

**YVONE MAIA BRUSTOLONI**

**LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO  
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL:  
CONTRIBUIÇÃO AO DIAGNÓSTICO E AO  
TRATAMENTO**

**CAMPO GRANDE  
2006**

**YVONE MAIA BRUSTOLONI**

**LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO  
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL:  
CONTRIBUIÇÃO AO DIAGNÓSTICO E AO  
TRATAMENTO**

Tese apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós - Graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro-Oeste UnB / UFG / UFMS, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha

**CAMPO GRANDE  
2006**

# SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	3
2.1. Epidemiologia .....	3
2.2. Patogenia .....	5
2.3. Quadro clínico .....	6
2.4. Diagnóstico laboratorial .....	9
2.4.1. Alterações hematológicas e bioquímicas .....	9
2.4.2. Diagnóstico parasitológico .....	9
2.4.3. Diagnóstico sorológico .....	10
2.4.4. Diagnóstico molecular .....	12
2.4.5. Identificação de <i>Leishmania</i> .....	16
2.5. Diagnóstico diferencial .....	17
2.6. Tratamento .....	17
2.6.1. Antimoniais pentavalentes .....	17
2.6.2. Anfotericina B convencional .....	20
2.6.3. Formulações lipídicas de anfotericina B .....	22
2.6.4. Pentamidina .....	25
2.6.5. Paromomicina .....	25
2.6.6. Interferon $\gamma$ .....	25
2.6.7. Sitamaquine .....	25

2.6.8. Miltefosina .....	26
2.6.9. Resposta ao tratamento .....	27
2.6.10. Algumas perspectivas no tratamento .....	27
2.7 Prevenção .....	28
3. JUSTIFICATIVA .....	31
4. OBJETIVOS .....	33
4.1 Objetivo geral .....	33
4.2 Objetivos específicos .....	33
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	34
6. RESULTADOS .....	35
6.1 Leishmaniose visceral em crianças no Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil: uma doença de evolução rápida .....	36
6.2 Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children in the Center-West Region of Brazil .....	57
6.3 Sensitivity and specificity of PCR in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children .....	69
6.4 Experiência hospitalar no tratamento da leishmaniose visceral em crianças no Mato Grosso do Sul, Brasil .....	84
6.5 Unsatisfactory response in the treatment of visceral leishmaniasis in brazilian children: the problem of relapse .....	105
7. DISCUSSÃO .....	118
8. CONCLUSÕES .....	124
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

REDE CENTRO OESTE DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNB/UFG/UFMS

**LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO  
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL:  
CONTRIBUIÇÃO AO DIAGNÓSTICO E AO TRATAMENTO**

**RESUMO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Yvone Maia Brustoloni**

A faixa etária pediátrica é especialmente atingida pela leishmaniose visceral (LV), uma doença atualmente em franca expansão no Mato Grosso do Sul e em outras localidades brasileiras. O diagnóstico e o tratamento da LV em crianças foram estudados retrospectivamente, através da análise dos dados de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no período de janeiro de 1998 a fevereiro de 2005, o que resultou em cinco estudos. No primeiro estudo, identificou-se a forma de apresentação da patologia nas crianças do Estado. A LV vem se apresentando como uma doença de evolução rápida nessa região, evidenciando um padrão diferente do considerado típico para a patologia, habitualmente prolongada e de longa duração. O diagnóstico de pacientes em fase evolutiva não muito adiantada e o tratamento adequado dos casos resultaram em uma doença de baixa mortalidade (2,6%). Os métodos convencionalmente utilizados no diagnóstico da LV foram analisados. A combinação de dois testes tradicionais, como a microscopia direta do aspirado medular e a sorologia por Imunofluorescência, possibilitou a confirmação do diagnóstico na quase totalidade dos casos em que esses exames foram realizados (98,5%). Enfatiza-se a necessidade da obtenção da sorologia, frequentemente colocada em segundo plano, devido à preferência dos profissionais locais pela realização do mielograma como única forma de diagnóstico. Pela primeira vez no Estado, utilizou-se um método de biologia molecular no estudo de casos de LV. A utilização da PCR (reação em cadeia da polimerase) na detecção de DNA de *Leishmania* em lâminas de aspirado medular, coradas por Giemsa e estocadas, foi avaliada. O teste foi altamente sensível (92,3%) e específico (97,7%), mostrando-se útil na elucidação de casos difíceis. Os aspectos mais importantes relacionados ao tratamento da doença foram avaliados, descrevendo-se as drogas utilizadas, seus efeitos adversos, a resposta terapêutica, o tempo de tratamento e as dificuldades no manejo do mesmo. O antimoniato de meglumina mostrou-se eficaz e seguro na infância e, apesar da existência atual de novas opções para tratamento, sua indicação como primeira escolha terapêutica em crianças é ainda a mais adequada em nosso meio. O problema da recidiva após o tratamento também foi enfocado; são descritos 4 casos em crianças, com discussão de aspectos recentes sobre o assunto.

**VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN IN THE STATE OF  
MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL:  
A CONTRIBUTION TO DIAGNOSIS AND TO TREATMENT**

**ABSTRACT**

**THESIS**

**Yvone Maia Brustoloni**

The pediatric age range is particularly affected by visceral leishmaniasis, a disease that is currently spreading steadily in the state of Mato Grosso do Sul and in other areas in Brazil. The diagnosis and treatment of the disease in childhood were investigated retrospectively by analyzing data of patients admitted to the Teaching Hospital of Universidade Federal de Mato Grosso do Sul from January 1998 to February 2005. The investigation was composed of five studies. The clinical presentation of the pathology in children in Mato Grosso do Sul was identified. Visceral leishmaniasis has been exhibiting fast evolution in the region, with a mode of presentation that differs from the pattern viewed as typical for the pathology, usually of long-lasting course. Diagnosis of patients in a not much advanced phase of the disease and the availability of suitable treatment have resulted in an illness of low mortality. The methods conventionally employed in the diagnosis of visceral leishmaniasis were analyzed. The combination of two traditional tests—direct microscopy of bone marrow aspirates (BMAs) and immunofluorescence serology—allowed diagnosis to be reached in nearly all the cases for which these tests were performed (98.5%). Emphasis is placed on the need for conducting serological testing, a procedure often assigned secondary importance, as local health professionals tend to favor the use of myelograms as the only diagnostic method. For the first time in Mato Grosso do Sul a molecular biology method has been applied to the study of cases of visceral leishmaniasis. The use of polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* DNA in archived Giemsa-stained BMA slides was evaluated. The technique was found to be useful in the diagnostic clarification of difficult cases, given its high sensitivity (92.3%) and specificity (97.7%). The most important aspects related to treatment of the disease were evaluated, along with a description of the drugs prescribed and their adverse effects, therapeutic response, length of treatment, and difficulties posed for the management of treatment. Meglumine antimoniate was found to be effective and safe in pediatric patients and, despite the current availability of new treatment options, its indication as first-line therapy in the treatment of childhood visceral leishmaniasis is still the most suitable in our setting. The issue of post-treatment relapse was also addressed in one the study; four cases of relapse in children are described, with a discussion on recently addressed aspects.

## LISTA DE ABREVIATURAS

LV	Leishmaniose visceral
<i>L. chagasi</i> ; <i>L.(L.) chagasi</i>	<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>
<i>L.(L.) infantum</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>
<i>L.(L.) amazonensis</i>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
<i>L. longipalpis</i> ; <i>Lu.longipalpis</i>	<i>Lutzomia longipalpis</i>
<i>L. cruzi</i>	<i>Lutzomia cruzi</i>
<i>L. major</i>	Leishmania major
<i>L. tropica</i>	Leishmania tropica
INF $\gamma$	Interferon gama
VHS	Velocidade de hemossedimentação
Th	Linfócitos T auxiliares
NNN	Novy-MacNeal-Nicole
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
IFAT	<i>Indirect Immunofluorescence Antibody Test</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
DAT	Teste de Aglutinação Direta
TRALd	Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i>
rk39	Antígeno recombinante rk39
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
kDNA	DNA mitocondrial; DNA do cinetoplasto
nDNA	DNA nuclear
Sb <sup>v</sup>	Antimonial pentavalente

## **1 . INTRODUÇÃO**

As leishmanioses acometem as populações mais pobres do mundo, ocorrendo em 80% dos casos em pessoas de baixa renda, que sobrevivem com menos de 2 dólares por dia (1). Sua forma clínica mais grave, a leishmaniose visceral (LV) ou calazar, é uma infecção sistêmica ameaçadora da vida, fatal se não tratada, que afeta a produtividade e o bem-estar de milhares de pessoas (2).

Exceto em regiões endêmicas do sul da Europa, o calazar permanece associado ao alto nível de pobreza, sendo ainda considerado como uma das grandes doenças mundiais negligenciadas (3). Na classificação da Organização Mundial de Saúde, a LV é identificada como uma doença de categoria 1: emergente e fora de controle (4) .

A LV tem ampla distribuição geográfica. É endêmica em 65 países, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. Noventa por cento dos casos ocorrem em áreas rurais ou suburbanas de 5 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (4). Há uma incidência estimada de 500.000 casos novos e 50.000 mortes a cada ano no mundo, com números claramente em ascensão (5).

No Brasil, a leishmaniose visceral assumiu um caráter surpreendente nos últimos anos, invadindo cidades, das menores até as metrópoles (6,7), desafiando autoridades de saúde pública e pesquisadores; ondas epidêmicas são registradas em vários locais, e a doença expande-se para o Norte, Centro-Oeste e em direção ao industrializado Sudeste, frustrando as estratégias tradicionais de controle, pois a eliminação de cães tem se demonstrado inócua, o uso de inseticidas de ação residual precisa ter sua eficácia claramente demonstrada e não há vacina ainda disponível (7).

Até 1990, a doença ocorria praticamente apenas na região Nordeste, que registrava 90% dos casos (6); ao longo dos anos, houve uma nítida expansão para as regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste, poupando apenas a região Sul. No período de 2000 a 2002, a notificação dos casos na região Nordeste reduziu-se para 77% (6), e no ano de 2003, o percentual de notificações foi de 58% no Nordeste, 19% no Sudeste, 15% na região Norte e 7% no Centro-Oeste (8).

Na atualidade, a LV encontra-se amplamente difundida, com registro de ocorrência em 19 das 27 unidades da federação; há surtos relatados nas cidades de São



Luís (MA), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Natal (RN), Santarém (PA), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP) e Palmas (TO) (6).

No Mato Grosso do Sul (MS), a LV tem avançado por diversas cidades. Reconhecida em cães e humanos desde a década de 80 no oeste do Estado, na região de Corumbá (9), permaneceu restrita a essa área até 1995, quando iniciou lentamente sua expansão para os municípios adjacentes (Bodoquena, Miranda, Aquidauana) (10). A partir de 2001, notou-se sua franca expansão. Atualmente, há dois surtos importantes, nas cidades de Três Lagoas e na capital, Campo Grande, que preocupam as autoridades de saúde locais e nacionais, pela velocidade de aparecimento dos casos, com expressivo índice de óbitos (11).

A situação do MS também é preocupante pela existência de fatores, típicos do Estado, favoráveis à instalação e manutenção da doença: a característica predominantemente rural deste, com grandes extensões de terras, ainda dominadas por vegetações nativas; a ocorrência constante de desmatamentos dessas áreas; o interesse nas atividades ligadas à penetração das matas, como as de pesca e caça e o turismo ecológico; a instalação de assentamentos rurais, na maioria das vezes em situações de pobreza; a existência de áreas rurais próximas às cidades, com invasão da floresta pelo perímetro urbano; a manutenção de hábitos simples pelas populações, como o da criação de animais nos quintais, principalmente galinhas, e a presença comum de outros animais soltos pelas ruas das cidades interioranas, como vacas e cavalos, mantendo-se uma fonte permanente de alimentação dos insetos transmissores da doença; o cultivo de árvores frutíferas próximas às casas, encontradas até em áreas centrais dos centros urbanos.

## **2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **2.1. Epidemiologia**

A leishmaniose visceral tem por agentes etiológicos protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania*, que inclui *L. (L.) donovani* no subcontinente indiano e África, *L. (L.) infantum* na bacia do Mediterrâneo e *L. (L.) chagasi* no Brasil e outros países da América do Sul (12-14). Eventualmente, espécies habitualmente dermatrópicas, como *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) tropica*, podem causar formas viscerais, conforme a resposta imune do hospedeiro (13, 15).

A LV é transmitida principalmente através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo, conhecidos genericamente como flebotomíneos (14). Os vetores documentados até o momento como transmissores da *Leishmania chagasi* no Brasil são insetos das espécies *Lutzomyia longipalpis* (14) (popularmente conhecidos como mosquito palha, birigui, tatuquira) e, mais recentemente, incriminou-se *Lutzomyia cruzi* como vetor em Mato Grosso do Sul, na região de Corumbá (16,17).

Uma importante mudança no padrão de transmissão da leishmaniose visceral tem sido verificada: caracteristicamente uma doença rural, esta vem encontrando, no espaço urbano, um ambiente favorável para se estabelecer e desenvolver, com crescente expansão para cidades de médio e grande porte.

O *habitat* preferencial dos flebotomíneos são os pés-de-serra, locais mais úmidos, com maior quantidade de vegetação e sem ventos fortes, e florestas de regiões semi-áridas (18); o desmatamento é responsável pela migração destes para as áreas urbanas e periurbanas, sendo que suas fontes alimentares, habitualmente animais silvestres (hospedeiros naturais), são substituídas pelo cão e pelo homem; o processo migratório, motivado principalmente pelas secas do Nordeste, também trouxe para a periferia das cidades populações humana e canina originárias de áreas rurais onde a doença era endêmica, sendo que estas se instalaram de forma rápida e desordenada, em habitações inadequadas e sem adequada infra-estrutura sanitária (19).

A urbanização, favorecida pelas condições precárias de vida existentes nas periferias das cidades, exemplifica o quadro de exclusão social resultante das políticas econômicas e sociais vivenciadas pela população brasileira, a partir da década de 70 (20).

Atualmente, os flebotomíneos encontram-se adaptados ao ambiente urbano, no domicílio e peridomicílio humano. Os abrigos de animais domésticos são considerados os locais mais importantes de criação e repouso desses insetos; somente a fêmea é hematófaga, alimentando-se do sangue de mamíferos e aves (13, 21).

Os seres humanos são os únicos reservatórios da *L. donovani* na Índia (2). O cão, cujo intenso parasitismo cutâneo permite uma fácil infecção do vetor, é o principal reservatório da *L. chagasi* e *L. infantum* em áreas urbanas; as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyus thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) são os reservatórios animais até agora reconhecidos no Brasil (22).

Recentemente, o gato doméstico foi encontrado naturalmente infectado com *L. (L.) infantum chagasi* em São Paulo (23) e com *L. (L.) amazonensis* em Mato Grosso do Sul (24); no entanto, o papel epidemiológico do gato ainda não se encontra esclarecido. Seres humanos, portadores da forma sintomática da LV, foram capazes de infectar flebotomíneos pelo xenodiagnóstico, o que indica que pessoas infectadas também poderiam agir como reservatórios do parasito (25, 26).

Outros modos de transmissão da LV incluem a transplacentária, as transfusões sanguíneas, o compartilhamento de agulhas e seringas devido ao uso de drogas, e o transplante de órgãos (4).

