetoplasto, por apresentar divergências na sua estrutura entre espécies e subespécies, é então utilizado para o diagnóstico etiológico das leishmanioses nos pacientes (BARKER & BUTCHER, 1983). O círculo menor, no qual encontram-se centenas de cópias por célula, tem sido usado como alvo para a amplificação do DNA(kDNA) do parasito, em vários estudos (SALOTRA et al., 2001).

O flebotomíneo inocula formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* ao picar os indivíduos: um pequeno nódulo surge no local da inoculação que, em geral, passa despercebido, sendo essa a primeira reação de defesa do hospedeiro. Quando os parasitos conseguem vencê-la, as formas amastigotas dentro das células (SMF) da pele disseminam-se através dessas células, principalmente para a medula óssea, linfonodos, fígado e baço (PEARSON et al., 1983).

Sabe-se que a imunidade celular desempenha um relevante papel na infecção causada pelas *Leishmanias*. Quando, nos estágios iniciais da infecção, o hospedeiro é capaz de produzir interferon-gama, a infecção é controlada (CARVALHO et al., 1994). A imunidade humoral é representada pela proliferação policlonal das células B, com produção de IgG e IgM, além dos anticorpos específicos para os antígenos do parasito que são utilizados no diagnóstico da doença.

Os pacientes com LV apresentam depressão da imunidade mediada por células, avaliada por testes cutâneos tais como: PPD, Reação de Montenegro e por PHA (BEHFOROUZ et al., 1983). Assim, não apresentam reação de hipersensibilidade do tipo tardio aos antígenos do parasito, havendo ausência de proliferação linfocitária e inadequada produção ou liberação de interferon-gama e interleucina-2 que são citocinas associadas à resposta imune (ZWINGENBERGER et al., 1990). Essa disfunção imunológica foi revertida *in vitro*, por Carvalho et al. (1994), que adicionaram ao meio de cultura interferon-gama e interleucina-2. Os mesmos autores demonstraram ainda que o soro de pacientes com leishmaniose visceral possui interleucina-4 e interleucina-10, que inibem a produção de interferon-gama e a produção de citocinas pelos macrófagos e pelas células T auxiliar.

A infecção, em humanos, pela *L. (L.) chagasi* pode levar a uma doença de evolução fatal, a uma infecção assintomática ou à forma clássica do calazar que eventualmente cura sem tratamento específico (BADARÓ et al., 1986a; KEMP et al., 1992). O curso clínico da

infecção para a doença depende de fatores até agora pouco claros. Para alguns estudiosos os indivíduos infectados de baixa idade e má nutrição têm maior possibilidade de adoecer que os demais (BADARÓ et al., 1986b; 1988).

A leishmaniose visceral é uma protozoose sistêmica caracterizada por: febre, esplenomegalia e quase sempre hepatomegalia, linfadenopatia, palidez, além de emagrecimento, hipoalbuminemia, edema, fenômenos hemorrágicos, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. No estado final observa-se caquexia, derrames cavitários e icterícia. Quando não tratada, quase sempre evolui para o óbito (OMS, 1996a).

A doença pode apresentar evolução aguda, subaguda ou crônica (DEBONO, 1946). A leishmaniose aguda, que é mais freqüente em crianças menores de dois anos, manifesta-se por um quadro grave de febre alta e contínua e crescimento moderado do baço, evoluindo para o óbito em três a quatro meses (DEBONO, 1946).

A leishmaniose subaguda evolui entre seis a dezoito meses, com os pacientes apresentando febre persistente, progressiva esplenomegalia, anemia, caquexia e por vezes, ora diarréia, ora manifestações respiratórias. O curso da doença pode ser modificado pelo aparecimento de infecções oportunistas. Em outros pacientes o curso é crônico, evoluindo em dois ou mais anos, entremeados por períodos de quase total recuperação; durante essas fases de aparente “cura” a esplenomegalia é mantida (DEBONO, 1946).

A evolução clínica da leishmaniose visceral é usualmente dividida em quatro períodos e, apesar da imprecisão entre eles, é assim considerada para uma melhor compreensão dos processos mórbidos em um tempo prolongado de observação (RODRIGUES DA SILVA, 1957). São eles: período de incubação, de início ou de invasão, de estado e período final.

O período de incubação é de difícil caracterização, os pacientes não sabem determinar o momento exato da picada infectante, pois freqüentemente não há alterações

evidentes. Em geral, aceitam-se limites entre três a seis meses (ALENCAR et al., 1974). Para Zijlstra et al. (1992), esse período sofre variações de dois a seis meses.

Como o período inicial decorre da generalização do parasito, as manifestações surgem, ora de forma abrupta, ora insidiosamente. Quaisquer que seja a forma de início, os sinais e sintomas não caracterizam a doença, podendo ser confundidos com outras afecções (PEDROSA, 1998).

O tempo decorrido entre os primeiros sinais e sintomas e o momento do diagnóstico são variáveis. Em um seguimento de 15 anos, encontraram-se 65% dos pacientes com história de doença entre 30 a 180 dias, e somente 17% com história de doença com menos de 30 dias (PEDROSA, 1998). O paciente apresenta febre, perda do apetite, emagrecimento, palidez, queda de cabelos, hemorragias e apatia (ALENCAR et al., 1974; PEDROSA & ROCHA, 2004). A febre é quase sempre o primeiro sintoma (PARAHYM, 1961). A esplenomegalia é observada precocemente no curso da doença, embora, às vezes, seja discreta. O fígado também começa a crescer. Outras manifestações podem dominar o quadro como: crises diarréicas, alterações respiratórias e convulsões, principalmente em crianças.

No período de estado os sinais e sintomas são os mesmos do período inicial, porém mais intensos. A febre pode ser contínua, irregular, remitente, estas remissões podem ser de uma ou mais semanas e com dois ou mais picos diários (ALENCAR et al., 1974). A anemia presente desde o início da doença, acentua-se. O baço cresce mais rapidamente que o fígado, tem consistência firme, sendo, às vezes, doloroso. A hepatomegalia é freqüente, porém raramente atinge o tamanho do baço. Em um seguimento de casos, Pedrosa (1998) verificou que 93,8% dos baços medidos na admissão, a média do tamanho era de $9,2 \pm 4,0$ enquanto a média do tamanho do fígado era de $5,1 \pm 2,6$ cm.

Os cabelos são secos, adelgaçados, quebradiços, despigmentados, sem brilho e caem com facilidade. A pele é seca, áspera e pálida, lembrando a cera envelhecida. O abdome é

volumoso, surgindo freqüentemente edema dos membros inferiores e ascite. Observam-se ainda micropoliadenia e redução da massa muscular. As hemorragias tornam-se freqüentes, podendo surgir icterícia, retardo da puberdade e amenorréia (PRATA, 1957).

O período final é marcado pela exacerbação das alterações do período de estado. O óbito pode ser causado por alterações decorrentes da própria doença como os sangramentos, edema ou por infecções associadas (ALENCAR et al., 1974; PEDROSA, 1998).

No diagnóstico da leishmaniose visceral consideram-se a epidemiologia, as manifestações clínicas e o encontro do agente etiológico em esfregaços tissulares ou reações sorológicas (MARZOCHI et al., 1981).

São informações relevantes para o diagnóstico: a procedência de área endêmica. Sendo considerado endêmico o município com registro de pelo menos um caso autóctone, de LV humana ou canina (MS 2003); a existência de cães calazarentos, (emagrecidos, pelo caindo, ferimento no focinho, orelhas, e unhas grandes), presença de “mosquitos” pequenos que invadem as casas, principalmente ao entardecer. Para o diagnóstico clínico, há a observação de febre prolongada, emagrecimento, palidez, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, diarreia e tosse.

A pesquisa direta do parasito em aspirado esplênico ou a cultura deste material é o teste de referência para a confirmação do diagnóstico da LV, porém essa técnica raramente é recomendada nas áreas endêmicas. A alternativa é o aspirado da medula óssea ou do linfonodo. Os exames sorológicos foram aperfeiçoados, entretanto apresentam baixa especificidade (BOELART et al., 2004).

O diagnóstico parasitológico é feito pela visualização da forma amastigota da *Leishmania*, em esfregaços teciduais. Encontram-se formas amastigotas em órgãos ricos, em células do SMF como o baço, medula óssea, fígado e linfonodos. Conforme a OMS, o exame parasitológico do aspirado medular ou do baço é o teste mais específico para o diagnóstico da

LV, praticamente não tem falso positivo, conseqüentemente a especificidade é igual a 100% (WHO, 2004). Em pesquisa publicada por Ho et al., (1948) o agente etiológico em esfregaço tissular de origem esplênica revela um percentual de positividade de 97,6%, enquanto na medula óssea o percentual é de 89,2% e no aspirado de origem hepática a positividade cai para 76,9%. Em um seguimento de casos a positividade observada por Pedrosa et al. (1991), examinando aspirados medulares, foi de 84,5%.

Pelo menor risco e simplicidade técnica, prefere-se a punção aspirativa da medula óssea, que pode ser realizada no esterno, tibia ou crista ilíaca. A pele no local escolhido é submetida à assepsia, em seguida aplica-se o anestésico na pele e tecido subcutâneo. Após anestesia, a agulha própria para mielograma é posicionada em um ângulo de 45^o e pressionada para atravessar os tecidos, em seguida colocada em posição perpendicular à superfície óssea, então empurrada para baixo até atingir a medula óssea, retira-se o mandril e aspira-se pequena quantidade de material medular (HO et al., 1948).

Com o material da punção fazem-se esfregaços em lâminas que, em seguida, são corados pelo método de Giemsa ou pelo *Leishman* e examinados ao microscópio óptico. O método apresenta uma positividade variável, de 54 – 86% dos casos (WHO, 1982). Recentemente, Silva et al. (2005) verificaram que a sensibilidade do aspirado medular pode ser elevada ao se prolongar o tempo de observação em até 60 minutos (positividade de 95,4%). Estudo realizado por Dietze et al. (1997) mostrou que a positividade situou-se em torno de 80%, e, quando semeado em meio de cultura, esse procedimento elevou a positividade para 94%. O material pode ser semeado em meio de cultura ou inoculado em animais sensíveis como o *hamster*, no entanto, como esses procedimentos exigem um longo tempo de observação, não são utilizados para o diagnóstico dos casos (OSMAN et al., 1997).

As alterações humorais encontradas na leishmaniose visceral são de grande valor prático para o seu diagnóstico. As globulinas séricas se encontram elevadas pela presença de

títulos elevados de anticorpos específicos contra antígenos do parasito. Atualmente encontram-se disponíveis o teste de aglutinação direta (DAT), a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e as reações imunoenzimáticas. Esses testes apresentam sensibilidade variável entre 98 a 100% e especificidade de 70% para a IFI e 95% nos demais testes. Recentemente surgiu o teste rápido para o diagnóstico da leishmaniose visceral (TRALD), que é um teste imunoenzimático, com a vantagem sobre os demais de poder ser executado no campo, para o diagnóstico da doença em homens e cães, com uma sensibilidade de 94% e especificidade de 95% (BADARÓ et al., 1997). Os métodos imunológicos não conseguem distinguir infecção passada ou presente e não são confiáveis em pacientes imunodeprimidos (SALOTRA et al., 2001). Estes anticorpos podem ser detectados por um período longo de tempo após a cura clínica da doença, donde se conclui que o título de anticorpo específico não pode ser utilizado como critério de cura da leishmaniose visceral (BADARÓ, 1985; MORKANI et al., 1988).

Com a expansão da leishmaniose em várias partes do mundo, reemergência em outras áreas, surtos epidêmicos na periferia de cidades, faz-se necessário um método diagnóstico menos invasivo, mais sensível e específico que os métodos disponíveis. Foi então introduzida a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que, para a identificação dos parasitos deste gênero, quase sempre utiliza o DNA do cinetoplasto conhecido pela sigla kDNA, organela característica da ordem *Kinetoplastida*. O kDNA é constituído por 20 a 50 cadeias fechadas; são os maxicírculos, que codificam tipos de RNA e milhares de minicírculos que estão envolvidos na produção de RNA, que tem um papel na produção dos maxicírculos (LAMBSON et al., 1999). Eles possuem seqüências conservadas em todos os *Kinetoplastida*, com aparente função na replicação de outras regiões que pode ser gênero, espécie (SMYTH et al., 1992). O kDNA dos minicírculos foram utilizados como iniciadores para o complexo *L. donovani* e no estudo de Salotra et al. (2001) usando esses iniciadores a reação foi capaz de detectar 1 fg do DNA (ácido desoxiribonucleico) do parasito na presença

de um excesso de DNA humano. Ele encontrou 100% de sensibilidade, quando usou aspirado medular, e 96% quando usou sangue periférico; a especificidade foi de 96%; pois, entre os controles, dois procediam de região endêmica. No Brasil, Disch & Rabelo (2001) encontraram sensibilidade de 83% e especificidade de 100% quando utilizaram sangue periférico.

A PCR é a amplificação enzimática de uma seqüência específica de DNA com a conseqüente produção de milhões de cópias desta seqüência em um tubo de ensaio. Essa técnica foi desenvolvida no final dos anos 80 por Mullis (1990). Até a década de 1970 a molécula de DNA era considerada o componente celular mais difícil de ser analisado. Com a descoberta da endonuclease de restrição, enzima purificada de bactérias, a dupla hélice do DNA pôde ser cortada em vários pontos específicos, determinados pelas seqüências de nucleotídeos; com a fragmentação do DNA foi, então, possível sequenciar os nucleotídeos. A seqüência conhecida é utilizada na construção de oligonucleotídeos de DNA sintéticos. Eles são utilizados como iniciadores (primers) para a síntese de DNA *in vitro* (DEGRAVE et al., 1994).

1.2.1 Aspectos relacionados ao tratamento e à alta

Uma vez estabelecido o diagnóstico da doença, inicia-se o tratamento, considerado de suma importância para a recuperação do doente. A terapêutica das leishmanioses foi iniciada em 1912 por Gaspar Vianna que, pela primeira vez, utilizou antimônio trivalente no tratamento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Com a divulgação desses resultados, pesquisadores que trabalhavam com Calazar passaram a tratar seus pacientes com antimônio trivalente, modificando dessa forma o prognóstico desses doentes; até então, todos

evoluíam para o óbito, exceto um ou outro que apresentava remissão espontânea. Mesmo com os intensos efeitos colaterais era a única alternativa disponível (FRAIHA NETO, 1986).