A leishmaniose visceral afeta tanto adultos quanto crianças na Índia e na África, enquanto na América do Sul e na bacia do Mediterrâneo atinge mais crianças pequenas (4). No Brasil, é mais comum em menores de 10 anos, ocorrendo principalmente em menores de 5 anos, sendo o sexo masculino proporcionalmente mais acometido (60%) (6).

O aumento do número de casos nos locais onde a LV ocorre também é favorecido pela presença de fatores de risco individuais que facilitam a evolução de infecção para doença como desnutrição, imunossupressão relacionada ao uso de drogas

imunossupressoras, transplante de órgãos e co-infecção com HIV, desenvolvimento de projetos que trazem seres humanos não imunes para dentro de áreas endêmicas, como construção de estradas, turismo, assentamentos, atividades militares, entre outros (5).

## **2.2. Patogenia**

Leishmânias são parasitos digenéticos, e seu ciclo biológico é completado em dois hospedeiros. Apresentam-se sob duas formas: a amastigota (sem flagelo), obrigatoriamente intracelular em vertebrados, e a promastigota (flagelada), que se desenvolve no tubo digestivo dos vetores invertebrados e em meios de culturas artificiais (22).

O flebotomíneo infecta-se quando suga sangue contendo amastigotas existentes no citoplasma de macrófagos presentes na derme de um animal ou ser humano afetado; os parasitos multiplicam-se no tubo digestivo do vetor, tornando-se infectantes 8-20 dias mais tarde, e são transmitidos sob a forma de promastigotas, quando uma nova vítima é picada (5). As formas promastigotas inoculadas na pele são fagocitadas por macrófagos, transformando-se em amastigotas, que resistem a enzimas fagolisossomais e replicam-se nessas células, espalhando-se pelo sistema reticuloendotelial do hospedeiro (15).

A evolução da infecção é determinada pela natureza e magnitude das respostas de células T e citocinas (27). O desenvolvimento de doença é associada com anergia celular (reversível meses após um tratamento bem sucedido), que pode ser explicada por apresentação inapropriada de antígeno e indução de interleucinas 10 e 4, supressoras da resposta imune (resposta Th2); por outro lado, interleucina-12 e interferon-gamma (resposta Th-1) parecem ser importantes para uma evolução favorável após a infecção pela leishmânia (4, 28).

Em pacientes com infecções clínicas aparentes, no entanto, as respostas Th1 e Th2 não são caracteristicamente polarizadas, tanto que citocinas ativadoras (interferon gamma, interleucina 12) e supressoras (interleucina 10, interleucina 13, interleucina 4)

são detectadas; assim, talvez afetada em alguns pacientes por fatores genéticos (29) a infecção progressiva parece mais provavelmente indicar um tipo de resposta supressora predominante ( $Th2 > Th1$ ) e não uma resposta  $Th1$  inerte (4).

### **2.3. Quadro clínico**

A leishmaniose visceral compreende uma larga variedade de manifestações, podendo apresentar-se sob três formas clínicas distintas: forma assintomática (somente infecção), oligossintomática (forma subclínica) ou clássica; esta última desenvolve-se em três períodos: inicial, de estado e final (13).

As infecções assintomáticas são aquelas em que não há evidências de manifestações clínicas; são vistas em pacientes provenientes de áreas endêmicas da doença e o diagnóstico só é possível através da detecção de uma sorologia positiva (geralmente com anticorpos em títulos baixos e que podem permanecer positivos por longo período de tempo) ou da intradermoreação de Montenegro reativa (6,27). DNA de *Leishmania chagasi* foi detectado no sangue de alguns indivíduos com a forma assintomática (30).

A forma subclínica também ocorre em indivíduos de área endêmica, geralmente crianças (31). Recentemente, Gama et al (32), através do seguimento mensal de 784 crianças de 0 a 5 anos, caracterizaram o perfil clínico e laboratorial dessa apresentação clínica. Trinta e três pacientes foram considerados portadores da forma subclínica (4,2%); a duração dos sintomas não foi prolongada (10 a 40 dias). O quadro clínico foi discreto e a combinação de dados como febre, pequena hepatomegalia (3 a 5 cm), hiperglobulinemia e aumento de VHS foi a que melhor caracterizou a forma, que não é associada com esplenomegalia ou leucopenia expressivas, mais encontradas em crianças com a doença aguda. Leucopenia, trombocitopenia e hipoalbuminemia não foram detectadas em nenhum dos 33 pacientes. O mielograma pode ser positivo ou negativo. Todas as crianças evoluíram para a cura espontânea, não havendo progressão para a forma aguda (clássica), o que confirma que essa apresentação não é considerada um estágio precoce da doença clinicamente manifesta.

A leishmaniose visceral ocorre após um período de incubação que pode variar largamente, de 2 semanas a 8 meses (geralmente 2 a 6 meses) (33).

Na forma clássica da doença, ocorre um período inicial, em que os sintomas instalam-se de forma abrupta ou insidiosa (13). A febre é a manifestação mais freqüente no início do quadro e dificilmente está ausente no calazar. Na forma abrupta ela pode ser elevada (39-40° C), e esse modo de apresentação ocorre mais em adultos ou em crianças maiores; quando o início é insidioso, o doente não sabe precisar o começo dos sintomas, o que é mais encontrado em crianças menores.

Febre contínua ou intermitente, fraqueza, anorexia e perda de peso progridem de semanas a meses (4). O período de estado, decorridos em torno de 3 a 4 meses para as crianças e 6 meses para os adultos, caracteriza-se pela sintomatologia completa (13). Esplenomegalia é a manifestação clínica mais importante depois da febre; o tamanho do baço geralmente é proeminente e supera o do fígado, o que, associado à hepatomegalia, causa aumento de volume abdominal. O baço é geralmente de consistência firme, mas esta pode ser pouco aumentada nas fases iniciais (33). A linfadenopatia é mais comum na África (34).

A tosse, geralmente seca e persistente no início do quadro, permanecendo inalterada e desaparecendo no final do tratamento, sugere a presença da pneumonite intersticial que ocorre na doença (35,36,37). O acometimento do aparelho digestivo é comum, sendo freqüente o relato de dores abdominais e diarreia (13), principalmente nos adultos, atribuída à enterite causada pela *Leishmania* (35).

Com a evolução da doença, a perda de peso e a palidez se instalam. Edemas são mais comuns em membros inferiores, relacionados à hipoalbuminemia; no entanto, mesmo com taxas baixas de albumina, podem não ocorrer (13). Crianças geralmente são mais suscetíveis a infecções e apresentam mais episódios de pneumonia (35,37,38). Hemorragias são frequentemente descritas, principalmente as epistaxes, relatadas em até 70% dos casos (13).

Raramente, a deposição de imunocomplexos nos rins (39) pode levar à leve glomerulonefrite, mas insuficiência renal não é um achado comum na LV (27). O comprometimento hepático geralmente é pouco severo e hepatite clínica, apesar de rara, indica gravidade (40).

Um estudo comparando crianças e adultos no Sudão concluiu que há poucas diferenças no quadro clínico e laboratorial desses dois grupos de pacientes (41). No Brasil, conclusões semelhantes foram obtidas; a duração da doença desde o início dos sintomas até o diagnóstico, no entanto, foi menor nas crianças (35).

No período final, a doença cursa com edema, epistaxe, gengivorragia, icterícia e ascite (28); instala-se a desnutrição, com cabelos quebradiços e pele seca (6). Se não tratada adequadamente, a leishmaniose visceral é sempre fatal. O óbito geralmente ocorre por infecções bacterianas ou hemorragias (6). Anemia grave, febre por mais de 60 dias, diarreia e icterícia são fatores que podem ser associados a mau prognóstico e evolução fatal (42).

Leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), uma forma cutânea crônica que ocorre após a recuperação da leishmaniose visceral (5), tem sido relatada na Índia em aproximadamente 10% dos casos após o tratamento. As lesões, que apresentam caráter difuso, nodular e não ulcerativo na face, tronco e extremidades, contêm parasitas e podem desenvolver-se tão tardiamente quanto 1 a 2 anos após a doença original, podendo também persistir por tempo tão prolongado quanto 20 anos (33). Na África, há relatos de que as lesões dérmicas persistem por poucos meses (34).

Formas hemorrágicas, com púrpura trombocitopênica e hemorragias digestivas, podem ocorrer no calazar; hemorragias também podem ser desencadeadas ou agravadas pelos antimoniais (13).

A leishmaniose visceral está emergindo como uma importante infecção oportunística em indivíduos infectados pelo HIV (15), principalmente no sul da Europa (27) e em usuários de drogas endovenosas (5). A doença, na maioria das vezes, representa reativação de infecção subclínica anterior (28). A apresentação clínica nesses pacientes pode ser típica ou atípica, com sintomas gastrointestinais mais frequentes (43), principalmente naqueles com contagem de células CD4 baixas (15). Mais de 40% dos casos apresentam sorologia negativa (43), principalmente se a infecção por HIV precedeu a infecção pela *Leishmania*., no entanto, os parasitos podem ser abundantes mesmo em sítios e células atípicas, o que facilita o diagnóstico parasitológico (15). Quanto ao tratamento, a resposta a este é menor (50% dos pacientes apresentam uma cura inicial aparente) (27), a toxicidade das drogas comumente utilizadas é maior (pancreatite tem sido relatada em até 20% dos casos) (44,45), e há elevada taxa de recidivas (em torno de 60% dos casos) (46).

## **2.4. Diagnóstico laboratorial**

### **2.4.1. Alterações hematológicas e bioquímicas**

As principais alterações laboratoriais compreendem pancitopenia (anemia, geralmente normocrômica e normocítica; leucopenia, com neutropenia relativa e absoluta e eosinopenia e, na maioria das vezes, linfocitose relativa; plaquetopenia), hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (13, 47). A VHS e a proteína-C reativa apresentam-se elevadas (34). As enzimas hepáticas são normais ou ligeiramente aumentadas (47).

### **2.4.2. Diagnóstico parasitológico**

O diagnóstico etiológico é fundamental para a confirmação de suspeita clínica, possibilitando o tratamento adequado da patologia. A visualização direta de amastigotas é o padrão ouro em locais onde as punções para coleta de aspirados de tecidos podem ser realizadas e a habilidade técnica de profissionais capacitados em exames microscópicos está disponível, com níveis de sensibilidade relatados em torno de mais de 95% em aspirados esplênicos, 55-97% em material de medula óssea e 60% em linfonodos (4,48). A positividade da punção hepática varia em torno de 50-75% (49) e sua realização exige cuidado, para evitar sangramentos; esta técnica não é mais utilizada com frequência no diagnóstico do calazar (50).

A aspiração esplênica requer do profissional que a realiza uma grande experiência, que é difícil de ser encontrada fora de um hospital terciário de referência ou de um centro especializado; o procedimento também apresenta algumas contra-indicações, como anemia severa, tendência hemorrágica e gravidez (5).

O risco de complicações hemorrágicas na punção esplênica torna o procedimento potencialmente fatal (50,51) o que faz da microscopia de aspirado de medula óssea o método diagnóstico mais seguro para pacientes pediátricos (28); no entanto, punções repetidas podem ser necessárias para o aumento da sensibilidade da técnica.



A positividade da microscopia é considerada mais elevada em crianças (com parasitos visualizados em mais de 90% dos casos por um observador experiente) do que em adultos (nos quais se detecta amastigotas em torno de 70%), o que poderia ser explicado pelo maior parasitismo do sistema reticuloendotelial encontrado em pacientes pediátricos (27,28,33). Parasitos foram detectados mais rapidamente no aspirado de medula óssea de crianças menores de 3anos de idade quando comparadas com crianças maiores dessa idade em um estudo que avaliou a sensibilidade do método; a maioria dos pacientes altamente parasitados era constituída de crianças pequenas (52). No Brasil, a positividade da microscopia direta em pacientes pediátricos tem sido relatada variando de 69,3 a 81,2% (53-57).

Recentemente, considerou-se a positividade da microscopia direta de aspirado medular tão elevada quanto à de aspirado esplênico (96,6% e 93,%, respectivamente). Essa elevada sensibilidade só foi possível quando as lâminas de mielograma foram analisadas cuidadosamente e por um período de tempo adequado (52). O método apresenta uma menor positividade se examinado rapidamente; recomenda-se a análise de pelo menos 1200 campos (20 minutos) como o mínimo necessário antes de se determinar uma amostra como negativa; isso forneceria uma sensibilidade de 90% (52).

A cultura de tecidos, geralmente realizada com o clássico meio de NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e meio líquido de LIT ou de Schneider, é demorada, com crescimento de leishmânias em dias ou semanas, e não adequada para tomadas de conduta rápidas (6,27). A inoculação de amostras de tecidos em hamsters (*Mesocricetus auratus*) requer longo tempo para a positividade (1 a 3 meses) (6). A positividade da cultura de aspirado medular varia em torno de 40-50%, enquanto que a de aspirado esplênico situa-se em torno de 70-98% (49).

#### **2.4.3. Diagnóstico sorológico**

Nos locais onde a coleta de aspirados de tecidos não pode ser realizada, a pesquisa de anticorpos séricos em títulos elevados é o diagnóstico padrão (4). No Brasil, os principais métodos sorológicos empregados são a reação de imunofluorescência

indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e o teste de aglutinação direta (DAT) (14).

A RIFI é utilizada desde a década de 60 (58). Diluições a partir de 1:80 são consideradas positivas (2). É um dos testes disponíveis mais sensíveis, detectando anticorpos em estágios precoces da infecção, que se tornam indetectáveis 6 a 9 meses após a cura; a sensibilidade varia de 55% a 96% e a especificidade é relatada em torno de 70 a 98% (49). Em crianças brasileiras, dois estudos que empregam a RIFI mostram índices de positividade de 86% e 97,6% no diagnóstico do calazar (56, 54).

ELISA surgiu a partir da década de 70, e muitos estudos aprimoraram o ELISA-padrão e suas diversas variações: Dot-ELISA, fucose manose ligant-ELISA (FML-ELISA), bovine submaxillary mucin-ELISA (BMS-ELISA), FAST-ELISA, micro ELISA entre outras (49,58). É um teste útil e sensível, que permite a análise rápida de um grande número de amostras; vários antígenos podem ser empregados na reação, sendo sua sensibilidade (36-100%) e especificidade (85-100%) influenciadas pelo antígeno utilizado (48,49).

Um teste alternativo para o diagnóstico de LV, simples, de fácil execução e baixo custo é o teste de aglutinação direta (DAT) (59). Um estudo recente realizado no Brasil demonstrou sensibilidade de 100% com uma diluição sérica maior ou igual a 1:800; uma variação da DAT, o FAST (Fast Agglutination Screening Test), avaliado no mesmo ensaio, mostrou resultados comparáveis com uma diluição de 1:100 (60).

As principais limitações dos testes sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral são: a possibilidade de reações cruzadas com outros microorganismos, como os causadores de leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (61), a ocorrência de resultados positivos em indivíduos que entraram em contato com o parasito mas não têm doença (61), e a falta de resposta humoral em pacientes imunocomprometidos (43).