Somente em 1920 Brahmachari desenvolveu o primeiro antimônio pentavalente (uréia stibamina), constituindo-se num grande avanço para o aparecimento de outros antimoniais. Atualmente são produzidos o Pentostam (gluconato de sódio e antimônio) e o Glucantime (antimoniato de N-metil-glucamina), que vem sendo usado no Brasil desde 1952 (MARSDEN, 1986).

O mecanismo de ação dessas drogas na leishmaniose é desconhecido. A farmacocinética dos antimoniais pentavalentes parece ser semelhante, quer sejam aplicados por via intramuscular ou intravenosa. São absorvidos rapidamente e 80 a 90% são excretados pelo rim após seis horas, enquanto uma pequena porção, (12%) é retida nos tecidos, com uma meia-vida de 32,8 horas. A redução posterior a antimônio trivalente, provavelmente, é a responsável pelos efeitos tóxicos tardios (MARSDEN, 1985; CHULAY et al., 1988).

A toxicidade do antimônio pentavalente é muito menor, considerando a toxicidade dos antimoniais trivalentes; mas, mesmo assim, os efeitos colaterais não devem ser negligenciados durante o tratamento dos pacientes. Manifestações como: mal-estar, anorexia, náuseas parecem relacionadas com a concentração de antimônio por dose, enquanto as alterações tardias no eletrocardiograma se relacionam com a elevação gradual do antimônio residual (CHULAY, et al., 1988). Elevação das aminotransferases e fosfatase alcalina, sugerindo disfunção hepatocelular, foi observada por Pablos & Gallego (1982). Pacientes tratados com 20mg de antimônio pentavalente/kg/dia durante 30 dias apresentaram defeito tubular. O mecanismo responsável por essa alteração parece ser provocado pela interferência na ação do hormônio antidiurético e efeito tóxico direto nas células tubulares (VEIGA et al., 1990).

Desde o seu aparecimento até o momento, os antimoniais continuam as drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, entretanto nos últimos anos observou-se ausência de resposta satisfatória aos antimoniais, em algumas regiões. Em Bihar, na Índia, essa falha é superior a 60% entre os pacientes tratados com antimonial pentavalente (SUNDAR et al., 2001). No sul da Europa, esse fenômeno também vem sendo observado. Atribui-se, não só à associação da LV ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), que é a quarta mais freqüente infecção oportunista (MIRA et al., 2004), como ao aparecimento de cepas resistentes ao antimonial pentavalente. Acredita-se que o uso de derivados do antimônio, na prática veterinária, selecionou cepas de *L. infantum* resistentes ao antimônio e os cães as dispersaram (CARRIÓ & PORTÚS, 2002).

Nos últimos anos doses maiores têm sido recomendadas. Essas recomendações fundamentaram-se nas elevadas taxas de recaídas em crianças no Quênia (África) que chegavam a 30% (SILVEIRA et al., 1993). No Brasil, vários esquemas terapêuticos são usados. Mesmo com doses menores que a atualmente preconizada pela Organização Mundial de Saúde; a ocorrência de recaídas parece não alcançar 5% dos doentes (SILVEIRA et al., 1993).

Alguns pacientes não se curam após uma série de antimônio pentavalente; uma segunda série com a mesma dose dada inicialmente, porém com o dobro do tempo, é recomendada. Não ocorrendo a cura, deve-se substituir o antimonial pelas drogas consideradas de segunda linha no tratamento da leishmaniose visceral, como a anfotericina B, que é a droga mais ativa contra a leishmânia. Recentemente, tem sido usada a anfotericina lipossomal, que é 25 vezes menos tóxica que a anfotericina B e cinco vezes mais ativa (DAVIDSON et al., 1994). Para o tratamento alternativo encontram-se disponíveis outras drogas como: a pentamidina, sulfato de aminosidine, alopurinol, interon gama associado ao glucantime, e mais recentemente a miltefosine (MS, 2003).

Anfotericina B é um antibiótico poliênico obtido a partir de culturas de um estreptomiceto, o *Streptomyces nodosus*. Tem ação sobre fungos, algas e protozoários. Atua como fungistático, fungicida e imunoestimulante. Sua ação tóxica deve-se à ligação com membranas citoplasmáticas que contêm esteróis, levando à sua desorganização funcional (MURRAY, 2001). A ação imunoestimulante foi estudada a partir das reações observadas em aproximadamente 70% dos pacientes, em 60 a 180 minutos da infusão da medicação, que são frio, febre, hipotensão e náuseas. Essas manifestações estão relacionadas à liberação de interleucina-1beta e ao fator de necrose tumoral (TNF), de monócitos e prostaglandina E₂, de monócitos e células endoteliais (MURRAY & DELPH-ETIENNE, 2000). Observa-se ainda nefrotoxicidade (a depender da dose), anemia secundária, hipopotassemia, hipomagnesemia, arritmias cardíacas (MURRAY, 2001). Ultimamente, a anfotericina B desoxicolato vem sendo substituída pelas preparações lipídicas que são menos tóxicas, conseguindo-se reduzir a duração do tratamento para cinco a 10 dias e podendo ser usada em adultos e crianças, independentemente da gravidade, porém seu alto custo limita o uso (MURRAY, 2001).

A hexadecilfosfocolina (Miltefosine), que é usada por via oral e apresenta um mecanismo de ação comparável a anfotericina B, destaca-se ainda por ser tóxica para o promastigota, que é forma que irá desenvolver-se no vetor (MURRAY & DELPH-ETIENNE, 2000). Usada na dose de 04 mg/kg/dia durante quatro semanas obteve-se a cura em 95% de pacientes sudaneses. Ocasionalmente são observadas elevações das aminotransferases e da creatinina. As mais freqüentes queixas são as gastrintestinais em 62% dos pacientes (JHA et al., 1999).

Ao término do tratamento, não há completa regressão dos sinais e sintomas. O paciente só deverá ser considerado curado após um seguimento clínico e laboratorial de 3, 6 e 12 meses do término do tratamento (OMS, 1996a).

Os critérios utilizados nessa avaliação são predominantemente clínicos, tais como: desaparecimento da febre nas duas ou três semanas anteriores ao término do tratamento; redução do tamanho do baço e ganho ponderal. Considera-se também a elevação dos valores da hemoglobina e do número de leucócitos (WHO, 1982; OMS, 1996a).

1.3 Justificativa

Como os vários trabalhos publicados na literatura médica fazem referência, à elevada sensibilidade e especificidade da PCR no diagnóstico da LV, tanto no sangue aspirado da medula óssea como no sangue periférico, resolveu-se avaliar a PCR em pacientes com hipótese de diagnóstico de LVA, não apenas para o diagnóstico da doença como para possível marcador de cura.

Considerando-se que a leishmaniose visceral é freqüente em Alagoas, que o diagnóstico parasitológico é um método invasivo, com sensibilidade variável e que o critério de cura fundamenta-se basicamente em observações clínicas, resolveu-se avaliar a validade da PCR em sangue aspirado da medula óssea e em sangue periférico para o diagnóstico da doença e para o seguimento dos pacientes.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a validade da reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico da LVA e para o critério de cura da doença.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Verificar a concordância da PCR, em sangue aspirado da medula óssea de pacientes com LVA, diagnosticados pelo achado de parasitos pelo método da microscopia óptica;
- ❖ Verificar a sensibilidade da PCR em sangue periférico de pacientes com LVA diagnosticados pelo achado de parasitos pelo método da microscopia óptica;
- ❖ Verificar a sensibilidade da PCR no aspirado de medula óssea comparando-a com a PCR no sangue periférico;
- ❖ Verificar a concordância da PCR no sangue aspirado da medula óssea com a PCR no sangue periférico;
- ❖ Avaliar a PCR em sangue periférico imediatamente após o término do tratamento, comparando-a com os critérios de cura clínica da doença;
- ❖ Avaliar a especificidade da PCR em sangue aspirado da medula óssea de pacientes não portadores de LVA;
- ❖ Avaliar a especificidade da PCR em sangue periférico de pacientes não portadores de LVA.

PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Para este estudo utilizou-se a validação de teste diagnóstico. Esse desenho teve como objetivo avaliar a capacidade do teste diagnóstico em estudo, na identificação dos indivíduos que sofrem o agravo (sensibilidade), e os que não o sofrem (especificidade) (SACKETT et al., 1991).

Há diferentes formas para avaliar um teste diagnóstico. Segundo Sackett & Haynes (2002) isso pode ser feito através de quatro tipos de estudo, cada um deles respondendo a uma pergunta específica. O desenho aqui usado corresponde ao terceiro tipo proposto pelos referidos autores; ou seja: o teste é capaz de distinguir entre os indivíduos com hipótese de diagnóstico de LVA, aqueles que têm a doença e os que não a têm?

3.2 Local e população do estudo

Foram incluídos no estudo todos os pacientes admitidos com a hipótese de diagnóstico de leishmaniose visceral, durante o período de abril de 2003 até março de 2005.

Foi realizada no Hospital Escola Dr. Hélio Auto (HEHA), que é público, referência em doenças infecciosas e parasitárias para todo o SUS/Alagoas. Atende a maioria dos casos de LVA do Estado. Dos 122 casos de LVA que ocorreram no ano de 2002, foram internos no HEHA 117 (96,0%). Eram do sexo masculino 63 (53,8%) e do feminino 54 (46,2%) dos pacientes. As idades variaram de 10 meses a 60 anos, com média igual a $12,8 \pm 11,7$ anos e a mediana de 10 anos de idade. Os pacientes eram procedentes da zona rural, 89 (76,1%) casos, e somente 28 (23,9%) vieram da zona urbana. Distribuídos pela região agreste 48 (41,0%), pelo sertão 45 (38,5%) enquanto 24 (20,5%) vieram do litoral alagoano.

O HEHA é também hospital-escola para formação e treinamento de estudantes de medicina, psicologia, enfermagem, fisioterapia, terapia ocupacional e nutrição da Universidade Federal de Alagoas e da Fundação Universitária de Ciências da Saúde do Estado de Alagoas.

3.3 Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado considerando a sensibilidade e a especificidade da PCR em 95%, erro de 15,0% e “Power” de 80%. A amostra foi estimada em 50 casos e 50 não casos.

3.4 Definição das variáveis

3.4.1 Definição dos grupos

Foram considerados **casos** de LVA (padrão-ouro) aqueles indivíduos procedentes de região endêmica, com história de febre há 14 dias ou mais, palidez, hepatoesplenomegalia, e com presença de parasitos no aspirado medular. Foram também considerados **casos** os indivíduos procedentes de região endêmica com quadro clínico compatível com LVA, hemograma com redução do número de células, do hematócrito e da concentração de hemoglobina, e que responderam satisfatoriamente ao teste terapêutico (FUNASA, 2002).

Foram considerados **não casos** os indivíduos sem manifestações clínicas compatíveis com a doença e exames laboratoriais negativos (FUNASA, 2002).

Foram consideradas ainda as seguintes variáveis:

Sexo – categorizado como masculino e feminino.

Idade – definida como o tempo decorrido em anos, desde o nascimento até a data do internamento, categorizada como: menor de um ano; de um a quatro anos; de cinco a nove anos; 10 a 14 anos; 15 a 20 anos; 21 a 30 anos; 31 e igual a 40 anos ou maior de 41 anos.

Tamanho do fígado e do baço – medidos abaixo da reborda costal, na linha hemiclavicular, descritos em centímetros.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – considerou-se resultado positivo (sangue aspirado da medula óssea e sangue periférico) quando era detectada uma banda de aproximadamente 800 pares de bases pelo programa Photocapt, versão 10.01 (*Vilbert Lourmat/França*); e resultado negativo quando não era identificada a referida banda.

Pesquisa do parasito em sangue aspirado da medula óssea pela microscopia óptica – considerou-se resultado positivo quando eram visualizadas amastigotas no esfregaço de sangue aspirado da medula óssea, corado pelo método de Giemsa e examinados com o auxílio de um microscópio óptico, utilizando-se objetiva de imersão (100x), e negativo quando não eram visualizadas amastigotas no esfregaço medular, após no mínimo uma hora de exame.

3.5 Coleta de dados

3.5.1 Admissão hospitalar

A abordagem inicial dos pacientes ou de seus pais, para esclarecimento e obtenção da concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi realizada pela pesquisadora (APÊNDICE 2).

No momento da admissão, foram anotadas em protocolo específico (APÊNDICE 3) as variáveis como sexo, idade, procedência, duração da doença e suas manifestações, assim como o tamanho do baço e do fígado.

O sangue retirado da prega cubital logo após a internação foi submetido à contagem das hemácias, leucócitos e das plaquetas; à dosagem do hematócrito, da hemoglobina, e das aminotransferases, da uréia e da creatinina, assim como ao teste para a extração do DNA, contido no cinetoplasto de amastigota de *Leishmania*, pela PCR. O sangue aspirado da medula óssea, parte foi estirado em lâmina, corado e nele foram pesquisadas formas amastigotas, enquanto a outra parte foi acondicionado em tubos com tampa contendo EDTA, e conservado a -20°C para posteriormente ser processada pela PCR.

3.5.2 Alta

No momento da alta foram medidos o baço e o fígado, na região anterior do abdome abaixo da reborda costal, na linha hemiclavicular. O sangue retirado da prega cubital foi

processado para a contagem das hemácias, leucócitos e plaquetas, a dosagem do hematócrito, da hemoglobina, das aminotransferases, da uréia e da creatinina, além da PCR.

3.5.3 Seguimento

Os pacientes retornaram para avaliação com um mes do término do tratamento. Foram medidos o baço e o fígado, na região anterior do abdome abaixo da reborda costal, na linha hemiclavicular. O sangue retirado da veia mediana cubital foi processado para a contagem das hemácias, leucócitos e plaquetas, a dosagem do hematócrito, da hemoglobina, das aminotransferases. Um mililitro de sangue foi acondicionado em tubos com tampa, contendo EDTA a 1% como anticoagulante e conservados a -20°C , para posterior execução da PCR.

3.6 Padronização das técnicas

Todos os tubos e as lâminas utilizados para cada paciente foram identificados com suas iniciais, e a data da coleta, além da origem do material: sangue medular, sangue periférico; sendo omitida a informação relativa ao grupo de estudo a que o paciente pertencia.

O aspirado medular era obtido na crista ilíaca ântero-superior. A pele foi submetida à assepsia, em seguida o anestésico era aplicado na pele e tecido subcutâneo. Após anestesia, a agulha própria para mielograma era posicionada em um ângulo de 45° e pressionada para atravessar os tecidos, em seguida colocada em posição perpendicular à superfície óssea, então empurrada para baixo até atingir a medula óssea; retirava-se o mandril e aspirava-se pequena quantidade de material medular, com seringa de 20 mililitros (HO et al., 1948). Uma vez secos, os esfregaços eram fixados com metanol e corados com Giemsa, em seguida

examinados em microscópio óptico, utilizando-se objetiva de imersão (100 x) para a identificação de formas em amastigotas (OMS, 1996a).

A outra parte do aspirado medular e o sangue periférico foram acondicionados em tubos contendo EDTA a 1%, conservados a -20°C até serem levados ao laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica - GEMPRO da UFAL, onde a técnica da PCR era processada, ou ao Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas da UFAL, onde parte das amostras era também submetida à técnica da PCR.

Foram avaliados pelo exame de sangue o número de hemácias, leucócitos e plaquetas, a quantidade de hemoglobina e o hematócrito, além das aminotransferases (ALT e AST). Valores acima ou abaixo daqueles descritos foram considerados anormais (RAW et al., 1989; VERONESI, 1991). Essas variáveis serão utilizadas para uma caracterização dos casos em um trabalho posterior.

Parâmetros avaliados	Valores normais
Hemácias	4.000.000 a 5.500.000 hemácias/mm ³
Hematócrito	37 a 40 %
Hemoglobina	11 a 13 g/dL
Leucócitos	4.000 a 10.000/mm ³
Neutrófilos	2.000 a 6.200/mm ³
Linfócitos	800 a 3.300/mm ³
Plaquetas	200.000 a 500.000/mm ³
ALT	Até 40 unidades/L
AST	Até 40 unidades/L
Creatinina	0,8 a 1,3 mg/100mL
Uréia	15 a 50mg/100mL

3.6.1 Extração do DNA total

Para a extração do DNA do parasito foi utilizado protocolo recomendado pelo fabricante do Kit de Purificação de DNA genômico sanguíneo GFX (*Amersham Pharmacia Biotech*), como descrito a seguir.

a) Lise das hemácias

Em um tubo contendo 300 μ L de sangue total ou 50 μ L de sangue medular eram adicionados 3 volumes da solução de lise (10 mM KHCO₃, 155 mM NH₄CL, 0,1 mM EDTA). Após uma breve agitação no vórtex, o material era incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, submetido a centrifugação (13.000rpm, 20 segundos, TA) para a coleta da fração leucocitária .

b) Extração e ligação do DNA

Suspenderam-se os leucócitos que estavam no fundo do tubo agitando vigorosamente no vórtex. Em seguida adicionou-se 500 μ L de solução de Extração (Kit de Purificação de DNA genômico sanguíneo GFX/*Amersham Pharmacia Biotech*), deixou-se incubando por 5 minutos, logo após transferiu-se todo o volume para a coluna GFX e centrifugou-se (5000 x g) por 1 minuto. Após desprezar o que ficou no tubo coletor, recolocou-se a coluna no mesmo tubo coletor, e novamente adicionou-se 500 μ L de solução de extração (Kit de Purificação de DNA genômico sanguíneo GFX/ *Amersham Pharmacia Biotech*). Novamente foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida centrifugou-se (5000 x g) por 1 minuto, foi então desprezado o que ficou no tubo coletor; a coluna foi novamente colocada no tubo e adicionou-se 500 μ L da solução de lavagem (Kit de Purificação de DNA genômico sanguíneo

GFX/ *Amersham Pharmacia Biotech*), centrifugou-se (12000 a 16000 rpm) por 3 minutos. A coluna foi retirada do tubo coletor e colocada no tubo definitivo. Para a eluição do DNA, adicionou-se 200µL de TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA pH 8,0) aquecido a 70°C, incubando-se por 1 min, após isto centrifugou-se por 1 min a 8.000 x g. Retirou-se a coluna, obtendo-se o DNA puro.

3.6.2 Detecção do DNA do parasito pela PCR

Para as reações de PCR foram utilizados os iniciadores descritos por LAMBSON et al. (1999), que são F: 5'- GGG GTT GGT GTA AAA TAG G-3' e R: 5'- C CAG TTT CCC GCC CCG -3'. Esses iniciadores flanqueiam uma região conservada e não codificadora 5' NCR de 800pb do kDNA.

Para evitar contaminação com DNA exógeno, as reações de PCR foram montadas em uma área isolada, que foi previamente irradiada, com luz ultravioleta. Nas reações eram combinados: DNA molde (4µL), Tampão da Taq polimerase 1X (*Ludwig Biotecnologia/UFRGS/Br*), iniciadores 0,3 µM (*Invitrogen, USA*), dNTPs 1,25 µM (*Ludwig Biotecnologia/UFRGS/Br*), MgCl₂ 3,0mM (*Ludwig Biotecnologia/UFRGS/Br*), Taq DNA polimerase (2,5 U) (*Ludwig Biotecnologia/UFRGS/Br*), e água livre de nuclease (*Promega, Madison, WI, USA*) para 50 µL finais.

As reações foram submetidas a 35 ciclos de amplificação em um termociclador PCR Express Thermohybrid, usando a temperatura de 95°C por três minutos para a desnaturação, 60°C para anelamento e 72°C para a extensão, por 30 segundos. Ao final do último ciclo, a reação era incubada a 72°C por seis minutos para uma extensão final dos produtos.

3.6.3 Visualização e fotodocumentação dos produtos de amplificação

O produto da PCR era submetido à eletroforese em gel de agarose neutro 1,2% contendo brometo de etídio (4,0 mg/μL). Foram utilizados 9,0 μL de solução de DNA e 1,0 μL do Loading Buffer (1 x sucrose (W/v) 65%; Tris HCL (pH 7,5) 10 mM; EDTA 10 mM; Bromophenol blue (W/w) 0,3%). A eletroforese procedia em tampão TBE 1X(10,8g de Tris base; 5,5g de ácido bórico e 4 mL de EDTA a 0,5M / litro de água destilada), durante 1 hora, a 5v/cm. Após a corrida, o DNA era visualizado em transiluminador de UV e fotografado com sistema digital (DP-001) (*Vilbert Lourmat/França*). A estimativa do tamanho molecular dos fragmentos amplificados foi feita com base no padrão eletroforético do marcador Ladder 100 pb, pelo softwer Photocapt, versão 10.01, registrado por *Vilber Lourmat/França*.

3.7 Análise estatística

Foram estimadas a sensibilidade e a especificidade, e os respectivos intervalos de confiança, da PCR em sangue aspirado da medula óssea e sangue periférico, em relação ao padrão-ouro. Foi verificada a concordância entre os resultados da PCR, em sangue medular e periférico, através do teste de *Kappa* (OPAS, 1997).

Para comparação das dimensões do fígado e do baço, no início do tratamento e em diferentes momentos da evolução, foi utilizado o teste de t pareado, para variáveis contínuas, sendo a diferença considerada estatisticamente significante quando o valor de p era menor do que 0,05.

3.8 Aspectos éticos

O projeto de estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFAL (APÊNDICE 1), registrado sob número 23065.004458/2001-78, tendo sido aprovado em 30 de agosto de 2001.

Ao serem convidados a participar da pesquisa, os pacientes e, quando menores de idade, seus representantes legais, eram informados sobre os objetivos do estudo, tendo-lhes sido esclarecido que, caso não concordassem em participar, ser-lhes-ia assegurado o direito de receber o mesmo atendimento e tratamento necessários. Era-lhes também assegurado que seria mantido o sigilo quanto a sua identidade, não sendo mencionado nome, número de registro ou qualquer outra forma de identificação dos pacientes, em toda e qualquer publicação a ser elaborada com esses dados.

Àqueles que concordaram em participar, era solicitada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, em concordância com a Declaração de Helsinki VI, aprovada em 1996 em Hong-Kong e referendada em 2000 na Bélgica (APÊNDICE 2).

Os dados serão mantidos por cinco anos pela pesquisadora, para eventuais comprovações.

RESULTADOS

4.1 Característica geral da amostra

Foram selecionados para o estudo 162 pacientes internados no Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto (HEHA), em Maceiό-Alagoas, com a hipótese de diagnóstico de LVA, de abril de 2003 a março de 2005.

Do total de pacientes admitidos 91(56,2%) eram do sexo masculino e 71(43,8%) do sexo feminino.

As idades dos pacientes variaram de quatro meses a 66 anos, com média igual a $13,01 \pm 13,03$ e mediana de 8,5 anos de idade. Entre os pacientes do sexo masculino a média de idade foi igual a $15,0 \pm 13,8$ e a mediana foi de 12,0 anos (mínimo de 4 meses e máximo de 59 anos), e entre os pacientes do sexo feminino a média foi igual a $10,4 \pm 11,5$ e a mediana de 6,0 anos (mínimo de 7 meses e máximo de 66 anos). Chama a atenção à proporção elevada de pacientes menores de 15 anos de idade (63% da amostra) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição por sexo e faixa etária dos pacientes admitidos com a hipótese de diagnóstico de LVA no Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto (Maceiό-AL), no período de abril de 2003 a março de 2005

Idade (anos)	Sexo		Total	%	Cumulativo %
	masculino	feminino			
< 1	5	4	9	5,6	5,6
1 — 5	23	27	50	30,9	36,4
5 — 10	14	11	25	15,4	51,9
10 — 15	10	8	18	11,1	63,0
15 — 20	10	9	19	11,7	74,7
20 — 30	13	8	21	13,0	87,7
30 — 40	9	2	11	6,8	94,4
≥ 40	7	2	9	5,6	100
Total	91	71	162	100,0	

A procedência dos pacientes era, em sua maioria, da zona rural, 106 (65,4%), e somente 56 (34,6%) vieram da zona urbana. Com exceção de um paciente proveniente do Estado de Pernambuco, os demais eram autóctones de Alagoas, distribuídos pela região agreste 49 (30,4%), 59 (36,6%) pelo sertão e 53 (32,9%) pelo litoral do Estado.

Do total de pacientes admitidos com a hipótese de diagnóstico de LVA, a doença foi confirmada em 104 (64,40%), os demais 58 (35,8%) pacientes tiveram o diagnóstico afastado. Considerou-se a epidemiologia, a clínica, e o achado do parasito no aspirado medular, e a resposta ao tratamento (vide definição de padrão-ouro) como critérios de diagnóstico (FNS, 2002). O aspirado medular obtido em 99 dos 104 casos foi submetido à microscopia óptica; amastigotas de *Leishmania* foram encontradas em 86 (87%) dos indivíduos e nos 13 (13%) pacientes nos quais não foi identificado o parasito no aspirado medular o diagnóstico fundamentou-se na clínica, no hemograma, e na resposta favorável ao tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação dos indivíduos em caso e não caso de LVA, conforme critério de diagnóstico em 162 pacientes admitidos no Hospital Escola Dr. Hélio Auto, de abril de 2003 a março de 2005

Critério diagnóstico	Casos de LVA			Não casos de LVA		
Epidemiologia	+	+	+	+	-	
Clínica	+	+	+	-	-	
Clínica/ boa resposta tratamento	+	+	+	NR	NR	
Aspirado medular*	+	-	NR	-	-	
Hemograma	+	+	+	-	-	
Total pacientes	86	13	5	56	2	162
%	53,0	8,0	3,0	34,6	1,4	100

* Encontro de amastigotas de *Leishmania* no material coletado
NR – não realizado

Dos 104 pacientes diagnosticados com LVA, 58 (55,8%) eram do sexo masculino e 46 (44,2%) do sexo feminino

As idades dos pacientes variaram de sete meses a 66 anos, com média igual a $12,9 \pm 13,8$ e a mediana de 9,5 anos. Nos pacientes do sexo masculino as idades variaram entre 11 meses a 59 anos, com média de $14,8 \pm 14,5$ e a mediana de 9,5 anos. Nas pacientes do sexo feminino a variação foi de sete meses a 66 anos, com média de $10,5 \pm 12,6$ e a mediana de quatro anos (Tabela 3). Importante ressaltar que 67,5% dos casos de LVA eram menores de 15 anos (Gráfico 1).

Em sua maioria os pacientes vieram da zona rural 83 (79,8%). Em relação às regiões fisiográficas, o sertão alagoano contribuiu com 50 (48,1%) dos casos.

Tabela 3 – Distribuição por sexo e faixa etária dos pacientes admitidos com LVA no Hospital Escola Dr.Hélvio Auto (Maceió-AL), no período de abril de 2003 a março de 2005

Idade (anos)	Sexo		Total	Cumulativo	
	masculino	Feminino		%	%
< 1	2	2	4	3,8	3,8
1 — 5	17	22	39	37,5	41,3
5 — 10	10	4	14	13,5	54,8
10 — 15	8	3	11	10,6	65,4
15 — 20	4	6	10	9,6	75,0
20 — 30	6	6	12	11,5	86,5
30 — 40	6	2	8	7,7	94,2
≥ 40	5	1	6	5,8	100
Total	58	46	104	100	

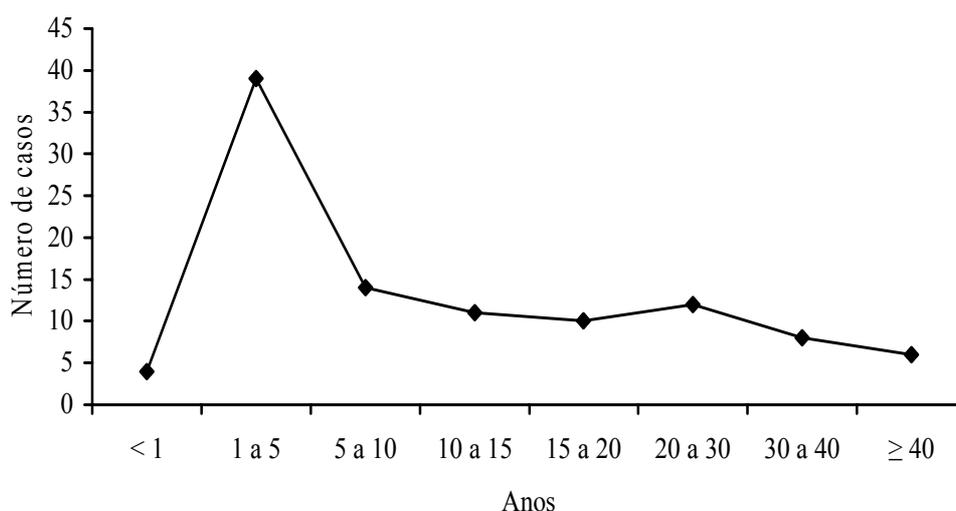


Gráfico 1. Distribuição dos pacientes com LVA internados no HEHA (Maceió-AL) no período de abril de 2003 a março de 2005, de acordo com a faixa etária.