Antígenos purificados ou recombinantes têm sido utilizados com vantagem sobre os antígenos brutos, propiciando maior sensibilidade e especificidade aos testes sorológicos (14). Um antígeno recombinante bem estudado, considerado o mais potente e promissor antígeno sorológico, é o rK39, que alcança sensibilidade em torno de 95% a 100% (12, 58). A detecção rápida de anticorpos anti-rK39 em sangue coletado a partir de punção de dedo tem sido possível utilizando-se um teste imunocromatográfico no qual o antígeno é fixado em fita (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*-

TRALd), com leitura em 10 minutos, o que facilita sua utilização em condições de campo (4,14).

Recentemente, um teste de aglutinação do látex (KATEX) foi desenvolvido para a detecção de antígeno de *Leishmania* na urina de pacientes com calazar, com sensibilidade variando de 68 a 100% e especificidade de 100%, sendo considerado promissor no diagnóstico de pacientes imunossuprimidos (62).

#### **2.4.4. Diagnóstico molecular**

Nos últimos anos, o aprimoramento de abordagens moleculares para a identificação de seqüências de ácidos nucleicos específicas para determinados patógenos abriu novas oportunidades para a identificação e a caracterização de agentes infecciosos, incluindo os causadores das leishmanioses. Várias técnicas inovadoras estão em desenvolvimento, entre elas, as de amplificação de alvos gênicos (úteis devido à possibilidade do DNA ou RNA alvo estarem presentes em quantidades mínimas nas amostras clínicas), como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (RT-PCR, nested-PCR, PCR multiplex, PCR quantitativo) (63,64).

A PCR é um teste que imita *in vitro*, em um tubo de ensaio, o processo de replicação do DNA realizado *in vivo* pelos organismos na natureza. Esse processo possibilita a síntese de milhões de cópias de uma única seqüência de DNA em poucas horas.

O DNA presente nos cromossomas é uma dupla fita, enrolada em forma de hélice. Cada fita é constituída pelas bases nucleotídicas adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). As bases estão ligadas entre si, numa mesma fita de DNA, por um esqueleto formado de moléculas de deoxi-ribose. O arranjo das letras A, C, G e T no DNA gera uma seqüência (seqüência gênica). A base A de uma fita de DNA *sempre* pareia com a base T da outra fita, enquanto que a base C *sempre* pareia com a base G (princípio da complementaridade), através de ligações por pontes de hidrogênio. Devido a isso, as 2 fitas de DNA são chamadas de "complementares" (65).

*In vivo*, a enzima DNA polimerase utiliza apenas uma das fitas do DNA como um "molde" para reproduzir outra fita; portanto, as fitas duplas são separadas, para que a partir de uma delas, denominada "fita template", seja produzida uma fita complementar.

A PCR explora algumas dessas características que ocorrem na replicação do DNA *in vivo*. A fita *template* pode ser produzida em laboratório através do simples aquecimento da fita dupla de DNA em temperaturas próximas à fervura; para iniciar a síntese, são primeiro produzidos oligonucleotídeos “iniciadores”, denominados de *primers*. Os reagentes utilizados na técnica, além dos dois *primers*, são: uma grande quantidade de cada um dos deoxinucleosídeos (A,C,T,G) e uma DNA-polimerase termoestável, a *Taq*-polimerase. Esses reagentes são adicionados ao tubo de ensaio com o DNA-alvo, isto é, aquele que contém a seqüência a ser amplificada (65).

O processo de amplificação do DNA-alvo ocorre em três etapas, utilizando três temperaturas diferentes, controladas por um termociclador automático, que são repetidas na mesma ordem a cada ciclo (66).

Na primeira etapa, a desnaturação, o ciclador aquece cada amostra a uma temperatura em torno de 94° C, por cerca de 5 minutos: isso causa a separação completa da dupla fita de DNA. As fitas, agora transformadas em simples, tornam-se fitas *templates*, acessíveis aos iniciadores e à DNA polimerase (65).

Na segunda etapa, denominada de anelamento, a temperatura é abaixada rapidamente para 37-55°C, permitindo aos primers anelarem-se às seqüências complementares de DNA.

Na terceira etapa, a de alongamento ou extensão da reação, a temperatura é novamente elevada a 72° C, que é a considerada ótima para a ação da *Taq*-polimerase, enzima capaz de permanecer estável e sintetizar novas fitas de DNA a partir do iniciador em temperaturas elevadas, pois foi isolada de uma bactéria que vive em fontes de água quente. Com a elevação da temperatura, a *Taq*-polimerase adiciona os oligonucleotídeos na nova fita de DNA de forma complementar. A enzima sintetiza novas moléculas de DNA, mas apenas de uma particular região do DNA (65).

Repetem-se vários ciclos e a cada novo ciclo ocorre a duplicação das moléculas de DNA sintetizadas no ciclo anterior, levando a um aumento geométrico do número destas. Após 30 ciclos, mais de um milhão de cópias do DNA-alvo estarão produzidas, a partir de uma única molécula de DNA inicial.

O material ampliado pode ser detectado por eletroforese em gel de agarose, corado por brometo de etídio, e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Alternativamente, pode ser submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida e revelado

com a coloração com a prata, com posterior identificação por hibridização em fase sólida (se necessário maior sensibilidade de detecção do DNA) (63).

Leishmânias são parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida, um grupo de organismos que possuem cinetoplasto, uma organela única situada na base do flagelo, na mitocôndria da célula, que contém uma rede de DNA (kDNA) composta de dois componentes: os maxicírculos e os minicírculos (Figura 1) (67-69). Para o diagnóstico das leishmanioses pela PCR, o melhor alvo tem sido o DNA presente nos minicírculos do DNA mitocondrial (kDNA) da região conservada, ou o minicírculo completo (67,68).

Os maxicírculos são moléculas circulares de DNA de 20-40 kb (dependendo da espécie), presentes em 30-50 cópias por rede, que codificam proteínas envolvidas na produção de energia (69). Na maioria das espécies de tripanosomatídeos, os minicírculos perfazem cerca de 95% da massa de kDNA, e em geral, têm o mesmo tamanho dentro de uma determinada espécie.

Apesar da grande heterogeneidade existente entre as seqüências primárias dos minicírculos, algumas características da organização destas são comuns a todos eles. Estas moléculas contêm pelo menos uma região conservada de aproximadamente 200 pares de base, razoavelmente homogênea entre representantes filogeneticamente relacionados, sendo o restante denominado de região variável (68), rica em bases A e T e que contém seqüências possivelmente espécie-específicas (69). Os minicírculos apresentam, portanto, características que cumprem as exigências básicas para serem considerados bons substratos para sondas moleculares destinadas ao diagnóstico e tipagem das leishmânias: estão presentes em cerca de 10.000 a 20.000 cópias por parasito, o que os torna bons alvos de amplificação em experimentos de hibridação molecular, além de possuírem uma região variável que pode ser fonte de sondas específicas para cada espécie (70).

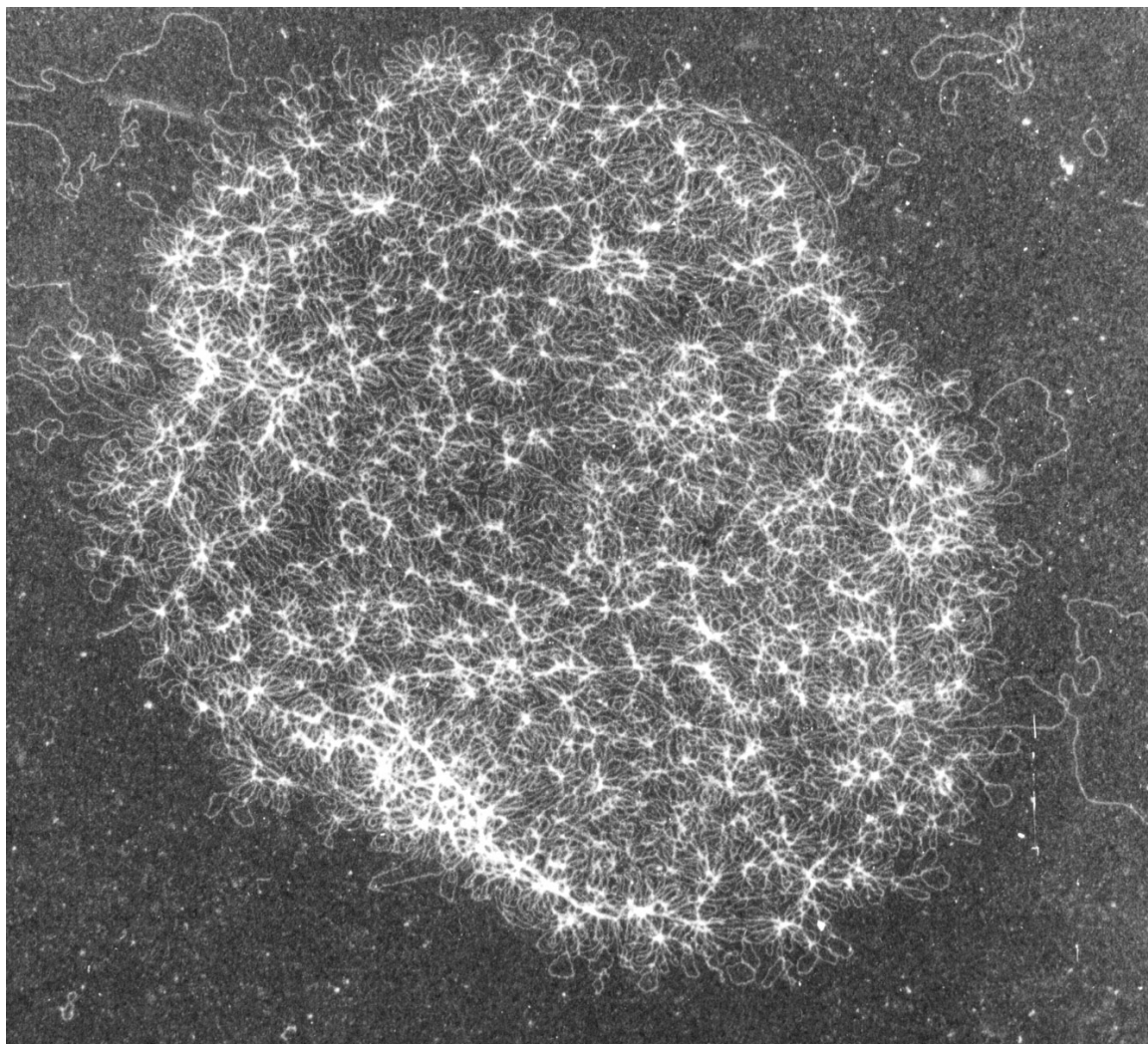


Figura 1. Rede de DNA em cadeia do cinetoplasto (kDNA) (69).

Diversas amostras biológicas podem ser empregadas na PCR, como sangue periférico (71-77), medula óssea (78-80), linfonodos (81) e creme leucocitário (76). O seu uso para diagnóstico em crianças foi demonstrado com sucesso na Itália (82). PCR é um dos métodos mais sensíveis de diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes HIV positivos (75,83).

Estudos que utilizam o método no sangue periférico mostram sensibilidade variando de 70 a 99% (72,73,77,80,84,85). Quando se emprega aspirado de medula óssea, aproximadamente 100% das amostras são positivas (78,83).

A detecção persistente de DNA de parasitos em tecidos infectados também pode ser usada como marcador para o risco de recidiva após uma cura clínica inicial (27,82,86-88).

Atualmente, a PCR pode ser vista como um método promissor, com a potencial vantagem de utilizar amostras de sangue em vez dos convencionais procedimentos invasivos (33). No entanto, não é um método facilmente utilizado em campo, onde a confirmação do diagnóstico clínico comumente representa um problema, e apresenta outras limitações, como o custo e a necessidade da disponibilidade de reagentes e de equipamentos (2,58).

#### **2.4.5. Identificação de *Leishmania***

Na tipagem de *Leishmania*, os parasitos primeiramente descritos foram definidos usando-se características morfológicas e/ou biológicas, como o desenvolvimento diferenciado destes em animais experimentais (definindo leishmânias associadas às distintas patologias) ou nos flebotomíneos vetores (considerando a localização dos flagelados nos diferentes compartimentos do trato digestivo do inseto), o que foi essencial na diferenciação de dois grupos filogenéticos distintos, classificados como os subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*. Os descritos mais recentemente, utilizaram procedimentos baseados em métodos bioquímicos (análise de zimodemas) e/ou imunológicos (análise de serodemas, empregando anticorpos monoclonais), ou de uma bateria de métodos moleculares usados em análise das moléculas do DNA do cinetoplasto (kDNA) ou do DNA nuclear (nDNA), de diferentes gens, como espaçadores internos transcritos ou não transcritos do gene de rRNA, beta-tubulina e do

gene que codifica para a principal glicoproteína de superfície de *Leishmania*, a gp63 (63, 89).

## **2.5. Diagnóstico diferencial**

O diagnóstico diferencial da leishmaniose visceral deve incluir outras condições associadas à esplenomegalia maciça como malária, síndrome da esplenomegalia tropical, tuberculose miliar, hipertensão porta, leucemias e linfomas e anemias hemolíticas (33).

## **2.6. Tratamento**

Nos últimos 5 anos, considerável progresso tem sido obtido no tratamento da leishmaniose visceral (3, 4, 90). O antimônio é conhecido desde a antiguidade pelos egípcios (91), e seus derivados pentavalentes ( $Sb^V$ ) são utilizados com sucesso no tratamento da doença há mais de 50 anos, devido à sua comprovada eficácia e custo acessível (92).

No entanto, a crescente resistência desses compostos na Índia (93) tem gerado novas abordagens terapêuticas (94); antigas alternativas, como a anfotericina B, têm sido redescobertas, e suas novas formulações lipídicas, menos tóxicas e utilizadas em esquemas mais curtos (95), têm revolucionado o tratamento da doença. Após muitas décadas de tentativas frustradas de utilização de drogas orais, o novo composto miltefosina é o primeiro a ser empregado com sucesso, por essa via, no tratamento da leishmaniose visceral (96).

### **2.6.1. Antimoniais pentavalentes**

Os antimoniais continuam a ser a primeira opção de tratamento em todas as regiões do mundo (3,4) com duas exceções: do estado indiano de Bihar, onde a



resistência a esses compostos atinge níveis alarmantes de 50 a 65 %, obrigando a adoção de outras alternativas que não os antimoniais (93), e mais atualmente do sul da Europa, em países desenvolvidos em volta do Mediterrâneo, onde o custo das medicações não é fator limitante, e a anfotericina B lipossomal, cara mas de elevada eficácia e capaz de reduzir as prolongadas permanências hospitalares, tem se tornado, para muitos pacientes, o tratamento de escolha da doença (4, 97-99).

Duas formulações de antimônio são atualmente disponíveis, o estiboglunato de sódio (Pentostan ®), utilizado nos países de língua inglesa, e o antimoniato-N-metil glucamina (ou antimoniato de meglumina, Glucantime®), usado em outros sem tradição desse idioma, entre eles o Brasil (2,6), ambos com eficácia e toxicidade semelhantes (34).