Os 104 doentes com LVA foram tratados com N-metilglucamina, principal droga para o tratamento da parasitose, anfotericina B ou ambos os medicamentos (MS, 2003). A maioria, 93 (89,4%), tratada com N-metilglucamina e 3 (2,8%) receberam apenas anfotericina B. Em oito (7,7%) pacientes usou-se inicialmente N-metilglucamina; destes, 4 (3,8%) por intolerância às doses iniciais do antimonial e 4 (3,8%) por não responder ao tratamento com antimonial, também fizeram uso de anfotericina B.

Quatro pacientes faleceram, um deles na primeira semana do tratamento em decorrência da própria doença, o segundo no vigésimo dia, em consequência de pneumonia; e os dois outros por falta de resposta ao antimonial pentavalente e a anfotericina B.

O diagnóstico de LVA foi afastado em 58 pacientes. Destes, 33 (56,9%) eram do sexo masculino e 25 (43,1%) do sexo feminino. As idades variaram de 07 meses a 43 anos, com média igual a $13,1 \pm 11,4$ e mediana de 10 anos de idade (mínimo de quatro meses e máximo de 43 anos). Houve predominância de pacientes procedentes da zona urbana, 35 (60,3%), e da região litorânea, 33 (57,9 %) dos pacientes.

Em 41 (70,68) desses pacientes o sangue aspirado da medula foi submetido a PCR, sendo negativa em 17(41,5%) e positiva em 24 (58,5%).

4.2 Resultado da PCR de pacientes admitidos com a hipótese de diagnóstico de LVA

4.2.1 Teste aplicado no sangue aspirado da medula óssea

Amostras de sangue medular de 88 indivíduos, sendo 47 com LVA e 41 sem a doença, foram submetidas a PCR. O exame foi positivo em pacientes com e sem a doença (Figuras 1 e 2). A concordância entre a visualização de amastigotas à microscopia óptica e a PCR foi considerada sofrível (*Kappa* 0,21 – 0,40) (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultado da PCR em sangue aspirado da medula óssea de pacientes com e sem parasitos à microscopia óptica

PCR	Microscopia		Total	
	Parasito positivo	Parasito negativo		
Positivo	46 (100%)	25 (59,5%)	71	
Negativo	0	17 (40,5%)	17	
Total	46	42	88	<i>Kappa</i> =0,41

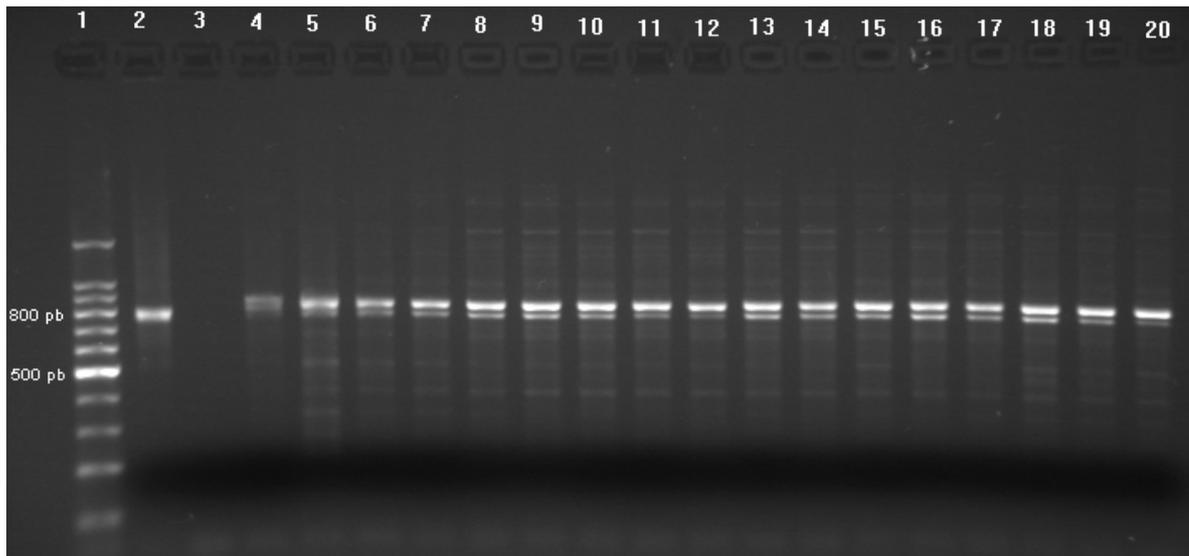


Figura 1. Visualização em gel de agarose de produtos amplificados pela PCR do kDNA da *Leishmania*.

Poço 1 – marcador de tamanho molecular 100 pares de bases. Poço 2 – controle positivo (DNA de *Leishmania* spp.)

Poço 3 – controle negativo (água destilada); poço 4,5,6,7,13,15,16,20 sangue periférico antes do tratamento, PCR positiva;

Poço 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18, 19 - sangue periférico após o tratamento, PCR positiva.

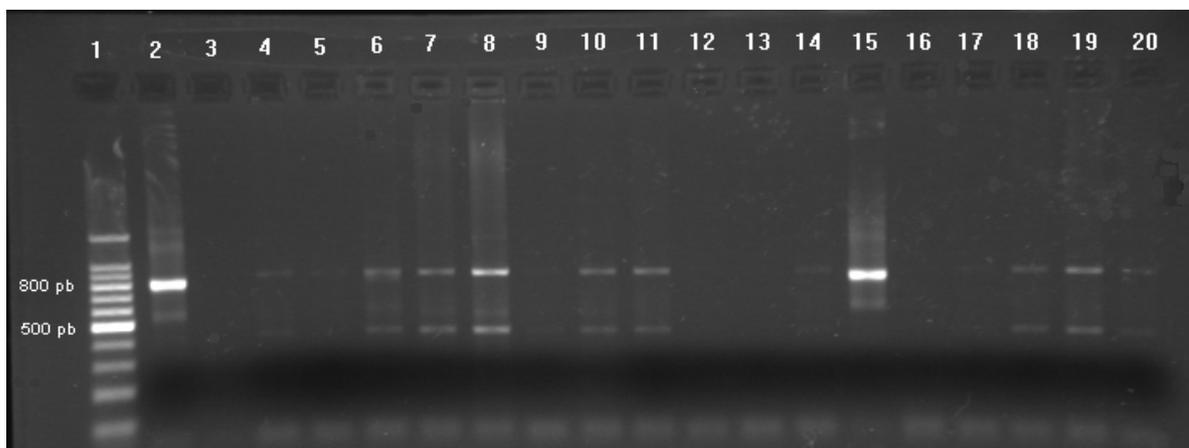


Figura 2 – Visualização em gel de agarose de produtos amplificados pela PCR do kDNA da *Leishmania*.

Poço 1- marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases; Poço 2 – controle positivo (DNA de *Leishmania* spp); Poço 3 – controle negativo (água destilada); Poço 4,6,15, – sangue medular, PCR positiva; poço 5 – sangue medular, PCR negativa; poço 7,10,11,18,19,20 – sangue periférico após tratamento, PCR positiva; poço 8 – sangue periférico antes do tratamento, PCR positiva. Poço 9,12, 13,14,16,17 – sangue periférico, PCR negativa.

4.2.2 Teste aplicado no sangue periférico

O sangue periférico de 107 pacientes com e sem parasitos à microscopia óptica foi submetido a PCR, sendo positivo em 54 (98,2%) dos pacientes com parasitos à microscopia óptica, e em 32 (61,5%) dos pacientes em que não se observaram parasitos à microscopia óptica. Importante ressaltar que, entre os pacientes com aspirado medular negativo ao exame microscópico, cinco eram doentes de LVA e foram positivos quando submetidos à PCR. A concordância entre a visualização ou não do parasito no aspirado medular e o teste ser positivo foi considerada sofrível (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultado da PCR em sangue periférico de pacientes com e sem parasitos à microscopia óptica

PCR	Microscopia		Total	
	Parasito			
	positivo	negativo		
Positivo	54 (98,2%) ^a	32 (61,5%)	86	
Negativo	1 (1,8%)	20 (38,5%) ^b	21	
Total	55	52	107	<i>Kappa=0,37</i>

^a IC 95% 89,0 – 99,9

^b IC 95% 25,6 – 52,9

4.2.3 Pacientes com e sem LVA

4.2.3.1 Validade da PCR testada no sangue aspirado da medula óssea

Indivíduos doentes de LVA e não doentes tiveram o aspirado medular submetido a PCR. Verificou-se que em todos os pacientes com LVA o exame foi positivo, assim como em 24 (58,5%) dos que não tinham a doença, levando a uma baixa especificidade, como observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultado da PCR em aspirados medulares de pacientes com e sem LVA antes do início do tratamento

PCR	Leishmaniose visceral americana		IC 95%
	Doentes	Não doentes	
Positivo	47(100%) ^a	24 (58,5%)	90,5 – 100,0 ^a
Negativo		17 (41,5%) ^b	26,7 – 57,8 ^b
Total	47 (100%)	41 (100 %)	

4.2.3.2 Validade da PCR no sangue periférico

O sangue periférico de 61 doentes, antes que o tratamento para LVA fosse iniciado, e de 49 não doentes foi submetido a PCR. Obteve-se resultado positivo em 59 (96,7%) dos doentes e em 29 (59,2%) dos não doentes (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultado da PCR em sangue periférico de pacientes com e sem LVA antes do início do tratamento.

PCR sangue periférico	Leishmaniose visceral americana		IC 95%
	Doente	Não doente	
Positivo	59 (96,7%) ^a	29 (59,2%)	87,64 – 99,43 ^a
Negativo	02 (3,3%)	20 (40,8%) ^b	27,31 – 55,74 ^b
Total	61	49	

4.2.3.3 Concordância da PCR em sangue periférico e medular

Comparando-se os resultados da PCR obtidos no sangue aspirado da medula óssea com a PCR do sangue periférico, antes do início do tratamento, obteve-se a concordância de 0,88, que é classificada como ótima ($Kappa = 0,88 - 0,99$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação entre os resultados da PCR em sangue aspirado da medula óssea e sangue periférico de pacientes com e sem LVA

PCR sangue periférico	PCR sangue medular		
	Positivo	Negativo	
Positivo	66 (97,1%)	01 (6,7%)	
Negativo	02 (2,9%)	14 (93,3%)	
Total	68	15	Kappa=0,88

O fígado e o baço dos pacientes com LVA foram medidos na admissão e ao término do tratamento. Houve redução do tamanho médio das vísceras. Esta redução de tamanho, ao ser submetida ao teste T pareado, mostrou-se estatisticamente significativa.

4.3 Avaliação em um grupo de pacientes com LVA através da técnica da PCR e pela redução das vísceras, durante a evolução da doença

Dos pacientes diagnosticados com LVA admitidos no estudo, 30 tiveram o sangue periférico testado pela PCR antes do início do tratamento e ao seu término. Desses, 20 (66,7%) eram do sexo masculino e 10 (33,3%) do sexo feminino, com sete meses a 59 anos de idade (mediana de sete anos e a média igual a $14,29 \pm 16,23$ anos). Observou-se que somente 3 (10%) tornaram-se negativos ao fim do tratamento (Tabela 9).

Todos esses pacientes foram tratados com N-metilglucamina, exceto um que apresentou intolerância às primeiras doses do antimonial, sendo o tratamento substituído por anfotericina B.

Tabela 9 – Resultado da PCR em sangue periférico de pacientes antes e após o tratamento para LVA

	PCR	
	Antes do tratamento	Término do tratamento
Positivo	30	27 (90%)
Negativo	0	3 (10%)
Total	30	30

O fígado e o baço desses pacientes foram medidos na admissão e ao término do tratamento, havendo redução do tamanho médio das vísceras. A diferença nas dimensões do fígado e do baço entre a admissão e o término do tratamento foi estatisticamente significativa (Tabela 10).

Tabela 10 – Média do tamanho do fígado e do baço na admissão e ao término do tratamento e média de redução, em 30 pacientes que tiveram o sangue periférico testado pela PCR

	Tamanho do órgão (Média ± DP cm)	
	Fígado	Baço
Medida na admissão	4,91 ± 2,83	9,41 ± 4,49
Medida ao término tratamento	3,27 ± 1,95	3,65 ± 3,37
Redução do órgão	1,63 ± 1,99	5,76 ± 3,23
Intervalo de confiança 95%	0,87 – 2,39	4,55 – 6,97
Valor de p	0,000	0,000

DP – desvio padrão

Os demais pacientes com LVA, além de terem o fígado e o baço medidos na admissão e ao término do tratamento, foram também avaliados com um mês e três meses após o tratamento. Verificou-se redução do tamanho médio tanto do fígado como do baço, sendo a diferença estatisticamente significativa (Tabela 11).

Tabela 11 – Média de redução do tamanho do fígado e do baço na admissão (Ad), comparada com o término do tratamento (TT).