O mecanismo de ação do antimônio é mal conhecido: apresenta uma ação inibitória sobre a síntese de ATP, sobre a oxidação glicolítica e sobre o metabolismo dos ácidos graxos do parasito (100). A dose de antimoniato recomendada para o tratamento da LV no Brasil é de 20mg/kg/dia de Sb<sup>v</sup>, por no mínimo 20 dias; nos casos mais avançados, onde a resposta terapêutica não é evidente, o tempo deve ser estendido para 30 dias, ou mais, no máximo 40 dias (até 2 a 3 ampolas/dia do produto) (6).

O antimônio é uma droga de eliminação renal rápida. A maior parte (80%) é excretada pelos rins em 6 horas, com meia vida de duas horas, e apenas uma pequena porção da dose administrada fica retida no organismo. Após essa fase, o antimônio residual concentrado nos tecidos sofre uma eliminação lenta, com meia vida de até 76 horas e, a partir do 12º dia de administração, os níveis teciduais atingem o seu pico máximo, produzindo seus conhecidos efeitos tóxicos, principalmente sobre o aparelho cardiovascular (100).

Embora eficazes, os antimoniais apresentam efeitos tóxicos inconvenientes, quase sempre reversíveis (15). Classicamente, são descritos sinais de intolerância, do tipo alérgico, geralmente precoces e independentes da dose (44), ocorrendo no início do tratamento e cessando com a interrupção deste. Traduzem uma hipersensibilidade imediata (febre, calafrios, mialgia, artralgia, tosse quintosa, erupção cutânea, cefaléia) e geralmente não justificam a interrupção da terapia (101). Os sinais de intoxicação ocorrem no final do tratamento, em regra na terceira semana de uso do medicamento, e traduzem uma superdosagem (sinais de toxicidade cardíaca, hepática, renal pancreática e hematológica) (44).

As anormalidades eletrocardiográficas desenvolvem-se gradualmente e são reversíveis após 1 a 3 semanas (34); as mais freqüentes são a inversão da onda T com infradesnívelamento de ST e o alargamento do espaço QTc, que ocorrem mais freqüentemente quanto maior a dose diária e mais prolongada a duração da terapia (102,103). A monitorização cuidadosa em pessoas que necessitam de mais de 20 dias de tratamento, duas vezes por semana a partir da terceira semana, é indicada, e pode detectar sinais precoces de toxicidade; idosos, obesos e pacientes com doenças cardíacas, hepáticas ou renais de base também devem ser monitorizadas duas vezes por semana ou mais (102). O tratamento deve ser interrompido se o paciente desenvolver arritmia significativa, espaço QTc > 0,50 segundos ou segmento ST côncavo (102), já que as alterações de repolarização podem preceder o aparecimento de distúrbios de ritmo às vezes mortais (104,105).

Hepatite ou pancreatite clínica são raras, mas elevações pequenas ou moderadas de enzimas hepáticas e pancreáticas, geralmente transitórias e reversíveis, podem ocorrer (34). O risco de hepatite mortal, no entanto, justifica a diminuição das doses ou a suspensão do tratamento quando as transaminases atingem níveis superiores a 5 vezes o normal (101).

Os efeitos dos antimoniais como leucopenia, trombocitopenia, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade foram identificados antes do reconhecimento das alterações pancreáticas. A pancreatite é pouco descrita, provavelmente por ser pouco reconhecida (106). Náuseas, vômitos e dor abdominal, sintomas mal definidos há muito atribuídos ao antimônio, poderiam traduzir casos de pancreatite não reconhecida (45); alguns autores, no entanto, não detectaram elevação de enzimas pancreáticas associadas a esses episódios (44).

Pancreatite bioquímica é comum, geralmente assintomática, e não requer a suspensão do tratamento (34). Elevações dos níveis de amilase acima de 4 vezes o valor normal e acima de 15 vezes nos de lipase, principalmente se o aumento ocorre rapidamente ou é acompanhado de dor abdominal, náuseas e vômitos, seriam critérios para a suspensão temporária da medicação (45). Se após a suspensão de alguns dias os sintomas e as enzimas diminuem, pode-se tentar reintroduzir o antimoniato novamente, mas a decisão de se continuar o tratamento com a mesma droga, ou optar-se por outra, deve ser estudada em cada caso. A monitorização da função pancreática deve ser realizada durante o tratamento (106).

Insuficiência renal aguda fatal devido à necrose tubular aguda tem sido relatada, principalmente relacionada à dose elevada, em paciente obeso (107), ou em idosos com deterioração prévia da função renal (44). A eliminação predominantemente urinária dos antimoniais expõe o paciente ao risco de acúmulo sérico tóxico nos casos de comprometimento renal (101), mas os acidentes renais são raros e evitáveis, quando se reduz a dose em casos de insuficiência renal leve a moderada. A anfotericina B lipossomal é preferível se houver comprometimento renal significativo (108).

As alterações hematológicas, sobre as 3 linhagens, podem ocorrer durante o tratamento (agranulocitose, trombocitopenia e anemia) (44) e são regressivas (101).

O relato de desenvolvimento de resistência aos antimoniais na Índia oferece importantes lições de erros praticados, que devem ser evitados: a disponibilidade sem restrição dessas drogas, que propiciou seu uso por pessoas não qualificadas; a prática de começar-se o tratamento com uma dose pequena, aumentando-se progressivamente a mesma até atingir-se a dose total no período de uma semana; o estabelecimento de períodos sem tratamento para minimizar a toxicidade; o uso do medicamento por período de tempo inferior ao mínimo recomendado; a rotulação de pacientes como refratários ao antimonial, com adoção de esquema de segunda linha, sem que os mesmos tivessem recebido tratamento por tempo adequado (93).

### **2.6.2. Anfotericina B convencional (desoxicolato sódico)**

A anfotericina B é um antibiótico poliênico cujo uso para tratamento da leishmaniose é bioquimicamente racional, já que seu alvo são ésteres como o episterol e ergosterol, que são componentes majoritários da membrana da *Leishmania*. A droga altera a permeabilidade da membrana celular, causando poros que provocam extravasamento dos componentes intracelulares, alterando seu balanço iônico, o que resulta em morte celular (92). Em menor extensão, liga-se ao colesterol da parede celular de células humanas, levando a efeitos tóxicos (109,110).

Os antibióticos poliênicos caracterizam-se por baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos; essa característica é responsável pela absorção intestinal mínima da anfotericina B, o que torna seu uso por via oral impraticável. Portanto, a droga precisa ser administrada por via parenteral para atingir níveis suficientes, sendo necessária a adição de desoxicolato, um agente solubilizante (110).

A eliminação da anfotericina B se faz parcialmente por via biliar (20%-30%) e em menor quantidade por via renal (5% eliminados nas primeiras 24 horas e 40% nos 7 dias seguintes) (111). Dados detalhados do metabolismo da anfotericina B são ainda incompletos, não havendo metabólitos identificados. A droga é organodepositária, e apresenta meia vida prolongada, de 15 dias, sendo detectada nos soro em níveis baixos por vários dias após sua administração (110,111).

Anfotericina B é a mais potente droga leishmanicida, tradicional alternativa parenteral para falências terapêuticas com o uso de antimoniais, e foi durante muito tempo considerada como droga de segunda linha, devido à sua toxicidade (15). Hoje é utilizada como a primeira alternativa no tratamento da leishmaniose visceral nas regiões de refratariedade (3), e no Brasil é indicada como primeira escolha no tratamento de gestantes e pacientes graves (108).

Toda a experiência publicada com anfotericina B, praticamente, tem sido gerada na Índia, onde os elevados índices de resistência aos antimoniais invalidam a utilização dessas drogas como opções terapêuticas (93,112,113). Apesar de altamente eficaz (a dose de 1mg/kg/dia, por 20 dias, utilizada em aproximadamente 1.000 pacientes, atingiu 99% de cura) (114), a droga apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de infusão parenteral lenta por aproximadamente 4 horas, os conhecidos efeitos tóxicos e o requerimento de uso prolongado (3,4,92). A administração diária, e não em dias alternados, e o início do tratamento já com a dose de 1mg/kg/dia (sem aumento progressivo a partir uma dose menor) têm sido utilizados com sucesso e colaboram para a redução do tempo de tratamento (114).

Os efeitos adversos podem ser agudos ou crônicos. Os agudos estão relacionados à infusão, como febre, calafrios e tromboflebite, e ocorrem em 80% dos casos (110); o uso de antiinflamatórios não hormonais, antihistamínicos e hidrocortisona pode diminuir a severidade dessas reações (94,115). Os efeitos crônicos incluem principalmente insuficiência renal, geralmente reversível, por comprometimento glomerular e tubular e hipopotassemia; também podem ocorrer comprometimento hepático, supressão de medula óssea, miocardite e morte súbita (94).

A toxicidade, principalmente cardíaca, pode ser diminuída com algumas precauções: a correção de distúrbios eletrolíticos antes do início do tratamento (que diminui o risco de falência cardíaca), o estabelecimento de um período de descanso de 10 dias antes da administração da droga, quando alterações eletrocardiográficas

decorrentes de dano miocárdico após uso de antimônio estiverem presentes (o que reduz o risco de parada cardíaca súbita e arritmias que poderiam causar a morte), e a correção prévia de anemia, melhorando as condições gerais do paciente (114). A anfotericina B é tão ativa quanto suas formulações lipossomais (112).

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de drogas tem sido um dos principais temas de pesquisa em tecnologia farmacêutica nos últimos anos. Entre as alternativas recentemente relatadas de novas formulações de anfotericina B, destacam-se os sistemas carreadores representados por lipossomos, sistemas carreadores nanoparticulados (nanosuspensões e nanopartículas lipídicas sólidas), emulsões e cocleados (110,116). Destes, especial atenção tem sido dirigida às formulações lipídicas da anfotericina B.

### **2.6.3. Formulações lipídicas de anfotericina B**

A necessidade de formulações menos tóxicas de anfotericina B levou à substituição do desoxicolato por outros lipídeos, resultando em 3 formulações: anfotericina B lipossomal (AmBisome®), anfotericina B dispersão coloidal [ABCD (Amphocil® ou Amphotec®)] e anfotericina B complexo lipídico [ABL (Abelcet®)]. Todas foram testadas com sucesso no tratamento da leishmaniose visceral (94).

Formulações lipídicas de anfotericina B propiciam tratamentos mais curtos e são muito mais seguras. Permitem o uso diário de doses mais altas e regimes de duração tão curtos como 5 a 10 dias, e são comprovadamente eficazes, desde que doses totais suficientes sejam dadas (27).

Os macrófagos do fígado, baço e medula óssea, local onde as leishmânias se domicíliam, também retiram as drogas carreadas da circulação após sua administração parenteral, entregando a anfotericina B no alvo da infecção (34,117). Isso proporciona uma baixa captação destas formulações pelos rins, tornando-as menos tóxicas do que a apresentação convencional (4). São, no entanto, mais caras, fator que limita seu uso em países em desenvolvimento (2, 90).

As formulações lipídicas de anfotericina B são semelhantes em alguns aspectos, mas apresentam diferente tolerabilidade e perfil farmacocinético, resultante de suas

diferenças estruturais (34). Lipossomas são esferas microscópicas fechadas com um núcleo aquoso interno, circundado por uma dupla camada lipídica externa. AmBisome® é a única considerada como um verdadeiro lipossoma (Figura 2) (118). É uma apresentação na qual a anfotericina B é encapsulada dentro de lipossomas feitos com fosfatidil colina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol; Abelcet® existe como uma estrutura em forma de fita, e Amphotec® também não é verdadeiramente um lipossoma, e sim uma dispersão coloidal de anfotericina B, na qual esta é unida a sulfato de colesterol em forma de discos de 100 nm de diâmetro por 4 nm de largura (Figura 2) (118).

O pequeno tamanho das partículas de AmBisome® (vesículas menores que 100 nm de diâmetro), a inclusão do colesterol e a formação de uma carga complexa entre a anfotericina B e o disterolfosfatidilglicerol, aliados à estabilidade plasmática do complexo, resultam em concentração plasmática 25 e 50 vezes maior do que a de Amphotec® e Abelcet®, respectivamente, e 75 vezes maior do que a da anfotericina B convencional (118).

AmBisome® é a mais testada das apresentações e a única aprovada pelo Food and Drug Administration (3); é a que apresenta melhor relação eficácia/inocuidade, sendo também a mais cara (119). No Brasil, é indicada na dose de 3mg/kg/dia durante 7 dias, ou 4mg/kg/dia durante 5 dias (108) e seu uso gratuito é provido pelo Ministério da Saúde, em indicações restritas à falha terapêutica ou toxicidade ao desoxicolato de anfotericina B, transplantados renais ou pacientes com insuficiência renal (108).

As doses mínimas totais necessárias para atingir 95% de taxas de cura variam de acordo com a região geográfica: 6m/kg, 14mg/kg e 21 mg/kg na Índia, Quênia e Brasil, respectivamente (120). A eficácia de AmBisome® tem sido documentada no mundo todo, tanto em adultos quanto em crianças (97,112,121-123).

Anfotericina B dispersão coloidal (Amphocil®) foi utilizada com sucesso em um pequeno número de pacientes brasileiros; a dose considerada mais eficaz foi a de 2mg/kg/dia, por 7 dias (124,125); a reação adversa mais importante foi a febre, que ocorreu em 8 de 10 pacientes, foi mais severa em crianças abaixo de 6 anos e esteve às vezes associada a *distress* respiratório e cianose (125).

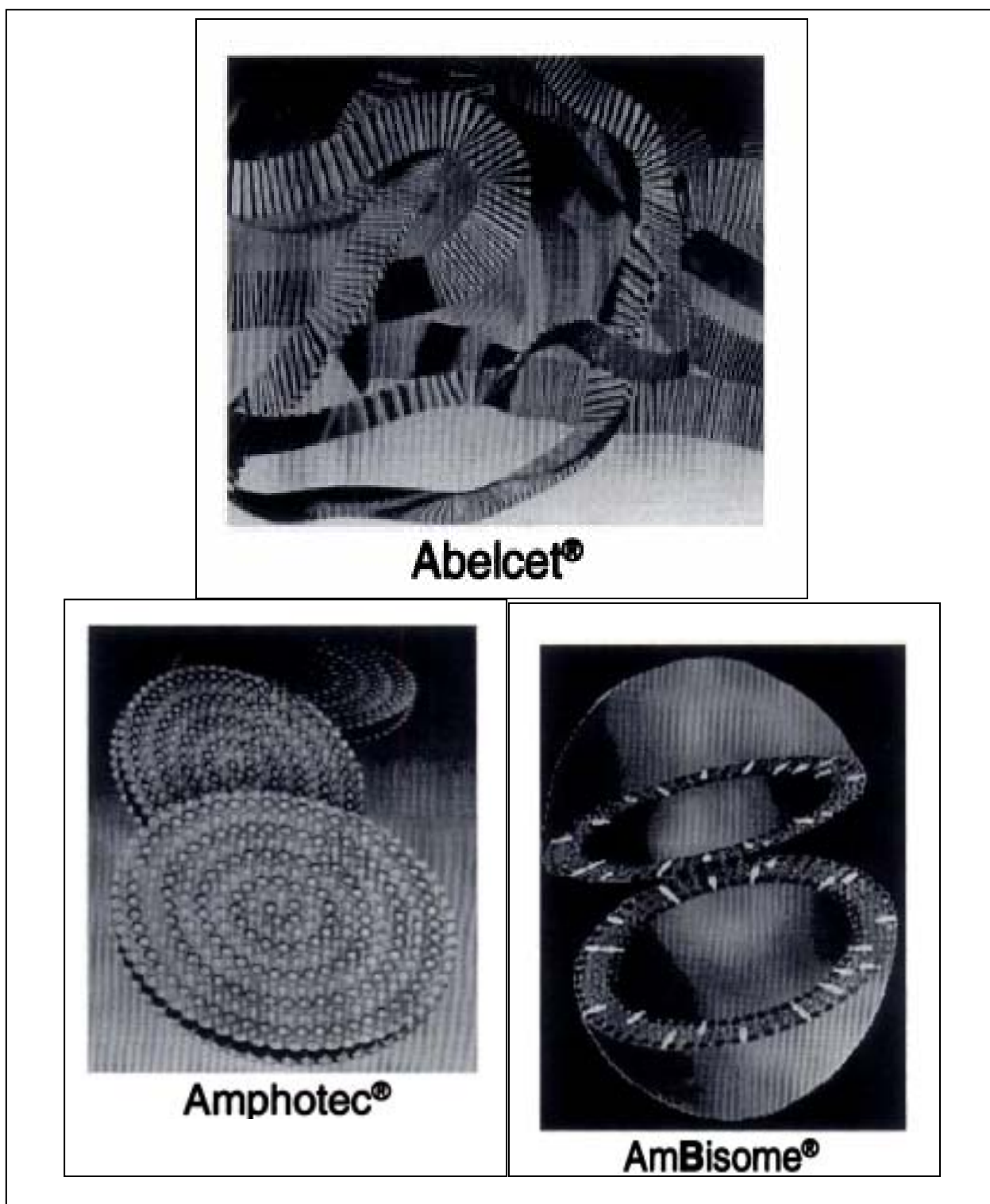


Figura 2 . Representação esquemática das diferentes estruturas das formulações lipídicas de anfotericina B (118).

#### **2.6.4. Pentamidina**

É uma droga cujo uso está sendo abandonado no tratamento da leishmaniose visceral, devido ao crescente declínio da resposta terapêutica, alto custo e por ser extremamente tóxica, podendo causar diabetes mellitus insulino-dependente, choque e toxicidade cardíaca, levando a arritmias e mortes (94).

#### **2.6.5. Paromomicina (Aminosidina)**

É um aminoglicosídeo com larga atividade antiparasitária, utilizado como monoterapia ou em combinação com estibogluconato no tratamento da leishmaniose visceral, para reduzir a duração da terapia (12), apresentando elevada eficácia e baixa taxa de efeitos adversos, que incluem nefrotoxicidade e lesão do oitavo par craniano (94). A droga é eficaz, bem tolerada e tão barata quanto a anfotericina B convencional (2). Uma nova preparação manufaturada está sendo testada na Índia (3).

#### **2.6.6. Interferon $\gamma$**

No intuito de estimular macrófagos tissulares e iniciar mecanismos leishmanicidas, foi utilizado primeiramente por Badaró et al (1990), mostrando bons resultados, juntamente com antimônio, em poucos pacientes no Brasil (126), mas posteriormente demonstrou não ser suficientemente ativo para ser utilizado em monoterapia, além de apresentar efeitos colaterais (febre, calafrios, fadiga mialgias e cefaléia) (12). Empregado juntamente com o antimônio, acelera o tempo de desaparecimento da *Leishmania*, mas não interfere nos índices de cura, se comparado com essa droga isoladamente (127).

#### **2.6.7. Sitamaquine (WR6026)**

É uma 8-aminoquinolina análoga à primaquina. Pouco se sabe sobre sua eficácia e toxicidade (2). No Brasil, foi testada em um pequeno número de pacientes, sendo que os índices de cura foram extremamente baixos, detectando-se ocorrência de nefrite



intersticial, efeito adverso não relatado anteriormente em estudos animais ou de fase 1(128).

### **2.6.8. Miltefosina**

Miltefosina, uma droga originalmente desenvolvida como agente antineoplásico (119), é a primeira apresentação oral efetiva para o tratamento da leishmaniose visceral, incluindo infecções resistentes ao antimônio (4). Aprovada na Índia em 2002, na Alemanha em 2004 e na Colômbia em 2005 para uso por 28 dias, é ativa em adultos e crianças (4). Na Índia, a taxa de cura foi de 94% em adultos, com uma dose diária de 100mg para indivíduos pesando mais de 25kg ou 50mg para os abaixo desse peso; em crianças, o tratamento obteve o mesmo índice de cura, com a dose de 2,5 mg/kg/dia por 28 dias (129,130,131).

A toxicidade (gastrointestinal, hepática e renal) é geralmente tolerável e reversível; no entanto, embora pouco intensa na maioria dos pacientes, a toxicidade gastrointestinal pode ser severa o suficiente para ocasionar a suspensão do tratamento (112, 132). Aproximadamente 50% dos pacientes experimentam entre 1 e 4 episódios de intolerância gastrointestinal em 4 semanas de terapia; vômitos são duas vezes mais freqüentes do que diarreia (112). Alteração assintomática e reversível de enzimas hepáticas pode ocorrer. Embora incomum, nefrotoxicidade moderada a severa pode ser encontrada em 2% e 1% dos pacientes, respectivamente (112).

A droga não pode ser usada em mulheres grávidas, ou em idade fértil (a menos que a contracepção seja utilizada durante toda a terapia e por mais dois meses após a retirada), devido ao seu potencial teratogênico (4,129,132).

A eficácia da miltefosina em outras áreas endêmicas como o Sudão, e contra *L. infantum* ou *L. chagasi* na região do Mediterrâneo e na América do Sul, respectivamente, ainda necessita ser comprovada (92).

Na Índia, onde se concentram aproximadamente 50% do calazar mundial e onde 90% dos casos ocorrem em indivíduos que vivem em situação de pobreza, em áreas rurais de Bihar (cuja a renda familiar diária é em torno de U\$ 1), o futuro em relação ao uso correto da miltefosina é motivo de preocupação (133). O emprego por via oral possibilitou o manejo por pacientes ambulatoriais; a droga é largamente disponível no país, sem prescrição médica e sem restrição de quantidade, e seu custo, em torno de

US\$145, poderia motivar a compra de quantidades menores do medicamento, apenas suficientes para permitir que o paciente começasse a se sentir melhor e pudesse retornar ao trabalho ou à escola. Bihar é a única região endêmica onde anos de tratamentos incompletos resultaram na ineficácia dos antimoniais como recurso terapêutico; a possibilidade de surgimento de resistência à miltefosina pelo mesmo motivo mostra que seu uso irrestrito deve acabar, e que um sistema estritamente supervisionado precisa ser instituído (133).

### **2.6.9. Resposta ao tratamento**

A maioria dos pacientes apresenta melhora clínica após 7 a 10 dias de tratamento (4,6). A febre geralmente desaparece precocemente, em torno do 5º dia, os parâmetros hematológicos melhoram a partir da segunda semana, e ao final do tratamento o tamanho do baço apresenta redução de 40% ou mais, em relação à medida inicial (6). Noventa por cento ou mais dos pacientes apresentam cura aparente; 5 a 10% não respondem ou morrem durante a terapia, devido ao estágio muito avançado da doença, intercorrências ou toxicidade das drogas utilizadas; 5 a 10% daqueles aparentemente curados apresentam recidiva, a maioria das vezes dentro de 6 meses após o final do tratamento. A resposta terapêutica não é considerada completa até que 6 meses ou mais, após o tratamento, tenham se passado (4).

### **2.6.10. Algumas perspectivas no tratamento**

A terapia combinada encontra-se em discussão atualmente, parecendo encontrar novo campo no tratamento das leishmanioses (109). A associação de dois medicamentos deveria ser promovida, para preservar-se a eficácia das drogas atuais e futuras (119). Uma combinação que tem sido considerada é a do antimonial com a anfotericina B (7), os dois medicamentos mais eficazes no tratamento.

Outra perspectiva futura seria a utilização de anfotericina B por via oral. Como já discutido, a captação gastrointestinal da anfotericina B convencional é mínima. Tentativas de melhorar essa situação têm sido recentemente relatadas, por meio da utilização de anfotericina B cocleada ou em nanosuspensão, demonstrando que o uso

oral poderia ser praticável (109). Essas formulações estão sendo testadas em modelos animais (110, 116, 134).

Cocleados constituem um novo sistema lipídico carreador, com potencial para administração de drogas hidrofóbicas por via oral (134). São micelas cilíndricas multilamelares que se formam espontaneamente quando um fosfolípido ativo de soja, a fosfatidilserina (ultrasonicada), é tratada com  $\text{Ca}^{2+}$ , havendo retirada de água do fosfolípido (116). A estrutura multilamelar é constituída de uma folha de dupla camada lipídica enrolada em espiral, sem espaço aquoso interno, que envolve a anfotericina B como um lipossomo; o encapsulamento ou envolvimento da anfotericina B pelo fosfolípido faz com que esta permaneça limitada entre as camadas espirais, protegendo-a da degradação no trato gastrointestinal e permitindo sua absorção e fagocitose pelas células do sistema reticuloendotelial (134).

Novos investimentos deverão ser feitos para o aperfeiçoamento das formulações de anfotericina B, o que, no entanto, levará muito tempo; mesmo os melhoramentos na eficácia e segurança, que hoje parecem possíveis, provavelmente não estarão no mercado antes de 2015 (110).

## **2.7. Prevenção**

A LV tem se revelado uma endemia de difícil controle no Brasil, não existindo medidas simples e eficazes de proteção. Estas visam aos diferentes elos do ciclo de transmissão, que são o vetor, o reservatório e o homem, e foram recentemente divulgadas pelo Ministério da Saúde (6). O controle eficaz, no entanto, esbarra em diversas dificuldades operacionais, técnicas e financeiras.

Para o controle vetorial, recomenda-se o uso de inseticidas de ação residual (cipermetrina e deltametrina) no interior das casas e abrigos de animais. Essas ações de controle, são medidas de baixo impacto, e devem ser aplicadas em situações epidêmicas (6), de modo a baixar a densidade vetorial rapidamente, já que esta alternativa atingiria apenas a forma alada do vetor, não extinguindo os criadouros. Problemas orçamentários e escassez de recursos humanos adequadamente treinados são fatores que tornam essas ações freqüentemente descontínuas no Brasil, com reinfestação dos ambientes e ressurgimento de casos (14).

O baixo impacto das ações centradas no reservatório canino, como a remoção e eliminação de cães soropositivos, tem sido questionado por pesquisadores (135,136), sendo a ineficácia da medida isolada atribuída à demora entre o diagnóstico e a eliminação dos cães, à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos, à elevada incidência de infecção canina e à rápida substituição dos cães eliminados por outros já infectados (137,138).

O tratamento medicamentoso em cães é contra-indicado no país, pela baixa resposta terapêutica, recrudescência freqüente e risco de seleção de parasitas resistentes (6,13). O uso de coleiras impregnadas com deltametrina tem mostrado resultados promissores na proteção dos animais. No Brasil, um estudo demonstrou a eficácia da coleira em evitar a alimentação da *Lu. Longipalpis* em até 96% dos cães (139). No entanto, para a obtenção de um impacto epidemiológico na transmissão, uma alta taxa de cobertura com coleiras seria essencial, o que não só requer a reposição daquelas perdidas ou danificadas, mas também a colocação destas em novos cães que surgem na área, o que seria um desafio no Brasil, onde há elevadas taxas de rotatividade na população canina (140). A medida ainda não é recomendada pelo Ministério da Saúde (13).

Uma vacina composta pelo antígeno complexo glicoproteico Ligante de Fucose e Manose (FML) de *L. donovani* e o adjuvante saponina, (Leishmune®), desenvolvida por pesquisadores no Rio de Janeiro, teve seu uso avalizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento está sendo comercializada desde 2004, mas ainda não foi autorizada pelo Ministério da Saúde, enquanto estudos mais amplos não forem realizados. No entanto, um estudo recente demonstrou que a vacina induz anticorpos capazes de bloquear a transmissão tanto de *L. (L.) donovani* como de *L. (L.) chagasi* em cães vacinados, pois os anticorpos produzidos inibem a ligação de formas promastigotas pro-cíclicas no intestino do vetor *L. longipalpis*, impedindo sua evolução normal (141).

No Brasil, a capacitação de pessoal técnico e de profissionais de saúde para a realização de diagnóstico precoce e de tratamento adequado dos casos de leishmaniose visceral passou a ser incrementada desde 2001. O acesso ao tratamento continua garantido por meio da distribuição gratuita do antimônio nas unidades públicas de saúde. Novos avanços em termos de tratamento no país consistem no estabelecimento de critérios para a identificação de doentes graves, que requerem o uso de drogas mais

potentes, como a anfotericina B como primeira opção terapêutica, e, como já citado, o fornecimento de anfotericina B lipossomal em situações específicas (108).

O fato de que a recuperação de uma infecção causada por *Leishmania* confere imunidade à reinfecção, sugere que o controle das leishmanioses por meio de vacinação é possível. *L. major* autoclavada tem sido utilizada em muitos estudos (vacinas de primeira geração), mas atualmente vários outros antígenos têm sido identificados e caracterizados, que poderiam ser candidatos potenciais para vacinas de segunda geração (4,142), porém, até o momento, não há uma vacina humana eficaz ou recomendada para o controle (14).

### **3 . JUSTIFICATIVA**

Mato Grosso do Sul é conhecido pelas suas inusitadas belezas naturais, com destaque para o Pantanal e a Serra da Bodoquena, atraindo turistas do mundo todo. No entanto, não só a natureza privilegiada projeta-o no cenário nacional. O Estado também é alvo de uma das endemias de maior importância em saúde pública do país, a leishmaniose visceral, e não tem sido excluído do processo de expansão e urbanização da doença que vem ocorrendo em outras regiões brasileiras.

A notificação crescente de casos (83 em 2000, 287 em 2002, 351 em 2005, 245 até agosto de 2006), totalizando 1.795 registros, com 1.182 casos confirmados e 127 óbitos, exemplifica a seriedade da situação (143). Campo Grande continua vivenciando uma epidemia, havendo 31 notificações em 2002 e 240 em 2005. Até 2005, relata-se a ocorrência da doença em 34 dos 78 municípios do Estado (143).

Vários trabalhos têm sido realizados, estudando-se a fauna flebotomínea e os reservatórios animais (9, 16,17,24,144,145) mas, apesar do número crescente de casos em humanos, poucos estudos envolvendo pacientes com leishmaniose visceral têm sido descritos em nossa região (10). Na literatura nacional, há alguns relatos de LV em crianças (53-57), mas a maioria enfoca as características clínicas e epidemiológicas da doença; descrição detalhada de seu tratamento raramente é encontrada.

O atendimento de crianças com leishmaniose visceral no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU-UFMS), recebeu especial atenção a partir de 1986, com o início das atividades da Infectologia pediátrica. Com o aumento do número de casos, estabeleceu-se uma parceria com o setor de Parasitologia da Universidade, que investiu cada vez mais no aperfeiçoamento do diagnóstico.

Até 2001, antes da explosão de casos na capital Campo Grande, a maior parte dos pacientes provinha de cidades do interior do Estado. Com a ocorrência da epidemia na cidade, percebeu-se a rapidez da instalação dos quadros em crianças, cuja maioria apresentava, para um bom observador, dados muito chamativos de leishmaniose visceral (esplenomegalia expressiva e pancitopenia) em poucos dias de evolução, caráter diferente daquele em que a patologia costuma apresentar-se, com evolução arrastada e de longa duração.