	Tamanho do órgão (Média ± DP cm)	
	Fígado (Ad x TT)	Baço (Ad x TT)
Número de pacientes	78	79
Medida na admissão	5,23 ± 2,68	9,22 ± 3,94
Medida no término tratamento	3,01 ± 2,05	3,63 ± 3,0
Redução do órgão	2,21 ± 2,19	5,58 ± 3,14
Intervalo de confiança 95%	1,71- 2,70	4,87 – 6,28
Valor de p	0,000	0,000

DP – desvio padrão

4.4 Comparação entre os pacientes sem LVA e com PCR positiva (falso positivos) e PCR negativa

Os pacientes sem LVA, mas com a PCR no sangue medular positiva (falso positiva), eram do sexo masculino 11(45,8%) e 13 (54,2%) do feminino. As idades variaram entre um e 40 anos, com a mediana de 10 anos e a média de $12,7 \pm 10,5$ anos. Todos os pacientes, exceto dois, procediam de região endêmica para LVA. A média dos tamanhos dos fígados foi igual a $4,3 \pm 2,2$ cm, com uma variação de 0,0 a 8,5 cm e a média do tamanho do baço foi igual a $4,7 \pm 5,1$ cm, variando de 0,0 a 13 cm.

Eram portadores das seguintes doenças: esquistossomose hepatoesplênica em sete pacientes, anemia em três, febre tifóide em dois, tuberculose pulmonar em dois e um paciente para as seguintes enfermidades: mononucleose infecciosa, enterobacteriose septicêmica prolongada, linfoma, esferocitose, leucemia. Sem diagnóstico, cinco pacientes.

Os pacientes sem LVA, e com a PCR no sangue medular negativa, eram do sexo masculino 13 (76,5%) e 04 (23,5%) do feminino. As idades variaram entre oito meses a 43 anos, com a mediana de 17 anos e a média de $17,2 \pm 14,7$ anos. Todos os pacientes procediam de região endêmica para LVA. A média dos tamanhos dos fígados foi igual a $3,9 \pm 3,2$ cm,

com uma variação de 0,0 a 12 cm e a média do tamanho do baço foi igual a $4,0 \pm 3,9$ cm, variando de 0,0 a 10 cm.

Esses pacientes eram portadores das seguintes doenças: esquistossomose hepatoesplênica dois pacientes, anemia em dois, febre tifóide em dois, e um paciente para as seguintes enfermidades: cardiopatia congênita, sepse, AIDS, tuberculose pulmonar, pneumonia, doença de Hodgkin. Cinco pacientes saíram sem diagnóstico.

Compararam-se os pacientes sem LVA, mas com a PCR positiva, com os sem LVA e a PCR negativa. Observou-se que não havia diferença estatisticamente significativa com relação à idade (ANOVA $p=0,26$), ao sexo ($\chi^2 p=0,04$) e aos tamanhos médios tanto do fígado quanto do baço (ANOVA $p_{\text{fígado}}=0,60$ e $p_{\text{baço}}=0,63$).

4.5 Comparação entre pacientes com LVA que tiveram o sangue testado pela PCR com aqueles que não tiveram

Comparou-se a idade, o sexo, o tamanho do fígado e do baço de pacientes com LVA que tiveram o sangue testado pela PCR com pacientes também com LVA, mas que não tiveram o sangue testado pela PCR, como uma forma de avaliar um possível viés de seleção. Essas comparações, quando submetidas à análise de variância (ANOVA), não mostraram diferenças estatisticamente significantes ($p_{\text{idade}} = 0,10$, $p_{\text{fígado}} = 0,54$, $p_{\text{baço}} = 0,14$) e o sexo avaliado por teste não paramétrico ($\chi^2 p=0,26$) também não revelou significância estatística. Portanto, o resultado das análises feitas entre os pacientes com LVA que tiveram o sangue testado pela PCR e os que não tiveram foram comparáveis em relação às variáveis avaliadas, o que sugere que a sua inclusão não alteraria de forma importante os resultados.

DISCUSSÃO

Os pacientes suspeitos de ter LVA admitidos neste estudo eram indivíduos jovens, com 63% deles menores de 15 anos, e após a confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral o percentual de jovens foi mantido. Tais resultados foram comparáveis aos achados por Alves et al. (2005), quando relataram os casos ocorridos no Brasil, entre os anos de 2000 a 2004. Conforme observações de Deane (1958), o calazar neotropical, como é conhecida a leishmaniose visceral americana, situa-se em uma posição intermediária entre os tipos “indiano,” que acomete 62% dos indivíduos entre cinco a 19 anos, e o tipo “mediterrâneo,” em que os menores de cinco anos perfazem 93% dos casos.

Com relação ao sexo, a maior quantidade de casos ocorreu no sexo masculino. Alencar (1956) atribuiu esse fato à maior área corporal masculina usualmente descoberta, e conseqüentemente, mais exposta à picada dos vetores. É pouco provável que somente esse fato explique a diferença, uma vez que a picada dos insetos vetores deva ser aleatória, independente do sexo e faixa etária. Bradley (1982) sugere a investigação da modulação genética ligada ao sexo, na susceptibilidade à leishmaniose visceral.

Entre os pacientes com LVA houve maior número de indivíduos da zona rural (79,8%), achados concordantes com resultados anteriores da mesma região (PEDROSA & ROCHA, 2004). As cidades que mais notificaram casos foram Traipu, São José da Tapera e Santana do Ipanema, com índice de desenvolvimento humano (IDH)/renda, classificado como médio baixo para as duas primeiras, enquanto a última foi classificada como médio. A associação entre nível econômico baixo e a doença aparecem nos relatos de Deane (1956), Arias et al. (1996).

As manifestações clínicas da LVA diferem muito pouco da leishmaniose visceral observada em outros continentes (SILVA et al., 2001). O diagnóstico da LVA necessita ser feito o mais breve possível; e os pacientes não tratados invariavelmente evoluem para o óbito (SEAMAN et al., 1996; FICHOUX et al., 1999; LACHAUD et al., 2000; DISCH et al, 2003).

A manifestação clínica inicial é a febre. Essa é o maior indício para que uma pessoa determine que outra esteja doente (STERN, 1977). Quase sempre é alta, contínua, com duração aproximada de duas semanas, por vezes lembrando a febre tifóide (RODRIGUES DA SILVA, 1957). Observa-se palidez progressiva da pele e das mucosas, emagrecimento e aumento do volume abdominal em decorrência do crescimento do baço e quase sempre do fígado. Em geral, o baço é maior que o fígado, porém, com o tratamento, a regressão do tamanho do baço ocorre mais precoce e rapidamente que a do fígado (PEDROSA & ROCHA, 2004). São também freqüentes as alterações dos fâneros: cabelos secos, sem brilho, caindo facilmente, contrastando com os cílios, longos e sedosos (PRATA, 1957; PEDROSA, 1998). Alguns pacientes apresentam sangramentos, icterícia e dor abdominal, vômitos e diarreia; estas manifestações são observadas em pacientes com evolução mais severa.

O exame microscópico direto e ou a cultura do aspirado esplênico é o teste de referência para comprovar o diagnóstico da doença; entretanto, não é recomendável nos serviços em área endêmica. O aspirado de linfonodo e medula óssea, apesar de menos sensível que o aspirado esplênico é o teste de referência nos serviços de saúde, em área endêmica (BOELAERT et al., 2004). Mesmo sendo um procedimento de baixo risco para o paciente, mas por necessitar de pessoal técnico treinado, por ser invasivo e com sensibilidade variável, procura-se um teste que seja sensível, específico, rápido e simples.

Com o desenvolvimento da PCR no final dos anos 80 por Mullis (1990), muitos pesquisadores começaram a aperfeiçoá-la e testá-la em diferentes agentes infecciosos. Trabalhos foram publicados em pacientes com LV, obtendo-se sensibilidade e especificidade elevadas (SALOTRA et al., 2001; LAMBSON et al., 1999; DISCH & RABELLO, 2001).

A partir dessas publicações resolveu-se avaliar pela PCR pacientes suspeitos de ter LVA, utilizando o sangue aspirado da medula óssea e o sangue periférico, comparando-a com a microscopia óptica. A maioria das publicações relata a utilização da técnica da PCR em

indivíduos com leishmaniose visceral e em sadios, procedentes de região diferente dos casos. Os resultados obtidos nesses trabalhos responderam de forma satisfatória ao estudo tipo II, segundo Sackett & Haynes (2002). Entretanto, o objetivo deste estudo foi avaliar pela PCR todos os pacientes suspeitos de ter LVA, conseqüentemente, esta forma de avaliação ajusta-se ao tipo III de Sackett & Haynes (2002).

Dos 162 indivíduos admitidos no estudo obteve-se sangue medular de 157; destes, 88 amostras de sangue medular foram processadas pela PCR, sendo positivas em 71 indivíduos e negativas em 17. Em 46 dos 71 indivíduos com a PCR positiva, a pesquisa do parasito pela microscopia óptica foi também positiva, enquanto em 25 a pesquisa do parasito foi negativa. Em 17 pacientes o resultado dos dois testes foi negativo.

Os resultados obtidos nos pacientes que foram positivos pelos dois métodos de diagnóstico são concordantes com os de Osman et al. (1997) e Salotra et al. (2001), que também observaram elevada sensibilidade da PCR no sangue medular, e concluíram que a PCR é tão boa quanto a pesquisa de parasitos em linfonodos ou medula óssea, nos casos confirmados de leishmaniose visceral.

Dos 25 indivíduos suspeitos de LVA, para os quais somente a PCR foi positiva, 24 tiveram esta hipótese de diagnóstico afastado. Em um paciente firmamos o diagnóstico de LVA mesmo com o exame parasitológico negativo, por apresentar dados epidemiológicos, clínica, hemograma com pancitopenia, além da resposta satisfatória ao tratamento.

Há na literatura relatos da existência de indivíduos assintomáticos em região endêmica. No Nordeste da Itália, Pampiglione et al. (1974) analisaram o soro de indivíduos, e 3,7% destes apresentaram anticorpos contra *Leishmania* pelo teste da fixação do complemento. Seis indivíduos assintomáticos foram submetidos à biópsia hepática, somente em um deles foram encontradas amastigotas no tecido hepático. No Brasil, Evans et al. (1992), avaliando crianças menores de 11 anos, encontraram em 4,6% delas anticorpos contra

Leishmania (pelo teste de ELISA). Posteriormente, ainda no Brasil, Caldas et al. (2001) encontraram em 34,4% de crianças (entre zero a cinco anos) anticorpos contra *Leishmania* pelo teste de ELISA. Mais recentemente Adini et al. (2003) pesquisaram anticorpos contra *Leishmania* em soro de indivíduos assintomáticos residentes no norte de Israel, por meio do teste ELISA e identificaram 2,9 % de indivíduos positivos.

Esses estudos sugerem que essa protozoose comporta-se de forma comparável à tuberculose e a hanseníase, nas quais o número de infectados é muito maior que aqueles com a forma clássica da doença.

Em seguida investigou-se a validade da PCR no sangue periférico de 107 indivíduos suspeitos de ter LVA, sendo positiva em 86 (80,4 %) e negativa em 21(19,6%) dos indivíduos. Entre os pacientes positivos pela PCR, 54 (98,2%) também eram positivos pela microscopia óptica em sangue aspirado da medula. Os resultados encontrados usando sangue periférico mostrou positividade menor do que quando foram avaliados sangue medular; porém, positividade mais elevada do que a relatada por Nuzum et al. (1995), que observaram 90% de sensibilidade; enquanto Disch et al. (2003), estudando pacientes brasileiros, encontraram um percentual de sensibilidade de 91%.

Os resultados encontrados quando foi usado sangue periférico sugerem que este poderá substituir o sangue medular, considerando a aceitação e a facilidade na sua obtenção.

Em um paciente, mesmo tendo sido visualizado parasito no aspirado medular pela microscopia óptica, a PCR não detectou DNA no sangue periférico.

Algumas razões devem ser lembradas para explicar esse falso-negativo pela PCR, como: perda do material no momento do exame, duração e condições de estocagem da amostra, presença de alguma substância no sangue de alguns pacientes inibindo a reação, ou ainda periodicidade dos parasitos circulantes.

Entre os 32 indivíduos que foram positivos pela PCR e não se visualizaram parasitos pela microscopia óptica, quatro receberam o diagnóstico de LVA.

Autores como Osman et al. (1997) lembram a elevada sensibilidade da PCR, e sua conseqüente importância, naqueles pacientes com baixa parasitemia, cujo diagnóstico parasitológico é sempre difícil, e que nestes casos a PCR seria um método auxiliar, complementando a limitação do exame parasitológico.

Fichoux et al. (1999), examinando sangue de indivíduos residentes em região endêmica para LV, encontraram, em doadores de sangue, 76 com sorologia positiva para LV; em nove destes, a PCR também foi positiva, enquanto Sharma et al. (2000) encontraram amastigotas em 1,3% dos indivíduos, quando examinaram amostras de sangue de pessoas assintomáticas, em uma região endêmica da Índia.

Como conseqüência de todas essas informações, conclui-se que a infecção sem doença é comum nas regiões endêmicas, positivando testes muito sensíveis, como a PCR.

Considerando a Tabela 6, observam-se 17 indivíduos também suspeitos de ter a doença que foram negativos pelos dois testes, receberam outros diagnósticos, mesmo sendo procedentes de região endêmica. Acredita-se que estes indivíduos reajam de forma diferente à presença do parasito. Estudiosos afirmam que a interação entre o parasito e seu hospedeiro depende de complexa interação de fatores de virulência do parasito, e da reação imune do hospedeiro, que são geneticamente determinados (PEARSON et al., 1983).

Os doentes de LV não apresentam reação de hipersensibilidade do tipo tardio aos antígenos do parasito, havendo ausência de proliferação linfocitária e inadequada produção ou liberação de interferon gama e interleucina-2 que são citocinas associadas à resposta imune (ZWINGENBERGER et al., 1990). Quando nos estágios iniciais da infecção, o hospedeiro é capaz de produzir interferon gama, a infecção é controlada (CARVALHO et al., 1994). Conforme Pearson & Sousa (1989), a imunidade mediada por células é a responsável pela

resolução espontânea da infecção e prevenção de re-infecções. É possível que esses 17 indivíduos livres de infecção, expostos ao risco de adquiri-la, sejam competentes do ponto de vista imunológico, não permitindo o desenvolvimento da doença.