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos casos são fatores fundamentais no controle da doença e constituem o pólo da prevenção pelo qual os

responsáveis são os profissionais de saúde. A presença de crianças com leishmaniose na Enfermaria de Pediatria passou a ser constante. Começamos a sentir a necessidade de conhecermos mais profundamente a patologia, principalmente porque o Hospital é um centro de referência para diagnóstico e tratamento da mesma.

Essa necessidade deu origem a um novo campo de pesquisa clínica. O primeiro passo seria conhecer as características da doença nas crianças. Deveríamos também verificar a sensibilidade dos métodos diagnósticos empregados no Hospital, o que não havia sido realizado antes, iniciando-se depois o estudo do tratamento.

Dispúnhamos de uma grande quantidade de material biológico estocado (lâminas de aspirado de medula óssea), que poderia ser estudado retrospectivamente. Começamos a pensar na possibilidade de avaliar-se a utilização de métodos mais modernos de diagnóstico, como os que empregam técnicas de biologia molecular, o que foi possível graças à parceria com um centro com larga tradição em pesquisa, a FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Foi o ponto de partida para a realização do presente trabalho.

## **4 . OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

- Estudar os casos de leishmaniose visceral em crianças atendidas no NHU-UFMS, num período de 7 anos (janeiro de 1998 a fevereiro de 2005).

### **4.2. Objetivos específicos**

- Descrever as características clínicas e laboratoriais das crianças sul-mato-grossenses com leishmaniose visceral atendidas no NHU-UFMS, caracterizando a forma de apresentação da doença nesses pacientes.
- Analisar os métodos convencionais de diagnóstico utilizados no Hospital, como a microscopia direta e a cultura de aspirado medular, e a sorologia por Imunofluorescência Indireta.
- Aprimorar as técnicas de diagnóstico da leishmaniose visceral, verificando a sensibilidade e a especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR), na identificação da presença de DNA de *Leishmania* em lâminas de aspirado medular, coradas por Giemsa e estocadas, comparando-as com os métodos convencionais de diagnóstico.
- Analisar os aspectos relacionados ao tratamento das crianças com leishmaniose visceral, descrevendo-se mais detalhadamente os esquemas terapêuticos utilizados, a ocorrência de efeitos adversos, a eficácia das drogas, as dificuldades e outros aspectos relacionados ao seu manejo.
- Descrever as características clínicas, laboratoriais e o esquema terapêutico de crianças que apresentaram recidiva da leishmaniose visceral após o primeiro curso de tratamento.



## **5 . CASUÍSTICA E MÉTODOS**

As casuísticas trabalhadas, bem como as metodologias empregadas, encontram-se descritas nos respectivos trabalhos, os quais são apresentados a seguir.

## **6 . RESULTADOS**

**6.1. Trabalho nº 1** - “LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO MATO GROSSO DO SUL, REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL: UMA DOENÇA DE EVOLUÇÃO RÁPIDA”. A ser submetido à publicação.

**6.2. Trabalho nº 2-** “COMPARISON OF CONVENTIONAL METHODS FOR DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN IN CENTER-WEST REGION OF BRAZIL”. Aceito para publicação pelo The Brazilian Journal of Infectious Diseases.

**6.3. Trabalho nº 3-** “SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF PCR IN GIEMSA-STAINED SLIDES FOR DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN.” A ser submetido à publicação.

**6.4. Trabalho nº 4-** “EXPERIÊNCIA HOSPITALAR NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL”. A ser submetido à publicação.

**6.5. Trabalho nº 5-** “UNSATISFACTORY RESPONSE IN THE TREATMENT OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZILIAN CHILDREN: THE PROBLEM OF RELAPSE.” A ser submetido à publicação.

## **TRABALHO Nº 1**

# **LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO MATO GROSSO DO SUL, REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL: UMA DOENÇA DE EVOLUÇÃO RÁPIDA**

LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO MATO GROSSO DO SUL,  
REGIÃO CENTRO- OESTE DO BRASIL: UMA DOENÇA DE EVOLUÇÃO  
RÁPIDA

Brustoloni YM, Cunha RV, Oliveira ALL, Dorval ME, Oshiro ET, Pontes ERJC

**Resumo**

A leishmaniose visceral, habitualmente insidiosa e de longa duração, vem apresentando uma evolução rápida em crianças no Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil, notando-se um curto período entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico. Cento e dezesseis crianças internadas para tratamento da doença em um hospital de referência, entre janeiro de 1998 e fevereiro de 2005, foram estudadas retrospectivamente. Os pacientes foram divididos em 2 grupos, de acordo com o tempo de duração da doença: com 30 dias ou menos de evolução (Grupo I) e com mais de 30 dias (Grupo II). Setenta por cento das crianças apresentavam quadro clínico sugestivo havia 1 mês ou menos, com média de aparecimento dos sintomas de 16 dias. Pacientes desse grupo já tinham esplenomegalia significativa à admissão: baço > 5 cm foi encontrado em mais de 80% e  $\geq 10$  cm em torno de 20% dos casos. Os parâmetros laboratoriais estavam precocemente alterados: anemia foi detectada em 93,8%, leucopenia em 83,9%, 90% tinham plaquetopenia e albumina menor que 2,5 g/dl foi encontrada em 30% dos casos. O comprometimento hepático foi freqüente e intenso em alguns casos, mesmo em fases precoces, sugerindo a necessidade de monitorização de aminotransferases desde o início, para uma tomada de conduta adequada. Em áreas de introdução recente da doença, o quadro clínico e laboratorial de instalação mais rápida possibilita uma suspeita diagnóstica mais precoce dos casos. O tratamento de pacientes em fase inicial, o combate sistemático aos processos infecciosos intercorrentes e o controle rigoroso das drogas utilizadas para tratamento resultaram em uma doença de baixa letalidade (2,6%).

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral, calazar, epidemiologia, aspectos clínicos, criança.

### **Abstract**

Visceral leishmaniasis, usually an insidious and long-lasting disease, has been showing a rapid evolution in children in Mato Grosso do Sul, Center-West region of Brazil, with a short interval between the onset of symptoms and diagnosis. One hundred and sixteen children admitted to a reference hospital from January 1998 to February 2005 for treatment of the disease were retrospectively studied. The patients were distributed into two groups, according to the duration of the disease: up to 30 days of evolution (Group I) or longer than 30 days (Group II). Seventy percent of them had exhibited signs and symptoms of visceral leishmaniasis for up to one month (mean time to appearance of symptoms: 16 days). Patients in Group I showed significant splenomegaly: spleen size was  $> 5$  cm in more than 80%, and  $\geq 10$  cm in around 20%. Laboratorial parameters were precociously altered: anemia was detected in 93.8%, leukopenia in 83.9%, thrombocytopenia in 90% and albumin value was  $< 2,5$  g/dl in 30% of cases. Hepatic involvement was frequent and intense in some cases, even in early stages, suggesting the need for monitoring aminotransferases since the initial management, to help to define an adequate choice of treatment. In areas of recent introduction of VL, the intensity of clinical and laboratory features makes possible an earlier diagnostic suspicion. Treating patients in an initial phase, systematic treatment of intercurrent infections and straight control of drugs used for therapy resulted in an illness of low lethality (2.6%).

**Keywords:** Visceral leishmaniasis, kala-azar, epidemiology, clinical aspects, children.

## **Introdução**

Apesar dos achados clássicos de febre prolongada, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, e hipergamaglobulinemia característicos da leishmaniose visceral (LV), algumas variações na apresentação clínica da mesma dentro do próprio território brasileiro têm sido descritas<sup>1-5</sup>. Habitualmente uma doença insidiosa, com tempo de evolução prolongado<sup>6,7</sup>, associada a estado nutricional deficitário em uma proporção significativa de pacientes<sup>1,8</sup>, há relatos de quadros de curta duração<sup>9</sup>, em indivíduos com graus nutricionais variados<sup>4</sup>, e com maior ou menor incidência de complicações, como infecção ou sangramento<sup>9,10</sup>.

O processo de difusão e urbanização da LV que vem ocorrendo em várias localidades brasileiras atingiu também a região Centro-Oeste do Brasil, principalmente Mato Grosso do Sul. Atualmente, a leishmaniose visceral encontra-se em franca expansão no Estado<sup>11</sup>, notando-se o aumento crescente do número de municípios acometidos sem notificação anterior de casos, exemplificando a instalação recente da doença<sup>12</sup>. Nos últimos 5 anos, dois focos epidêmicos foram registrados em cidades de expressivo adensamento populacional, como Três Lagoas e Campo Grande, a capital<sup>11,12</sup>. Apesar do aumento do número de casos, poucos trabalhos descrevendo pacientes com LV têm sido realizados na região<sup>11</sup>.

O objetivo deste estudo é analisar retrospectivamente as manifestações clínicas e laboratoriais de crianças com leishmaniose visceral internadas em um hospital universitário de referência, caracterizando sua forma de apresentação nesta região do Brasil, no momento atual, pois o conhecimento do modo de apresentação da doença em uma determinada localidade pode auxiliar na detecção diagnóstica precoce dos casos, contribuindo de maneira importante para seu controle.

## **Métodos**

O estudo foi baseado na análise retrospectiva de prontuários de crianças com leishmaniose visceral admitidas para tratamento no Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU-UFMS), no período de janeiro de 1998 a fevereiro de 2005. Foram incluídos 114 pacientes que apresentavam manifestações clínicas de LV, associadas à detecção de parasitas em aspirado medular (por meio de microscopia direta ou cultura), sorologia positiva por Imunofluorescência Indireta ( $\geq 1/40$  até 2003 e  $\geq 1/80$  daí em diante), ou que apresentaram DNA de *Leishmania* detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em lâminas de aspirado medular. Duas crianças que mostravam sintomatologia sugestiva, sem comprovação laboratorial da doença, mas com resposta terapêutica favorável ao tratamento antimonial, também participaram do estudo, totalizando 116 pacientes.

Um protocolo foi confeccionado, registrando-se dados como sexo, idade, procedência, tempo de duração da doença desde o aparecimento dos primeiros sintomas até a chegada ao serviço, sinais e sintomas, exame físico completo, incluindo peso, tamanho do fígado e do baço (medidos abaixo do rebordo costal, na linha hemiclavicular), testes diagnósticos, exames laboratoriais, coletados por ocasião da admissão hospitalar: hemograma completo, aspartato aminotransferase -AST- valor normal (VN) = 15 a 37 U/L, alanino aminotransferase -ALT- VN=30 a 65 U/L, uréia, creatinina, albumina, globulinas e amilase, e drogas utilizadas para o tratamento.

A microscopia direta de aspirado medular foi realizada em todos os 116 pacientes; a cultura (em meio de NNN) em 86, e a sorologia, em 79. A detecção de DNA de *Leishmania* em lâminas de aspirado medular, realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), cujo alvo de amplificação é a região conservada da molécula de mini-círculo (kDNA), foi obtida, quando possível, em pacientes com provas parasitológicas ou sorológicas negativas ou não realizadas. A identificação das espécies de *Leishmania*, isoladas em 12 amostras por cultura, foi feita pela técnica de eletroforese de enzimas, segundo protocolo previamente descrito<sup>13</sup>.

Para a interpretação dos dados, os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o tempo de duração (ou evolução) da doença: crianças com  $\leq 30$  dias de evolução (Grupo I) e com  $> 30$  dias (Grupo II).

Anemia foi definida como um valor de hemoglobina  $< 9$  g/dl; leucopenia, como leucócitos abaixo de  $5.000$  céls/mm<sup>3</sup>; plaquetopenia, como plaquetas abaixo de  $150.000$  céls/mm<sup>3</sup>; hipoalbuminemia, como albumina  $< 3,5$  g/dl e hiperglobulinemia, como globulina  $> 3,0$  g/dl.

A verificação dos percentis de peso, avaliados a partir do índice de peso para a idade, foi efetuada por meio de comparações com as curvas do *NCHS*, utilizando-se a rotina “Epinutre” do programa Epi-Info 6.01. Os programas Epi-Info 3.2.2 e Bioestat 3.0 foram empregados para a análise estatística. Os testes de Qui-quadrado e Fisher foram usados para a comparação de proporções e os testes *t* de Student ou de Mann Whitney, para a comparação de médias. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi adotado para representar um resultado estatisticamente significativo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.



## **Resultados**

Todas as 116 crianças que participaram da pesquisa eram procedentes do Estado de Mato Grosso do Sul. Dezesesseis municípios apresentaram registro de casos, e até antes do início do período do estudo, em treze deles não havia notificação anterior de leishmaniose visceral. Cinquenta e dois por cento das crianças internadas moravam em Campo Grande por ocasião do adoecimento. Três pacientes eram indígenas e um procedente de acampamento de “sem-terra”.

A febre foi o maior motivo de procura de atendimento médico por parte das mães ou responsáveis (80% dos casos) e o aumento do volume abdominal foi a segunda queixa mais freqüente (10%), sendo registrados também palidez (3,4%), dor abdominal (2,6%), emagrecimento (1,7%) e outras queixas (4%). A doença apresentou duração média de 1 mês e 17 dias e mediana de 21 dias. A idade média dos pacientes foi de 4 anos e dois meses.

Quando divididos em dois grupos, 70% das crianças pertenciam ao Grupo I (trinta dias ou menos de evolução), apresentando em média 16 dias (e mediana de 15 dias) de duração dos sintomas; destas, 61,7% referiam febre havia 15 dias ou menos. Trinta e cinco pacientes (30%) estavam doentes havia mais de 30 dias (Grupo II), com média de duração dos sintomas de 3,9 meses e mediana de 2 meses. Apenas 4 apresentavam tempo de evolução superior a 6 meses.

A Tabela 1 mostra as características clínicas das crianças com leishmaniose visceral, de acordo com o tempo de duração dos sintomas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o sexo ( $p=0,1239$ ) ou a média de idade ( $p=0,3734$ ) entre os grupos. A idade variou de 6 meses a 13 anos e 1 mês (média =  $4,4 \pm 3,2$  anos) em crianças do Grupo I e de 7 meses a 10 anos e 2 meses (média =  $3,9 \pm 2,8$ ) no Grupo II. A doença foi mais comum em menores de 5 anos (69,9%). Considerando-se a procedência, 90% e 74,2% dos pacientes dos Grupos I e II, respectivamente, eram de áreas onde a doença havia se instalado recentemente (a partir de 2001).

A avaliação dos percentis de peso no momento da admissão (Tabela 1) mostrou grande variação e não houve predomínio de crianças em situação de risco nutricional (com registro de peso para a idade inferior ao percentil 10) em pacientes doentes por 30 dias ou menos ou por mais de 30 dias ( $p=0,4176$ ).

A tabela 2 mostra as principais manifestações clínicas das crianças do estudo. Palidez ( $p=0,03$ ), perda de peso ( $p=0,04$ ), edema ( $p=0,04$ ), hemorragias ( $p=0,02$ ) e icterícia foram mais comuns em crianças com mais de 30 dias de evolução.

A presença de edema em pacientes doentes havia 30 dias ou menos foi registrada em torno de 7,4% dos casos. Formas hemorrágicas foram detectadas em 5 crianças, 4 delas com sangramentos importantes (hematêmese e melena = 2; sangramento gengival incoercível após extração dentária = 1; hematoma nos locais de punção = 1 epistaxe = 1). Icterícia não foi comum; ocorreu em apenas um caso com mais de 90 dias de sintomas e quadro clínico avançado, que acabou indo a óbito.

Crianças com maior tempo de evolução apresentavam baço ( $p= 0,0004$ ) e fígado ( $p= 0,0430$ ) de maiores proporções. A média do tamanho do baço foi igual a  $8,0 \pm 3,0$  cm (variando de 2 a 16cm) em pacientes no Grupo I, sendo que mais de 80 % destes já apresentavam baço com mais de 5cm à admissão e em torno de 20 %, este era igual ou maior que 10cm (Tabela 2). No grupo II, a média do tamanho do baço foi de  $10,2 \pm 2,9$ cm (variando de 6,0 a 18cm).

A média do tamanho do fígado foi igual a  $4,3 \pm 1,8$ cm (variando de impalpável a 10cm) em crianças no Grupo I e a  $5,2 \pm 1,9$  cm (variando de 2 a 10cm) nas do Grupo II; mais de 80 % já chegaram com fígado palpável a mais de 3 cm e aproximadamente 10% tinham fígado maior que 6cm (Tabela 2).

O comprometimento hematológico foi importante, com alterações já pronunciadas mesmo em pacientes com menos tempo de doença. No Grupo I, 93,8% apresentavam anemia, sendo que 59% já tinham hemoglobina  $\leq$  a 7,0 g/dl e apenas 3 pacientes apresentavam hemoglobina  $\geq$  10,0 g/dl (máximo: 10,9 g/dl); 83,9% mostravam leucopenia e 90 % apresentavam plaquetopenia (23% tinham plaquetas abaixo de 50.000). No grupo II, 91,7% apresentavam anemia (65,7% tinham hemoglobina  $\leq$  7,0 g/dl e o valor máximo encontrado foi igual a 9 g/dl); 71,4% apresentavam leucopenia e, excluindo-se uma criança em sepse com 20.300 leucócitos, o maior valor encontrado foi igual a 9.700 céls/mm<sup>3</sup>; em 82,8 % detectou-se plaquetopenia.

Os principais parâmetros laboratoriais de acordo com o tempo de duração da doença estão representados na Tabela 3. Não houve diferença entre as médias de hemoglobina, leucócitos, plaquetas, albumina, AST, ALT, uréia e creatinina; pacientes com mais de 30 dias de evolução apresentavam globulinas mais elevadas do que os com menos tempo de doença ( $p= 0,0105$ )

Hipoalbuminemia e hiperglobulinemia foram encontradas em porcentagem significativa já em doentes com menos de 30 dias de doença: 85,2 % apresentavam albumina  $\leq 3,5$  g/dL e níveis muito baixos ( $<2,5$  g/dl) foram encontrados em 30,9 %; 86,4% tinham globulina  $> 3,0$  g/dl e em torno de 40,7 % já mostravam globulina  $> 4,0$  g/dl. O comprometimento renal foi raro; apenas 2 crianças apresentaram níveis anormais de uréia, uma das quais evoluiu para óbito.

O acometimento hepático foi comum (Tabela 4). O aumento de AST variou de 2 a 25 vezes o limite superior do método e o de ALT, de 2 a 16 vezes. Níveis preocupantes (acima de 5 vezes o limite superior) foram detectados nos dois grupos. O paciente que apresentou dosagens mais elevadas (25 vezes para AST e 6 vezes para ALT) estava doente havia mais de 60 dias e evoluiu para o óbito, mas comprometimento hepático importante também foi encontrado em uma criança sem doença avançada, com níveis de AST 20 vezes e de ALT 16 vezes acima do limite superior do método.

Das 81 crianças do Grupo I, 70,3% tinham infecção comprovada ou suspeita por ocasião da admissão e 12,3% apresentaram complicações infecciosas durante a evolução da internação. Cerca de 70 processos infecciosos foram diagnosticados: pneumonia, 47 (67,1%); otite média aguda, 7 (10,0%); infecções bacterianas de pele, 3 (4,3%); febre sem foco, 2 (2,8%) e outros (1 episódio de cada): sinusite, mastoidite, estomatite, amigdalite, traqueobronquite, artrite séptica, abscesso dentário, adenite supurada, gastroenterite, herpes zoster, bacteremia por *Enterobacter*. Uma criança evoluiu com sepse.

No Grupo II, 71,4% dos pacientes foram considerados portadores de infecção à admissão e 22,8%, durante a evolução. Foram detectados em torno de 37 episódios infecciosos: pneumonia, 24 (64,8 %); otite média aguda, 6 (16,2 % ); infecções bacterianas de pele, 4 (10,8%), sinusite, 2 (5,4%), herpes zoster, 1 (2,7%). Três crianças evoluíram com sepse.

Oitenta por cento das crianças (93/116) receberam antibióticos, por ocasião da admissão ou durante a evolução.

Quanto ao diagnóstico, a microscopia direta de aspirado medular foi positiva em 81,5% e 88,6%, a cultura, em 57,4% e 68,0% e a sorologia, em 85,5% e 87,5%, nos Grupos I e II, respectivamente. Seis pacientes do grupo I apresentavam provas parasitológicas e/ou sorológicas negativas (ou não realizadas) por ocasião da admissão; PCR foi positiva nos 4 pacientes em que essa técnica foi realizada. Os dois únicos

pacientes do estudo sem confirmação laboratorial da doença apresentavam apenas mielograma negativo, sendo que a sorologia ou PCR não foram realizados. Portanto, o diagnóstico laboratorial foi realizado em 98,3% dos casos. Doze cepas isoladas por cultura foram identificadas como *Leishmania chagasi*.

O antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) foi a primeira opção terapêutica em 111 casos (95,6%); 3 foram tratados com anfotericina B convencional e 2 com anfotericina B dispersão coloidal (Amphocil®).

O controle do tratamento foi rigoroso, incluindo coletas semanais (ou em menor período, quando necessário) de exames hematológicos e bioquímicos (aminotransferases, amilase, uréia, creatinina, proteínas séricas) e eletrocardiogramas. Apenas 3 dos 116 pacientes (2,6%) evoluíram para óbito; todos chegaram ao serviço com doença avançada (um com evolução em torno de 60 dias e dois com 90 dias de doença), por diagnóstico tardio. Infecção bacteriana e sepse foi diagnosticada nos 3 casos. Uma criança evoluiu com insuficiência hepática e insuficiência renal aguda; hemorragias ocorreram nos 3 casos.

## **Discussão**

O número de municípios com registro de casos novos relatados neste estudo confirma que a LV, a exemplo de outras localidades brasileiras, é uma doença em expansão em Mato Grosso do Sul. A possibilidade de acometimento de populações tipicamente encontradas no Estado, como a de indígenas e a de acampados, sujeitas a fatores de risco importantes para o desenvolvimento da doença, como desnutrição e pobreza, é motivo de preocupação.

A distribuição das crianças em dois grupos, de acordo com o tempo de duração dos sintomas até o diagnóstico, foi realizada devido à constatação da chegada ao serviço de um grande número de casos com um curto período de evolução; por outro lado, a LV é reconhecidamente uma patologia que se caracteriza por uma evolução prolongada, situação muitas vezes favorecida por atraso de diagnóstico, havendo necessidade de separação dos casos para uma melhor análise dos mesmos.

Verificou-se que 70% das crianças atendidas desenvolveram uma forma de doença de instalação rápida, que permitiu a suspeita diagnóstica em um período igual ou inferior a um mês, com um tempo médio de duração da doença desde o início dos sintomas até o diagnóstico em torno de 15 dias.

Pedrosa & Rocha (2004)<sup>3</sup> e Campos Jr (1995)<sup>1</sup> relataram um número bem menor de doentes, a maioria nordestinos, com evolução  $\leq 30$  dias: 22,4% e cerca de 35%, respectivamente. Na descrição de 530 pacientes de Alagoas, os primeiros autores relatam a existência de casos de evolução lenta e prolongada, com 76 (14,4%) pacientes com doença de duração acima de 6 meses. Dos 116 pacientes estudados, apenas 4 (3,4%) relatavam doença de mais de 6 meses de evolução, o que demonstra que, em nossa região, no que diz respeito ao tempo de evolução, a LV vem se expressando de maneira diferente daquela classicamente descrita<sup>14</sup>, caracterizada por quadro clínico arrastado, comumente apresentado por pacientes em áreas endêmicas do Nordeste.

As manifestações clínicas apresentadas pelas crianças do estudo não diferiram das classicamente relatadas na literatura, mas a velocidade de instalação e intensidade dessas manifestações foram maiores do que as comumente encontradas na doença clássica. Segundo a descrição desta<sup>14</sup>, “a leishmaniose visceral apresenta um período inicial, em torno de 30 dias, com sintomatologia e alterações laboratoriais pouco pronunciadas, como um baço de pequeno tamanho (geralmente não ultrapassando 5cm), anemia, na maioria das vezes pouco expressiva (com hemoglobina acima de 9g/dl),

contagem de leucócitos sem alterações significativas, e plaquetas normais ou pouco alteradas”.

Nossas crianças apresentaram alterações muito mais acentuadas do que as acima descritas, em igual período de evolução: baço maior que 5cm foi encontrado em mais de 80% dos casos, hemoglobina <9 g/dl foi constatada em mais de 90%, mais de 80% mostravam leucopenia, 90% já apresentavam plaquetopenia e 85% mostravam hipoalbuminemia, com 30% dos pacientes apresentando níveis de albumina muito baixos (<2,5g/dl). Este fato provavelmente relaciona-se ao caráter epidêmico da LV na região, com o acometimento de um número elevado de indivíduos imunologicamente despreparados, pois na maioria das cidades onde esta ocorreu, sua implantação era recente. Em relação ao tempo de duração da doença, este é menor em áreas não endêmicas<sup>15</sup>; provavelmente, a instalação do quadro clínico e laboratorial seja também mais rápida, mas esse aspecto é pouco abordado na literatura.

Doença de curta duração entre o início dos sintomas até o diagnóstico tem sido evidenciada em crianças em países do Mediterrâneo, onde a doença é endêmica. Maltezou et al (2000)<sup>16</sup> relatam um tempo médio de aparecimento dos sintomas de 10 dias em crianças gregas, com 80% dos casos apresentando sintomatologia por menos de 1 mês; Cascio et al (2002)<sup>17</sup> descrevem 15 dias de evolução em crianças italianas. Esses dados são muito semelhantes aos apresentados pelos pacientes do Grupo I, o que sugere que a doença é mais curta em crianças, mesmo fora dos períodos epidêmicos.

Vários estudos relatam maior número de pacientes desnutridos em suas casuísticas<sup>1,5,6,9</sup>, atingindo níveis em torno de 60% ou mais de crianças abaixo do percentil 10 de peso em relação à idade<sup>1,2</sup>. A leishmaniose visceral, antes uma doença caracteristicamente rural e associada a condições precárias de vida, encontra agora nas cidades condições favoráveis ao seu estabelecimento e desenvolvimento, acometendo pessoas independentemente de seu nível sócio-econômico ou cultural<sup>11</sup>, ou de seu estado nutricional, como demonstrado neste trabalho.

A esplenomegalia é uma característica marcante da leishmaniose visceral; a febre é o sintoma que mais traz o paciente ao médico, mas a esplenomegalia é o dado que mais sugere o diagnóstico<sup>18</sup>. Na infância, a massa muscular da parede abdominal é pouco desenvolvida, o que torna a palpação esplênica mais fácil do que no adulto. Crianças com poucos dias de febre apresentavam baços de dimensões aumentadas na admissão, detectados quando cuidadosamente pesquisados; entretanto, encontramos muitos casos com mais de um mês de evolução e com esplenomegalia facilmente

demonstrada, mas que não havia sido diagnosticada em visitas anteriores a unidades de saúde. Isso demonstra a necessidade de uma maior valorização da palpação abdominal no exame físico por parte dos profissionais de saúde.

A dosagem de aminotransferases não tem sido sistematicamente relatada em estudos brasileiros de crianças com leishmaniose visceral. Níveis elevados destas foram citados em pacientes de várias idades em Natal<sup>19</sup>. As enzimas hepáticas geralmente estão aumentadas 2 a 3 vezes os valores normais<sup>14,20</sup>, fato comprovado em nosso estudo. Acometimento hepático às vezes severo pode ser evidenciado na LV<sup>21</sup>, geralmente quando há a doença mais avançada<sup>4</sup>. Detectamos a existência de doentes aparentemente sem sinais de gravidade e em período inicial, porém com níveis elevados de aminotransferases, o que reforça a necessidade da monitorização das enzimas hepáticas desde antes do início do tratamento. Geralmente, os antimoniais constituem a primeira opção terapêutica na LV, mas a reconhecida hepatotoxicidade dessas drogas indica a necessidade de tratamento alternativo em pacientes com comprometimento hepático prévio muito intenso<sup>22</sup>.

A freqüência dos processos infecciosos relatados reflete a maior susceptibilidade da criança à infecções<sup>10,23,24,25</sup>. Pneumonia foi a infecção mais encontrada, como freqüentemente descrito<sup>1,2,6,10</sup>. Muitas vezes, no entanto, a diferenciação entre o comprometimento pulmonar próprio da doença<sup>26</sup> e a infecção bacteriana secundária foi difícil. O fato de a LV ser caracterizada por febre prolongada, tosse e predisposição à infecção secundária pode ter feito com que o diagnóstico de pneumonia tenha sido superestimado, elevando impropriamente o número de processos infecciosos bacterianos. No entanto, o uso freqüente de antibióticos (80% do total de crianças), foi um dos fatores que provavelmente contribuíram para a sua baixa letalidade, já que a presença de infecção tem sido relacionada à evolução insatisfatória, havendo inclusive sugestão de quimioprofilaxia antimicrobiana em crianças pequenas com leishmaniose<sup>27</sup>.

Em Mato Grosso do Sul, a leishmaniose visceral tem se apresentado como uma doença de evolução rápida, com alterações clínicas e laboratoriais exuberantes em fase precoce da doença, acometendo crianças independentemente de seu estado nutricional, o que expressa a atual situação epidêmica vivenciada na região. Os profissionais de saúde locais devem estar atentos para essa característica, já que a suposição diagnóstica precoce devido ao quadro clínico exuberante, o tratamento de pacientes em fase evolutiva não muito adiantada, o emprego freqüente de antibióticos e a monitorização

rigorosa das drogas utilizadas para tratamento têm resultado em uma doença de baixa letalidade.



## Referências

1. Campos Jr, D. Características clínico-epidemiológicas do Calazar na criança. Estudo de 75 casos. *J Pediatr (Rio J)* 1995; 71:261-5.
2. Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78:120-7.
3. Pedrosa CM, da Rocha EM. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37(4):300-4.
4. Queiroz MJ, Alves JG, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico- epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80:141-6.
5. Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AAM. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81: 73-84.
6. Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1990; 162:1354-9.
7. Silva AR, Viana GMC, Varonil C, Pires B, Nascimento MDSD, Costa JML. Leishmaniose visceral (calazar) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30: 359-368.
8. Cerf B, Jones TC, Badaró R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1987; 156:1030-3.
9. Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986; 154:639-49.
10. Guerreiro J, Ribeiro S, Carvalho EM, Badaró R, Rocha H. Bacterial infection in patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80: 447-52.
11. Oliveira ALL. Estudos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2000-2005. Rio de Janeiro; 2006. Doutorado [Medicina Tropical]. Instituto Oswaldo Cruz.
12. Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso do Sul. Sinan. Sistema de Informações de Agravos de Notificação Boletim interno. 2006.
13. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 296- 311.