Conhecendo-se a variável sensibilidade do exame parasitológico (padrão ouro) no sangue medular, conseqüentemente a existência de falso-negativo por este método, os indivíduos foram separados em doentes e não doentes de LVA. Verificou-se que a sensibilidade permaneceu elevada tanto no sangue medular como periférico, no entanto a especificidade continuou baixa. Esses resultados divergiram de autores como Lachaud et al., (2000) e Disch et al., (2003) que encontraram 100% de especificidade. Para Piarroux et al., (1994) a especificidade de 100% em seu experimento significou a não reação cruzada com outros cinetoplastídeos ou outros protozoários por eles examinados.

Há nos relatos desses autores a informação de que o teste foi aplicado em pacientes com LV e em sadios procedentes de região diferente dos casos. As publicações acima referidas responderam de forma satisfatória a pergunta da fase II, segundo Sackett & Haynes (2002).

No atual estudo os achados referentes aos indivíduos sem LVA, porém residentes em área endêmica e a PCR positiva, estão de acordo com os resultados de Fichoux et al. (1999); Sharma et al. (2000) e o Lambson et al. (2000). Estes últimos sugerem o uso do teste para a identificação de portadores assintomáticos do parasito, em área endêmica.

Acreditando na possibilidade da PCR ser usada como marcador de cura parasitológica, 30 pacientes tiveram o sangue periférico processado pela PCR, antes e após o tratamento. Eles apresentaram boa evolução, com redução das vísceras, especialmente do baço, mas somente 3 tornaram-se negativos pela PCR.

Esses dados diferiram dos de Disch et al. (2004), que observaram negatificação da PCR durante ou até sete dias após o seu término; como também dos achados de Cascio et al.

(2002), nos quais a PCR se tornou negativa no sexto dia após o início do tratamento. Os resultados aqui encontrados são concordantes com os achados de Schaefer et al. (1995), que acreditam que o tratamento reduz o número de parasitos, mas não os elimina; como também as observações feitas por Pizzuto et al. (2001) em um seguimento de pacientes onde a negatificação da PCR aconteceu em seis a 21 semanas.

Considerando a persistência da positividade da PCR nos pacientes nesse estudo, lembra-se o curto período de seguimento, como também que o antimonial foi a medicação predominante, e que, na experiência de Cascio et al. (2002), esta medicação retardou a negatificação da PCR.

Esse estudo avaliou pacientes suspeitos de ter LVA, pela PCR. A positividade encontrada foi elevada, tanto no sangue medular como periférico; entretanto o teste também, foi positivo em pacientes sem a doença, mas procedentes de região endêmica (falso positivos).

Testes cutâneos, como a reação de Montenegro, pesquisa de anticorpos no soro de pessoas, revelam que o contato com o agente infeccioso estimulou a imunidade tanto a mediada por células, como por anticorpos; mas não informam se o parasito está presente nos tecidos do indivíduo. Mas, quando avaliados pela PCR e esta é positiva, isso significa que eles carregam o próprio parasito. Isso remete à leishmaniose visceral encontrada na Índia, no Sudão onde o reservatório da doença é o próprio paciente e fonte de infecção para os vetores. Seria a leishmaniose visceral americana humana fonte de infecção para o *Lutzomyia longipalpis*?

Trabalhando em região endêmica, Deane (1956) observou que os flebotomíneos alimentados em pacientes com leishmaniose visceral adquiriram a infecção e que esta não foi diferente nos flebotomíneos que se infectaram em cães.

O objetivo deste trabalho era avaliar todos os pacientes admitidos no estudo, pela PCR; porém somente uma parte teve o sangue testado. Em consequência disto, poderia existir viés de seleção. Resolveu-se comparar os pacientes sem LVA e com a PCR positiva com os que tiveram a PCR negativa, como também os pacientes com LVA que tiveram o sangue testado pela PCR com, os que não tiveram. Os resultados destas análises não mostraram diferenças com significância estatística. Portanto, a não inclusão destes certamente não alteraria os resultados.

Pelos resultados obtidos nesse estudo conclui-se que a PCR não deve ser valorizada isoladamente no diagnóstico da doença. É possível que a PCR se torne um teste diagnóstico auxiliar para o clínico, nos indivíduos com forte suspeita da doença e não diagnosticados pelo aspirado medular, com a vantagem de poder ser feita no sangue periférico, podendo ser usada para acompanhar a evolução nos infectados, avaliar os animais reservatórios e os vetores envolvidos na cadeia epidemiológica da LVA. Cada teste poderá ser usado em um determinado momento e para uma finalidade específica.

Considerando a validação da PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral, este estudo responde a pergunta formulada na fase III, segundo Sackett & Haynes (2002). Conforme os resultados encontrados, a PCR apresenta limites na confirmação do diagnóstico da LV, por ser positiva (falso-positiva) em não doentes, porém residentes em região endêmica, e por continuar positiva em muitos indivíduos ao término do tratamento, possivelmente não será um bom marcador para a cura do doente.

CONCLUSÕES

- ❖ A doença predominou em pacientes menores de 15 anos, procedentes da zona rural e da região do sertão alagoano.
- ❖ A PCR foi positiva em todos os pacientes que tiveram o diagnóstico de LVA confirmado pela identificação do parasito no aspirado medular.
- ❖ A PCR foi positiva no sangue periférico de 97,1%, dos pacientes que tiveram o diagnóstico de LVA confirmado, pela identificação do parasito no aspirado medular.
- ❖ Houve concordância entre a positividade da PCR no sangue aspirado da medula óssea e periférico, quando comparada à visualização do parasito no aspirado medular pela microscopia óptica.
- ❖ Ao término do tratamento houve melhora clínica avaliada pela redução estatisticamente significativa tanto do fígado como do baço, embora a PCR permanecesse positiva em 90% dos casos.
- ❖ Ao término do tratamento dos demais pacientes com LVA, observou-se redução estatisticamente significativa, tanto do fígado como do baço.
- ❖ A PCR mostrou-se positiva tanto em pacientes com LVA, como em pacientes sem LVA, em sua maioria procedentes de região endêmica.

REFERÊNCIAS

ADINI, I.; EPHROS, M.; CHEN, J.; JAFFE, C.L. Asymptomatic visceral leishmaniasis, Northern Israel. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.3, p.397-398, 2003.

AHLUWALIA, I.B.; BERN, C.; COSTA, C.; AKTER, T.; CHOWDHURY, R.; ALI, M.; ALAM, D.; KENAH, E.; AMANN, J.; ISLAM, M.; WAGATSUMA, Y.; HAQUE, R.; BREIMAN, R.; MAGUIRE, J.H. Visceral leishmaniasis: consequences of a neglected disease in a Bangladesh community. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.69, n.6, 624-628, 2003.

ALENCAR, J.E.; ARAGÃO, T. Leishmaniose visceral no Ceará. Sintomas observados em 174 casos. I. Diagnóstico clínico. In: Congresso Brasileiro de Higiene, Belém-Pará, 09-15 jan. 1955.

ALENCAR, J.E. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. *Publicação Médica*, v.196, p.71-85, 1956.

ALENCAR, J.E.; ALMEIDA, Y.M.; SILVA, Z.F.; PAIVA, A.S.; FONSECA, M.F. Aspectos atuais do calazar no Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia*, v.25, p.27-53, 1974.

ALEXANDER, B.; CARVALHO, R.L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brasil. *Emerging Infectious Diseases* v.8, n.12, p.1480-1485, 2002.

ALVES, W.; MAIA, A.N.; OLIVEIRA, G.M.; SOUSA, W.; BONFIM, R. Leishmaniose visceral no Brasil: perfil dos casos no período de 2002 a 2004. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, n.1, p. 489, 2005.

ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil— *Emerging Infectious Diseases*, v.2, n.2, 1996.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Imune response to Leishmania infection. *Indian Journal Medical Research*, v.119, p.238-258, 2004.

BADARÓ, R.; CARVALHO, E.M.; ORGE, M.G.O.; TEIXEIRA, R.S.; ROCHA, H. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.18, n.2, p.77-83, 1985.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr., W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, v.154, p.639-649, 1986a.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, JR. W.D. - New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis *The Journal of Infectious Diseases*, v.154, p.1003-1011, 1986b.

BADARÓ, R. Progressos nas pesquisas de leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina - Bahia 1934-1989 - *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v.21, n.4, p.159-164, 1988.

BADARÓ, R.; CHUN, P.; NAKATAMI, M.; BURNS, J.; SKEIKY, Y.; HOUGHTON, R.; ARIAS, J.; MONTEIRO, P.; GENARO, O.; REED, S.G. TRALD. A rapid test specific for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. In: First World Congress on Leishmaniosis. *Acta Parasitologica Turcica*, v.21, n.1, 1997.

BARKER, D.C.; BUTCHER, J. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. Braziliensis* complexes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, n.3, p.285-297, 1983.

BEHFOROZ, N.C.; AMIRHAKIMI, H.R.; REZAI, H.R.; SABERI, M.S. Immunological findings in kala-azar, Iran. *Tropical Geographical Medicine*, v.35, p.27-32, 1983.

BOELAERT, M.; RIJAL, S.; REGMI, S.; SINGH, R.; KARKI, B.; JACQUET, D.; CHAPPUIS, F.; CAMPINO, L.; DESJEUX, P.; RAY, D.; KOIRALA, S.; STUYFT, P.V.D. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v.70, n.1, p.72-77, 2004.

BORGES, M. M.; GRAUSER, K.; NETTO, J.A.; GARCÍA-ZAPATA, M.T. Perfil da leishmaniose visceral (LV) no Estado de Tocantins como uma doença emergente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, 2003.

BRADLEY, F.J. Genetics of resistance to infection with special reference to leishmaniasis. Introduction, and genetics of susceptibility to *Leishmania donovani*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.76, p.134-146, 1982.

CALDAS, A.J.M.; SILVA, D.R.C.; PEREIRA, C.C.R.; NUNES, P.M.S.; SILVA, B.P.; SILVA, A.A.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis-Ma, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, n.5, p.445-451, 2001.

CARRIÓ, J.; PORTÚS, M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *Biomed Clinical Pharmacol*, v.2, n.11, 2002.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, S.G. Restoration of IFN- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal Immunology*, v.152, p.5949-5956, 1994.

CASCIO, A.; CALATTINI, S.; COLOMBA, C.; SCALAMOGNA, C.; GALAZZI, M.; PIZZUTO, M.; CAMILLI, R.; GRAMICCIA, M.; TITONE, L.; CORBELLINO, M.; ANTINORI, S. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. *Pediatrics*, v.109, n.27, 2002.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico*, v. 50, p.221-222, 1936.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; CASTRO, G.O.; FERREIRA, L.C.; ROMANA, C. Leishmaniose visceral americana. (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul). Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.32, p.321-385, 1937.

CHANG, K.P. Cell Biology of *Leishmania*. In: D.J. WILLER. *Modern Parasite Biology Cellular, Immunological and Molecular aspects*, 1990, p.79-90.

CHULAY, J.D.; FLECKENSTEIN, L., SMITH, D.H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.82, p.69-78, 1988.

COSTA, C.H.N. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v.24, n.5, p.361-372, 1990.

COSTA, J.M.; DURAND, R.; DENIAU, M.; RIVOLLET, D.; IZRI, M.; HOUIN, R.; VIDAUD, M.; BRETAGNE, S. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.7, p.1831-1833, 1996.

DAVIDSON, R.N.; MARTINO, L.; GRADONI, L.; GIACCHINO, R.; RUSSO, R.; GAETA, G.B.; PEMPINELLO, R. SCOTT, S.; RAIMONDI, F.; CASCIO, A.; PRESTILEO, J.; CALDEIRA, L.; WILKINSON, R.J.; BRYCESON, A.D.M. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Quarterly Journal of Medicine*, v.87, n.2, p.75-81, 1994.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *O Hospital* (Rio de Janeiro), v.45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica de Calazar no Ceará. *O Hospital* (Rio de Janeiro), v.48, p.61-76, 1955a.

DEANE, M.P.; DEANE, L.M. Observações sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Ceará. *O Hospital* (Rio de Janeiro), v.48, p.347-364, 1955b.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil - Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. São Paulo, 1956 - Tese - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

DEANE, L.M. Epidemiologia e profilaxia do calazar Americano. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.10, p.431-449, 1958.

DEBONO, J.E. Kala-azar in infancy. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, v.40, p.155-159, 1946.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.89, n.3, p.463-469, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, v.14, p. 417-423, 1996.

DIETZE, R.; VALLI, L.C.; VICENTE, M.A.; CARVALHO, S.F.G.; TEIXEIRA, L.; GRÖGL, M. Estudo comparativo do aspirado esplênico e de medula óssea no diagnóstico do Calazar. XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, 24 a 27 de fevereiro de 1997.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.95, p.239-243, 2001.

DISCH, J.; RABELLO, A. A reação em cadeia da polimerase em sangue periférico para diagnóstico e avaliação de cura de leishmaniose visceral. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 34, 2001.

DISCH, J.; MACIEL, F.C.; OLIVEIRA, M. C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.97, p.391-395, 2003.

DISCH, J.; OLIVEIRA, M.C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, v.92, p.279-283, 2004.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; MCAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; SOUSA, A.Q.; LIMA, J.W.O.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *The Journal of Infectious Diseases.*, v.166, p.1124-1132, 1992.

FICHOUX, Y.L.; QUARANTA, J.F.; AUFEUVRE, J.P.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *Journal of Clinical Microbiology* v.37, n.6, p.1953-1957, 1999.

FRAIHA-NETO, H. O centenário de nascimento de Gaspar Vianna. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* v.19, n.2, p.111-113, 1986.

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – Controle, Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose visceral (Calazar) – Normas Técnicas, Brasília, 86p., 1996.

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – Guia de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 525-539p, 2002.

GUERRA, J.A.O.; BARROS, M.L.B.; FÉ, N.F.; GUERRA, M.V.F.; CASTELLON, E.; PAES, M.G.; SHERLOCK, I.A. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil. Aspectos clínicoepidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37, n.4, p.305-311, 2004.

HO, E. A.; SOONG, T-H.; LI, Y. Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human visceral leishmaniasis. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.41, n.5, p.629-636, 1948.

JERONIMO, S.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; MACKAY, S.; COSTA, R.M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E.T.; LUZ, K.G.; FERNANDES, M.Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, R.D. Na urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.88, p.386-388, 1994.

JHA, T.K.; SHYAM, SUNDAR.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of indian visceral leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, v.341, n.24, p.1795-1800, 1999.

KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; AZEVEDO, M.A.C.Z.; CRUZ, L.L. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo – lidando com um novo foco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, p.28-29, 2000.

KEMP, M.; HANSEN, M.B.; THEANDER, T.G. Recognition of *Leishmania* antigens by T lymphocytes from nonexposed individuals. *Infect Immun*. v.60, p.2246-2251, 1992.

LACHAUD, L.; DEREURE, J.; CHABBERT, E.; REYNES, J.; MAUBOUSSIN, J.M.; OZIOL, E.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Optimizes PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.1, p.236-240, 2000.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, n.5, p.569-596, 1983.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* (CUNHA & CHAGAS) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA). *Annals of Parasitology*, v.63, p.134-145, 1988.

LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D. Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.101, p.229-232, 1999.

LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D.C. *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology*, v.94, p.15-22, 2000.

LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British Medical Journal*, v.21, p.1376-1377, 1903.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*, v.92, p.43-53, 2004.

LUTZ, A. NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.4, p.84-95, 1912.

MANGABEIRA, O. Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.21, p.03-26, 1969.

MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.18, n.3, p.187-198, 1985.

MARSDEN, P.D. The discovery of urea stibamine. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.19, n.2, p.115, 1986.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; AMENDOEIRA, M.R.R...; Leishmaniose visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*, v.41, n.5, p.69-84, 1981.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F; CARVALHO, R.W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today*, v.10, n.1, p.37-40, 1994.

MENDES, W.S.; SILVA, A.A.M.; TROVÃO, J.R.; SILVA, A.R.; COSTA, J.M.L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luís, Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n.3, p.227-231, 2002.

MIRA, J.A.; CORZO, J.E.; RIVERO, A.; MACIAS, J.; LEON, F.L.; TORRE-CISNEROS. J.; GOMEZ-MATEOS, J.; JURADO, R.; PINEDA, J.A. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v.70, n.3, p.298-301, 2004.

MOKRANI, T.; BELLAZZOUG, S.; BOUZID, Z.; KEDDARI, M. Evolution des anticorps chez des enfants traités pour leishmaniose viscerale. *Archives de l'Institut Pasteur Algérie*, v. 56, p.101-107, 1988.

MONTEIRO, P.S.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.27, n.III, p.67-72, 1994.

MOREIRA, E.D.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N. L.; BARRETO, R.B.; CARVALHO, L.P. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *American Journal Tropical of Medicine and Hygiene*, v.69, n.4, p.393-397, 2003.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE – Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília-Brasil, 2003, 120p.

MULLIS, K.H. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* v.262, n.4, p.56-65, 1990.

MURRAY, H.W.; DELPH-ETIENNE, S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *The journal of Infectious Diseases*, v.181, p.795-799, 2000.

MURRAY, H.W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, n.8, p.2185-2197, 2001.

NICOLLE, C. Origine canine du kala-azar infantile. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, v.1, p.299-301, 1908.

NUZUM, E.; WHITE III, F.; THAKUR, C.; DIETZE, R.; WAGES, J.; GROGL, M.; BERMAN, J. Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. *The Journal of Infectious Diseases*, v.171, p.751-754, 1995.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – Manual de controle da leishmaniose visceral. Geneva. WHO/LEISH/96.40, 88p., 1996a.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - *The leishmaniasis and leishmania/HIV co-infections*. Fact Sheet n.116, 1996.

OPAS - ORGANIZACIÓN PAN AMERICANA DE LA SALUD - *Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio*. Washington, v.44, 52p., 1996.

OPAS – Organização Panamericana de Saúde – Métodos de Investigação Epidemiológica em Doenças Transmissíveis. v. I, 182p., 1997.

OSMAN, F.; OSKAN, L.; ZIJLSTRA, E.E.; KROON, N.C.M.; SCHOONE, G.J.; KHALIL, E.T.A.G.; EL-HASSAN, A.M.; KAGER, P.A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.2454-2457, 1997.

PABLOS GALLEGO, J.M.; TORRES, A.C.; ALMAGRO, M.; DE PUERTA, S.; GARRIDO, P.L.; MORALES, M.G.; ESQUIVIAS, J.J. Kala-azar y anemia hemolítica autoimune. A propósito de un caso de evolución fatal por hepatotoxicidad del antimonio de N-metil glucamina. *Revista Clínica Española*, v.164, p.417-420, 1982.

PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR, P.E.C.; GIUNGI, F.; GIUNTI, G.; PARENTI, A.; TROTTI, G.C. Studies on mediterranean leishmaniasis – 2. asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.68, n.6, p.447-453, 1974.

PARAHYM, O. *Endemias brasileira*. Imprensa Universitária. Recife: Editora Universitária, 1961, 265-269p.

PEARSON, R.D.; WHEELER, D. A. HARRISON, L.H.; KAY, H.D. *The immunobiology of leishmaniasis. Reviews of Infectious Diseases*, v.5, p.907-927, 1983.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Leishmania species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3d ed, G.L. Mandell, R.G. Douglas, Jr.; J.E. Bennett, eds. Churchill Livingstone, p 2066-2077, 1989.

PEDROSA, C.; PESSOA, M.C.; PIRES, V.R.S.; PACHECO, L.; JÚNIOR, D.C. Punção de medula óssea para o diagnóstico da leishmaniose visceral. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.33, supl. 8, 1991.

PEDROSA, C. Leishmaniose visceral em Alagoas: alterações clínicas, laboratoriais e relação entre a duração da doença e o tamanho do fígado e do baço na admissão e ao término do tratamento. Dissertação apresentada ao Departamento de Medicina Tropical, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical, 1998.

PEDROSA, C.; ROCHA, E.M.M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v.37, n.4, p.300-304, 2004.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Medico*, v.46, p.949-950, 1934.

PIARROUX, R.; GAMBARELLI, F.; DUMON, H.; FONTES, M.; DUNAN, S.; MARY, C.; TOGA, B.; QUILICI, M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.3, p.746-749, 1994.

PIZZUTO, M.; PIAZZA, M.; SENESE, D.; SCALAMOGNA, C.; CALATTINI, S.; CORSICO, L.; PERSICO, T.; ADRIANI, B.; MAGNI, C.; GUARALDI, G.; GAIERA, G.; LUDOVISI, A.; GRAMICCIA, M.; GALLI, M.; MORONI, M.; CORBELLINO, M.; ANTINORI, S. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.1, p.357-361, 2001.

PRATA, A. Estudo clínico e laboratorial do calazar. Salvador-Bahia, 1957 – Livre Docência – Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia.

PRATA, A. O combate às doenças endêmicas e a pendular regionalização dos serviços de saúde. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.23, p.01-03, 1990.

RAW, I.; CRUZ, O.; SCHMIDT, B.J.; DIAMENT, A.J.; FAVA-NETTO, C. *Valores de laboratório. Referências normais e patológicas sua importância clínica e terapêutica*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1989, 346p.

RODRIGUES DA SILVA, J. Leishmaniose visceral (Calazar). Rio de Janeiro, 1957 - Tese de Cátedra de Doenças Tropicais e Infectuosas - Faculdade Nacional de Medicina.

SACKETT, D.L.; HAYNES, R.B. Evidence base of clinical diagnosis. *British Medical Journal*, v.321, p.539-541, 2002.

SACKETT, D.L.; HAYNES, R.B.; GUYATT, G.H.; TUGWELL, P. *Clinical epidemiology, a basic science for clinical medicine*. 2nd ed. Boston: Little Brown, 1991, 83p.

SALOTRA, P.; SREENIVAS, G.; POGUE, G.P.; LEE, N.; NAKHASI, H.L.; RAMESH, V.V.; NEGI, N.S. Development of a Species-Specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar dermal leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* v.39, n.3, p.849-854, 2001.

SAVANI, E.S.; CAMARGO, M.C.O.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.A.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. The first in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi in a domestic cat (*Feix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Rev. Parasitology*, v.120, n.3, p.229-233, 2004.

SCHAEFER, K.U.; SCHOONE, G.J.; GACHIHI, G.S.; MULLER, A.S.; KAGER, P.A.; MEREDITH, S.E.O. Visceral leishmaniasis: use of the polimerase chain reaction in an epidemiological study in Baringo District, Kenya. *Transactions of the Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.89, p.492-495, 1995.

SEAMAN, J.; MERCER, A.J.; MPHIL, M.S.; SONDORP, H.E.; HERWALDT, B.L. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of several debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Annals Internal Medicine*, v.124, p.664-672, 1996.

SHARMA, M.C.; GUPTA, A.K.; DAS, V.N.R.; VERMA, N.; KUMAR, N.; SARAN, R.; KAR, S.K. Leishmania donovani in blood smears of asymptomatic persons. *Acta Tropica*, v.76, p.195-196, 2000.

SHERLOCK, I.A.; GUITTON, W.G. Observações sobre o Calazar em Jacobina, Bahia –IV Variação horária e estacional do Phlebotomus longipalpis. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.21, p.715-727, 1969.

SHERLOCK, L.A. Interação Ecológica da Lutzomyia longipalpis com a Leishmania chagasi na Epidemiologia da Leishmaniose visceral Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.27 (supl. 4), p.589-592, 1994.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.3, p. 285-291, 2001.

SILVA, M.R.; STEWART, J.M.; COSTA, C.H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *American Journal Tropical of Medicine and Hygiene*, v.72, n 6, p. 811-814, 2005.

SILVEIRA, F.T.; PINGARILHO, D.A.; DUARTE, R.R.; GABRIEL, M.D.; DIAS, M.G.S.; MOURA, M.P.S.; BRAGA, M.E.A.; PRESTES, E.X.; MAUÉS, B.C. Avaliação de três esquemas terapêuticos com o antimoniato de N-metil-glucamina no tratamento da leishmaniose visceral no Estado do Pará, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.35, n.2, p.177-181, 1993.

SMYTH, A.J.; GHOSH, A.; HASSAN, M.Q.; BASU, D.; BRUIJN, M.H.L.; ADHYA, A.; MALLIK, K.K.; BARKER, D.C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, v.105, p.183-192, 1992.

STERN, R.C. Pathophysiologic basis for symptomatic treatment of fever. *Pediatrics*, v.59, n.1, p.92-96, 1977.

SUNDAR, S.; PAI, K.K.R.; PATHAK-TRIPATHI, K.; GAM, R.; KENNEY, R.T. Resistance to treatment in kala-azar:speciation of isolates from northeast India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.65, n.3, p.193-196, 2001.

VEIGA, J.P.R.; KHANAM, R.; ROSA, T.T.; JUNQUEIRA JUNIOR, L.F.; BRANT, P.C.; RAICK, A.N.; FRIEDMAN, H.; MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonial nephrotoxicity in the rat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.32, n.4, p. 304-309, 1990.

VERONESI, R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1082p.

VIEIRA, J.B.F.; COELHO, G.E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v.31, n.II, p.85-92, 1998.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION – *Report of the informal meeting on the chemotherapy of visceral leishmaniasis*. Geneva, 1982.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION – Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. Cuaderno Técnico, v.44, 52p., 1996.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION - The leishmaniasis and leishmania/HIV co-infections. *Fact Sheet* n. 116, may 1996.

WHO – Tropical disease research: progress 2003-2004. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pr.17.htm>. Acesso em: 10 nov. 2005.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION and UNAIDS, 1998. Disponível em: <http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis.htm> Acesso em: 10 nov. 2005.

WIRTH, D.F. Molecular Biology of *Leishmania* In: D.J. WILLER. Modern Parasite Biology Cellular, Immunological and Molecular Aspects, 1990.

ZWINGENBERGER, K.; HARMS, G.; PEDROSA, C.; OMENA, S. SANDKAMP, B.; NEIFER, S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon- γ production. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v.57, p.242-249, 1990.

ZIJLSTRA, E.E.; SIDDIG, A.M.; EL-HASSAN, A.M.; EL-TOUM, I.A.; SATTI,M.;GHALIB, H.W. Clinical aspects of Kala-azar in children from Sudan: a comparison with the disease in adults. *Journal of Tropical Pediatrics*, 38:17-21, 1992.

1. O formato das referências bibliográficas desta tese seguiu as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Origem: NRB 6023:2002.
2. A estrutura dos elementos textuais desta tese seguiu as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Origem: NRB 14724:2002.

ANEXO

ANEXO 1

**Reagentes utilizados na técnica de extração e amplificação do DNA
do protozoário *Leishmania***

Extração do DNA genômico

◆ Soluções e materiais

Kit GFX – conjunto de purificação de DNA genômico (*Amersham Biosciences^R*), contendo

- ◆ RBC solução de lise (KHC0^3 10mM, NH_4Cl 155mM, EDTA 0,1mM)
- ◆ Solução de extração (solução tamponada contendo detergente)
- ◆ Solução de lavagem (Tris-HCl pH 7,7 – 10mM, ácido etileno diaminotetracético, etanol a 100%)
- ◆ *GFX* – 100 colunas, com matriz de fibra de vidro.
- ◆ Tubos cônicos de 1 mL tipo *Eppendorf*
- ◆ Agitador de tubo (vórtex)
- ◆ Etanol a 100% q.s.p. (adicionado a solução de lise conforme protocolo do fabricante)

Quadro I - Reagentes utilizados para a amplificação da PCR

Componentes	Concentração final	Volume final
Água Milli-Q	*****	26,5 µL
Tampão PCR 10X*	1X	5,0 µL
MgCL ₂ *	3 mM	3,0 µL
dNTPs◆ 1,25 µM cada	0,2 mM cada	8,0 µL
Primer E ◆	0,3 µM	1,5 µL
Primer F ◆	0,3 µM	1,5 µL
Taq DNA Polimerase◆	2,5 U	0,5 µL
DNA molde	*****	4,0 µL

* Cenbiot, RS

◆ Invitrogen, USA

* Ludwigbiotec

Soluções e materiais para a visualização do DNA da *Leishmania*

Cuba de eletroforese horizontal (HU10, marca Scie-plas), pentes modelo C1,5-20mc com 20 poços, 1,5 mm.

Agarose polimerizada a 0,9 %

Corante de brometo de etídio 2 µL (10 mg/mL)

TBE 1X – Tris base 10,8g

Ácido bórico 5,5g

Ácido etileno diamidinotetracético a 0,5M 4,0 mL

Água destilada 1000 mL

Tampão de corrida 2 X – BlueJuice ◆

Marcador de peso molecular 100 pares de bases*

Termociclador, marca *ThermoHybaid*, modelo PCR Express *Thermal Cycler/USA*

Sistema de fotodocumentação, modelo DP-001.FDC versão 10

Softwer de análise: Photocapt, versão 10.01, registrado por Vilber Lourmat/França

Transiluminador de luz ultravioleta, modelo TFX-35.WL Table, registrado por Vilbert Lourmat/França

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió-AL, 30/08/04

Senhor(a) Pesquisador(a) :

O Comitê de Ética na Pesquisa (CEP), reunido em 29/08/04 e com base no parecer emitido pelo(a) relator(a) do processo nº 004458/04-78 sob o título "LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA: DIAGNÓSTICO e SEGUIMENTO de PACIENTES ATRAVÉS ...", de sua autoria, vem por este instrumento comunicar sua **aprovação**, com base no item VIII.13,b, da Resolução nº 196/96.

Outrossim, recomendamos a observância do que consta na folha de rosto com respeito ao cumprimento dos prazos para entrega de relatórios, bem como o atendimento da referida Resolução, sobretudo no que se refere aos itens III, IV e V, (*proteção ao sujeito*) e das demais Resoluções da CONEP/CNS, quando for o caso(*).

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais este Comitê coloca-se à disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra referidas.


 Prof.^a Dr.^a Erlinda Medeiros Ferreira
 Comitê de Ética em Pesquisa
 PRESIDENTE

(* Áreas temáticas especiais.

APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ CI _____ CPF _____
_____ atendido no Hospital Escola Dr. HÉlvio Auto, estou ciente da minha participação, como voluntário de pesquisa intitulada Leishmaniose visceral americana: diagnóstico e seguimento de pacientes através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa reação será feita em uma amostra de sangue retirada da prega cubital e do aspirado medular, e que esses procedimentos, feitos rotineiramente em pacientes com leishmaniose visceral, não trarão prejuízo para minha saúde, sabendo que serei acompanhado (a) durante a internação e seguimento ambulatorial, pela coordenadora do Projeto.

Admito ter sido esclarecido sobre as perguntas que são feitas e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pelo médico responsável por esta pesquisa. Fui informado também que quando da apresentação dos resultados não serão vinculados dados que possam identificar-me como participante da pesquisa.

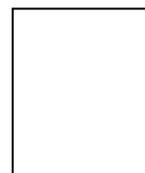
Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga qualquer prejuízo para o meu atendimento nesse serviço. E por entender que nada tenho contra essa pesquisa, concordo em assinar esse termo de consentimento.

Assinatura do responsável legal

Maceió, ____/____/____

Polegar direito

Testemunha



Célia Maria Silva Pedrosa
Responsável Projeto Pesquisa

Projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alagoas, em 30 de agosto de 2001.

APÊNDICE 3

Ficha de coleta de dados

Leishmaniose visceral americana: diagnóstico e seguimento de pacientes através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

1) IDENTIFICAÇÃO

RG <input type="text"/>	No paciente <input type="text"/>
Data internação ___/___/___ Data alta ___/___/___	Data óbito ___/___/___
Nome do paciente _____	Sexo <input type="checkbox"/> 1. masculino 2. feminino
Qual a (idade do seu filho) sua idade ? <input type="text"/> anos <input type="text"/> meses	Qual a data (nascimento seu filho) do seu nascimento? ___/___/___
Endereço: _____	Regiões fisiográficas <input type="checkbox"/> 1. litoral 2.mata 3.agreste 4.sertão (Preenchido pelo coordenador)
Cidade _____ Estado _____	

2) ANAMNESE

2.1 Há quantos dias está doente? <input type="text"/>
2.2 Teve febre ? (1) sim (2) não (3) não sabe <input type="checkbox"/>
2.3 Desde que essa doença começou há quantos dias tem febre? <input type="text"/>
2.4 Está descorado? (1) sim (2) não (3) não sabe <input type="checkbox"/>
2.3 Desde que essa doença começou há quantos dias está descorado? <input type="text"/>
2.4 Sua barriga aumentou de volume ? (1) sim (2) não (3) não sabe <input type="checkbox"/>
2.5 Há quantos dias notou que a barriga cresceu ? <input type="text"/>
2.6 Desde que essa doença começou suas pernas incharam? (1) sim (2) não <input type="checkbox"/>
2.7 Há quantos dias suas pernas incharam ? <input type="text"/>
2.8 Desde que essa doença começou sangrou pelo nariz ? (1) sim (2) não <input type="checkbox"/>
2.9 Quantas vezes sangrou ? (1) uma (2) duas (3) três/mais vezes <input type="checkbox"/>
2.10 Desde que essa doença começou sangrou pela gengiva ? (1) sim (2) não <input type="checkbox"/>
2.11 Quantas vezes sangrou ? (1) uma (2) duas (3) três/mais vezes <input type="checkbox"/>
2.12 Desde que essa doença começou teve diarreia ? (1) sim (2) não <input type="checkbox"/>
2.13 Quer dizer mais alguma coisa ? (1) sim (2) não <input type="checkbox"/> O que ? _____

3) ANTECEDENTES PESSOAIS

3.1 Nos últimos seis meses teve alguma doença ? (1) sim (2) não (3) não lembra	<input type="checkbox"/>
3.2 Febre e coriza, como uma gripe ? (1) sim (2) não (3) não sabe	<input type="checkbox"/>
3.3 Pneumonia ? (1) sim (2) não (3) não sabe	<input type="checkbox"/>
3.4 Febre e diarreia ? (1) sim (2) não (3) não sabe	<input type="checkbox"/>
3.5 Procurou atendimento médico depois que essa doença começou? (1) sim (2) não	<input type="checkbox"/>
3.6 Quantas vezes? (1) uma (2) duas (3) três ou mais	<input type="checkbox"/>
3.7 O médico que o atendeu disse qual era a sua doença? (1) sim (2) não	<input type="checkbox"/>
3.8 Depois que essa doença começou esteve interno em algum hospital (1) sim (2) não	<input type="checkbox"/>
3.9 Quantas vezes ? (1) uma (2) duas (3) três/mais	<input type="checkbox"/>
3.10 Usou algum remédio desde que essa doença começou? (1) sim (2) não	<input type="checkbox"/>
3.11 1) dipirona 4) mebendazol 7) gentamicina 2) eritromicina 5) amoxicilina 8) outro 3) penicilina benzatina 6) sulfato ferroso Qual? _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
3.12 Depois que essa doença começou recebeu sangue ? (1) sim (2) não	<input type="checkbox"/>
3.13 Quantas vezes ? 1) uma (2) duas (3) três/mais	<input type="checkbox"/>

4) EPIDEMIOLOGIA

4.1 Há caso igual ao seu em sua família? (1) sim (2) não (3) não sabe	<input type="checkbox"/>
4.2 Há caso igual ao seu em seus vizinhos?	<input type="checkbox"/>
4.3 Cria cachorro?	<input type="checkbox"/>
4.4 Existe cachorro próximo a sua casa?	<input type="checkbox"/>
4.5 O cachorro está emagrecido?	<input type="checkbox"/>
4.6 O cachorro está pelado?	<input type="checkbox"/>
4.7 O cachorro está com o focinho ferido?	<input type="checkbox"/>
4.8 O cachorro está com as orelhas peladas?	<input type="checkbox"/>
4.9 O cachorro está com as orelhas feridas?	<input type="checkbox"/>
4.10 O cachorro está com as unhas longas?	<input type="checkbox"/>
4.11 Há mosquitos pequenos que invadem a casa a noitinha ?	<input type="checkbox"/>

5) EXAME FÍSICO

Temperatura _____, ____ ° C	Peso _____, ____ Kg	Altura ____, ____ Cm
PA _____ mm Hg	FC _____ bpm	FR _____ irpm
Pele Pálida	<input type="checkbox"/>	(1) Sim (2) Não
Pele Ictérica	<input type="checkbox"/>	
Petéquias	<input type="checkbox"/>	
Sufusões	<input type="checkbox"/>	
Edema Palpebral	<input type="checkbox"/>	
Linfonodos cervicais	<input type="checkbox"/>	Tamanho cm _____
Submandibulares	<input type="checkbox"/>	_____
Axilares	<input type="checkbox"/>	_____
Inguinais	<input type="checkbox"/>	_____
Pulmões Normais	<input type="checkbox"/>	
Estertores	<input type="checkbox"/>	
Coração normal	<input type="checkbox"/>	
Taquicardia	<input type="checkbox"/>	
Sopro	<input type="checkbox"/>	

ABDOME	Palpação dolorosa <input type="checkbox"/>	Fígado <input type="checkbox"/> Baço <input type="checkbox"/>
	Circulação Colateral <input type="checkbox"/>	
Fígado	_____, ____ cm RCDLHC	____, ____ AX
Baço Hackett	_____, ____ cm RCELHC	____, ____ AA

Membros Inferiores Normais <input type="checkbox"/>		1- Sim 2- Não
Edema <input type="checkbox"/> Petéquias <input type="checkbox"/>	Petéquias <input type="checkbox"/>	Sufusões <input type="checkbox"/>

6) INFECÇÕES ASSOCIADAS

6.1 Infecções internação <input type="checkbox"/>	(1) sim (2) não
6.2 Escabiose <input type="checkbox"/>	
6.3 Impetigo <input type="checkbox"/>	
6.4 Pediculose <input type="checkbox"/>	
6.5 Otite média aguda <input type="checkbox"/>	
6.6 Respiratória <input type="checkbox"/>	(1) febre, estertor, RX compatível pneumonia
6.7 Outra Qual ? <input type="checkbox"/>	

7) DIAGNÓSTICO

7.1 Punção medular	(1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
7.2 PCR medula	(1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
7.3 PCR sangue periférico	(1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
7.4 Teste de aglutinação direto	(1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
7.5 IFI	(1) positivo (2) negativo título	<input type="checkbox"/>

Exames Inespecíficos			
H	Hto.	Hb	Plaquetas
Leucócitos	Bastonetes	Segmentados	Eosinófilos
Linfócitos	Monócitos	Ureia	Creatinina
ALT ____u/l <input type="checkbox"/>	AST ____u/ <input type="checkbox"/>		
<i>A. lumbricoides</i> <input type="checkbox"/>	<i>T. trichiura</i> <input type="checkbox"/>	<i>S. mansoni</i> <input type="checkbox"/>	<i>Ancilostomídeos</i> <input type="checkbox"/>
<i>S. stercoralis</i> <input type="checkbox"/>	<i>G. lamblia</i> <input type="checkbox"/>	E. histolytica <input type="checkbox"/>	
Urina <input type="checkbox"/>	RX tórax <input type="checkbox"/>	(1) normal (2) anormal	<i>pneumonia bac.</i> <input type="checkbox"/> <i>pneumonia inters.</i> <input type="checkbox"/>

8) TRATAMENTO

Glucantime <input type="checkbox"/> Data inic. ____/____/____ Data ter. ____/____/____	(1) 10mg/kg/20 dias (2) 10mg/kg/30 dias (3) 20mg/kg/20 dias (4) 20mg/kg/30 dias (5) outras doses
--	--

Fungizon Data ____ / ____ / ____	<input type="checkbox"/>	Dose de _____ Dose total _____
Pentamidina Data ____ / ____ / ____	<input type="checkbox"/>	4mg/kg 3 vezes/semana por 5 semanas
Outros Qual? _____	<input type="checkbox"/>	(1) sim (2) não
Concentrado hemácias Número de vezes Concentrado plaquetas Número de vezes	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Albumina <input type="checkbox"/> Número de vezes <input type="checkbox"/> (1) uma (2) duas (3) três/mais

9) AVALIAÇÃO PARA A ALTA

Peso _____	Altura _____
_____ kg	_____ cm

Fígado _____ RCDLHC	_____ AX
Baço _____ RCELHC	_____ AA
Baço (Hackett) Tipo	(1) Tipo 0 (2) Tipo 1 (3) Tipo 2 (4) Tipo 3 (5) Tipo 4 (6) Tipo 5

Exames		
H	Hto.	Hb
Leucócitos	Bastonetes	Segmentados
Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
ALT	AST	Plaquetas

PCR sangue periférico <input type="checkbox"/>	(1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
Teste de aglutinação direta <input type="checkbox"/>	(1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
Peso _____	Altura _____	_____ cm

10) Retorno

1 mês

Peso _____	Altura _____	_____ cm
Exames		
PCR sangue periférico (1) positivo (2) negtivo		<input type="checkbox"/>
Teste de aglutinação direta (1) positivo (2) negativo		<input type="checkbox"/>

Hemácias	Hto
Hb	Leucócitos
Bastonetes	segmentados
Eosinófilos	monócitos
Plaquetas	linfócitos
AST	ALT
Fígado _____, RCDLHC	_____, AX
Baço _____, RCELHC	_____, AA
Baço (Hackett) Tipo	(1) Tipo 0 (2) Tipo 1 (3) Tipo 2 (4) Tipo 3 (5) Tipo 4 (6) Tipo 5

3 meses

Peso _____, _____	Altura _____, _____ cm
Exames	
PCR sangue periférico (1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
Teste de aglutinação direta (1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
Hemácias	Hto
Hb	Leucócitos
Bastonetes	segmentados
Eosinófilos	monócitos
Plaquetas	linfócitos
AST	ALT
Fígado _____, RCDLHC	_____, AX
Baço _____, RCELHC	_____, AA
Baço (Hackett) Tipo	(1) Tipo 0 (2) Tipo 1 (3) Tipo 2 (4) Tipo 3 (5) Tipo 4 (6) Tipo 5

6 meses

Peso _____, _____	Altura _____, _____ cm
Exames	
PCR sangue periférico (1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
Teste de aglutinação direta (1) positivo (2) negativo	<input type="checkbox"/>
Hemácias	Hto
Hb	Leucócitos
Bastonetes	segmentados
Eosinófilos	monócitos
Plaquetas	linfócitos
AST	ALT
Fígado _____, RCDLHC	_____, AX
Baço _____, RCELHC	_____, AA
Baço (Hackett) Tipo	(1) Tipo 0 (2) Tipo 1 (3) Tipo 2 (4) Tipo 3 (5) Tipo 4 (6) Tipo 5