14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120 p.
15. Chandra J, Anand V, Patwari AK, Mandal RN, Aneja S, Sharma D. Kala-azar: experience from a non-endemic area in India. *J Trop Pediatr* 1995; 41(5):298-300.
16. Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, Spyridis P, Stavrinadis C, Karpathios T, et al. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1139-43.
17. Cascio A, Colomba C, Antinori S, Orobello M, Paterson D, Titone L. Pediatric visceral leishmaniasis in Western Sicily, Italy: a retrospective analysis of 111 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002. 21(4):277-82.
18. Prata A, Silva LA. Calazar. In: Coura JR editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 713-737.
19. Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88:386-8.
20. Minodier P, Piarroux R, Garnier JM, Unal D, Perrimond H, Dumon H. Pediatric visceral leishmaniasis in southern France. *Pediatr Infect Dis J*. 1998; 17:701-4.
21. Khaldi F, Bennaceur B, Ben Othman H, Achouri E, Ayachi R, Regaieg R. Les formes sévères d'atteinte hépatique au cours de la leishmaniose viscérale. A propos de 7 cas. *Arch Fr Pediatr* 1990; 47:257-60.
22. Hepburn NC, Siddique I, Howie AF, Beckett GJ, Hayes PC. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(4):453-5.
23. Caldas AJ, Costa J, Aquino D, Silva AA, Barral-Netto M, Barral A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? *Acta Trop* 2006; 97(3):252-8.
24. Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003; 49:31-8.
25. Kafetzis DA, Velissariou IM, Stabouli S, Mavrikou M, Delis D, Liapi G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:26-30.
26. Costa NSS, Cerri GG. Alterações pulmonares intersticiais na leishmaniose visceral: avaliação pela tomografia computadorizada de alta resolução. *Radiol Bras* 1999; 32:159-167.

27. Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL et al. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 629-633.

### Tabelas

Tabela 1. Características clínicas de 116 crianças com leishmaniose visceral, de acordo com o tempo de duração da doença, NHU-UFMS, 1998 – 2005

Características clínicas	Tempo de duração (dias)						p
	≤ 30		>30		TOTAL		
	Grupo I (n=81)		Grupo II (n=35)		(n=116)		
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	
Sexo							0,123
Feminino	36	44,4	21	60,0	57	49,1	
Masculino	45	55,6	14	40,0	59	50,9	
Distribuição etária (anos)							
<1	12	14,8	2	5,7	14	12,0	0,22
1 a 5	42	51,8	25	71,4	67	57,9	<b>0,05</b>
6 a 10	21	25,9	6	17,1	27	23,2	0,30
>10	6	7,4	2	5,7	8	6,9	1,00
Percentis de peso							
<3	11	13,6	7	20,0	18	15,5	0,38
3 a 10	9	11,1	1	2,9	10	8,6	0,27
10 a 25	15	18,5	8	22,8	23	19,8	0,59
25 a 50	22	27,1	4	11,4	26	22,4	0,06
>50	24	29,7	15	42,9	39	33,7	0,16

NOTA: se  $p \leq 0,05$ : diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2 – Manifestações clínicas de 116 crianças com leishmaniose visceral segundo o tempo de duração da doença, NHU-UFMS, 1998 – 2005.

Manifestações clínicas	Tempo de evolução (dias)						<i>p</i>
	≤ 30		>30		Total		
	Grupo I		Grupo II		Total		
	(n=81)		(n=35)		(n=116)		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Febre	80	98,8	34	97,1	114	98,2	0,51
Baço < 5cm	10	12,3	0	0,0	10	8,6	
Baço 5-10cm	55	67,9	24	68,5	79	68,1	
Baço > 10cm	16	19,7	11	31,4	27	23,2	
Fígado < 3cm	14	17,2	3	8,5	17	14,6	
Fígado 3-6cm	59	72,9	25	71,4	84	72,4	
Fígado > 6cm	8	9,9	7	20,0	15	13,0	
Palidez	60	74,1	32	91,4	92	79,3	<b>0,03</b>
Perda de peso	47	58,0	27	77,1	74	63,8	<b>0,04</b>
Tosse	40	49,4	19	54,3	59	50,9	0,62
Diarréia	18	22,2	8	22,8	26	22,4	0,94
Edemas	6	7,4	7	20,0	13	11,2	<b>0,04</b>
Hemorragias	5	6,2	8	22,9	12	11,2	<b>0,02</b>
Icterícia	0	0,0	1	2,8	1	0,8	

NOTA: se  $p \leq 0,05$ : diferença estatisticamente significativa.

Tabela 3. Características laboratoriais de 116 crianças com leishmaniose visceral segundo o tempo de duração da doença, NHU-UFMS, 1998 – 2005.

Exames laboratoriais	Média	Tempo de evolução (dias)					p
		≤ 30 Menor valor	Maior valor	>30 Média	Menor valor	Maior valor	
(g/dl)							
Hemoglobina	6,9±1,4	4,3	10,9	6,7±1,2	4,0	9,0	0,4449 <sup>(1)</sup>
(cél/mm <sup>3</sup> )							
Leucócitos	3.578±1.433	1.000	8.300	4.700±	1.300	20.300	0,0517 <sup>(1)</sup>
Plaquetas	83.873±44.34	13.000	192.000	98.000±59.2	2.000	259.000	0,2192 <sup>(1)</sup>
(g/dl)							
Albumina	2,8±0,6	1,4	4,1	2,6±0,7	0,7	4,1	0,2919 <sup>(2)</sup>
Globulinas	4,1±1,1	2,1	7,3	5,2±2,1	2,1	10,7	<b>0,0105</b> <sup>(1)</sup>
(U/L)							
AST	102,8±121,2	16	913	107,7±198,7	13	1.170	0,1161 <sup>(1)</sup>
ALT	58,9±88,7	30	776	59,9± 60,6	4,7	286	0,6340 <sup>(1)</sup>
(mg%)							
Uréia	21±10,8	10,0	88,0	22,8±8,6	8,0	56,0	0,1231 <sup>(1)</sup>
Creatinina	0,6±0,2	0,2	1,4	0,6±0,1	0,3	0,8	0,3847 <sup>(1)</sup>

NOTA: se  $p \leq 0,05$ : diferença estatisticamente significativa.

<sup>(1)</sup> Teste Mann Whitney <sup>(2)</sup> Teste t

Tabela 4. Níveis de aminotransferases em 116 crianças com leishmaniose visceral, segundo o tempo de duração da doença, NHU-UFMS, 1998 – 2005.

Aminotransferases	Tempo de evolução (dias)					
	≤ 30		>30		Total	
	Grupo I		Grupo II		Total	
	(n=81)		(n=35)		(n=116)	
	n	%	n	%	N	%
<b>Aspartato aminotransferase (AST)</b>						
Exames com níveis elevados	53	65,4	20	57,1	73	62,9
Níveis de elevação *						
2 a 3 x	40	75,5	15	75,0	55	75,3
4 - 5 x	8	15,5	2	10,0	10	13,7
> 5 x	5	9,4	3	15,0	8	11,0
<b>Alanino aminotransferase (ALT)</b>						
Exames com níveis elevados	27	33,3	10	28,6	37	31,9
Níveis de elevação *						
2 a 3 x	23	85,2	6	60,0	29	78,4
4 - 5 x	3	11,1	3	30,0	6	16,2
> 5 x	1	3,7	1	10,0	2	5,4

\* em relação ao limite superior do método

## **TRABALHO Nº 2**

### **COMPARISON OF CONVENTIONAL METHODS FOR DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN IN THE CENTER-WEST REGION OF BRAZIL**



COMPARISON OF CONVENTIONAL METHODS FOR DIAGNOSIS OF  
VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN IN THE CENTER-WEST REGION  
OF BRAZIL

Yvone M. Brustoloni, Rivaldo V. Cunha, Maria Elizabeth Dorval, Elisa T. Oshiro,  
Elenir R.J.C. Pontes, Ana Lúcia L. Oliveira, Lilian Hillebrand, Luis Felipe Ribeiro

**Abstract**

In Brazil, sophisticated techniques currently employed for diagnosis of visceral leishmaniasis, such as polymerase chain reaction–based assays, are only available in major research centers, whereas conventional methods are still used in many areas where the disease occurs. In the state of Mato Grosso do Sul, in the country’s Center-West Region, visceral leishmaniasis has recently emerged in many cities, and duration of the disease, from the onset of symptoms to diagnosis, has been short. Considering that diagnostic tests may depend on the phase of the disease, we compared direct examination of bone marrow aspirates (BMAs), BMA culture, and serology by Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for diagnosis in children, according to time of evolution ( $\leq 30$  days or  $>30$  days) and spleen size ( $\leq 5$  cm or  $> 5$  cm) at admission. Duration of the illness did not interfere with test positivity: direct smear examination and IFAT were positive in more than 80% of patients, as was culture in around 60%. Results of positive microscopy, however, were predominant in patients with larger spleens. Thanks to the association of traditional techniques, only a few patients had to begin a treatment trial without their disease being confirmed. Conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis are still indispensable in our region, and the provision of professional training in basic techniques should be incremented. The highest sensitivity in laboratory diagnosis among the cases investigated was that obtained with a combination of BMA direct examination and IFAT, nearing 100%.

**Keywords:** visceral leishmaniasis, kala-azar, diagnosis, direct microscopy, immunological tests

## **Introduction**

Visceral leishmaniasis, or kala-azar, is a serious health problem in Brazil [1] and in many countries around the world [2]. Accurate diagnosis is an important tool in the control of the disease, regardless of geographical location. In recent years, sensitive and specific tests, as those based on molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) have been used to detect DNA of *Leishmania* in a variety of clinical samples [3-8]. Although these techniques constitute a promising advance for the diagnosis of visceral leishmaniasis, they are usually sophisticated and are not available in many places where laboratory facilities are limited.

In the state of Mato Grosso do Sul, situated in the Brazilian Center-West Region, diagnosis is still based on the use of conventional methods, such as the demonstration of parasites in stained slides or cultures of bone marrow aspirate (BMA) and the detection of antibodies in sera by the Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) in patients with a suggestive clinical picture of visceral leishmaniasis. In this study, we analyzed the results of these techniques and compared them with the duration of the disease and to spleen size in children admitted to a reference hospital for treatment of visceral leishmaniasis. In addition, we attempted to identify the best combination of tests for diagnosis in this region of Brazil.

## **Materials and Methods**

From January 1998 to February 2005, 116 children living in Mato Grosso do Sul were admitted to a reference hospital (NHU-UFMS) in Campo Grande, the state's capital city, presenting with manifestations compatible with visceral leishmaniasis (fever, hepatosplenomegaly, pancytopenia, hypergammaglobulinemia). BMAs were collected from all children by sternal puncture or, more rarely, from the iliac crest; BMA cultures were performed for 86 cases and IFAT for 79. When possible, BMA inoculation in hamster was obtained. Duration of the illness ( $\leq 30$  and  $> 30$  days) and spleen size on admission ( $\leq 5$  cm and  $> 5$  cm, measured from the lowest left rib to the distal edge of the organ) were recorded and crossed with the tests results. Sixty five patients were submitted to all three diagnostic procedures, and the combination of the methods in these children was analyzed.

Direct examination (BMA microscopy): Amastigotes were detected by microscopic examination of Giemsa-stained slides. Four slides from each patient were analyzed with a 10 $\times$  eyepiece and a 100 $\times$  oil objective. The entire smear was examined (more than 1000 microscopic fields) before a negative result was assigned.

Culture: BMAs were cultured in Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) with Schneider's insect medium supplemented with 20% fetal calf serum, incubated at 24 °C and weekly examined by microscopy for the presence of the parasite until, eight weeks.

Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT): Performed with a commercial kit (Fiocruz-Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro), using promastigotes as antigen. Titers  $\geq 1:40$  were considered positive.

Statistics: Fisher's exact and  $\chi^2$  tests were used to compare proportions. Statistical significance was defined as  $p \leq 0.05$ .

Ethical issues: Approval to conduct the study was obtained from the Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul.

## **Results**

Of the 116 children with suspected visceral leishmaniasis on admission, 83.6% ( $n = 97$ ) had parasites detected by BMA direct examination. IFAT showed a positivity of 86.1% (68/79). BMA culture was the least sensitive method, confirming diagnosis in just 60.5% (52/86) of the samples tested.

In most patients referred from other hospitals for diagnosis confirmation and treatment, only direct microscopy had already been tried, and serology had been requested in a few cases.

As many as 70% of the children exhibited suggestive signs and symptoms for 30 days or less, and in 30% the disease was diagnosed after 30 days. Table 1 shows the positivity of each method, according to the duration of the disease. No statistically significant difference was found when cases with shorter ( $\leq 30$ -day) or longer ( $> 30$ -day) duration of the disease were compared for the three tests (direct microscopy,  $p = 0.344$ ; culture,  $p = 0.360$ ; IFAT,  $p = 1.000$ ).

Spleen size larger than 5 cm on admission was found in 86.2% of the patients (100/116); 13.8% (16/116) had 5 cm or less. BMA direct microscopy showed a greater number of positive results when spleen size was larger than 5 cm ( $p = 0,024$ ) (Table 2). No statistically significant difference was found between spleen sizes regarding the results of culture ( $p = 1.000$ ) or IFAT ( $p = 1.000$ ).

It was not possible to submit all the 116 children to the three diagnostic methods. This was possible in 65 of them. Had direct microscopy or serology been used separately, as many as 15.4% of the patients would not have been diagnosed. If direct microscopy and culture were employed in association (without IFAT), 13.8% cases would remain without etiologic confirmation. If direct microscopy and serology (or all three methods) had been combined, only one patient (1.5%) would remain without diagnostic confirmation at the time of admission; this child had parasites detected by hamster inoculation five months later. This emphasizes the importance of associating serology and BMA direct microscopy in order to reach higher positivity rates in diagnosis.

## **Discussion**

An epidemic wave of visceral leishmaniasis has been triggered in the state of Mato Grosso do Sul, and children have been exhibiting an illness of short duration, from onset of symptoms to diagnosis, so that most cases are seen at the hospital when clinical and laboratory features are already striking. We thus chose to compare the positivity of conventional methods in the diagnosis of cases exhibiting these characteristics.

Demonstration of amastigotes in bone marrow smears ranges from 60% to 85% [9]. Brazilian researchers have reported rates from 69.3% to 81.2% in pediatric patients [9-14]. However, some factors interfere with the positivity rates of the method. Bone marrow aspiration should be carried out by trained individuals, and performance of a correct technical procedure is vital to its sensitivity [15], since inadequate aspiration may provide insufficient or inadequate material (peripheral blood). Expertise of the microscopist, number of fields analyzed, and time spent to examine smears are other significant aspects [16]. Sensitivity is decreased when BMAs are quickly examined, but, when they are examined for appropriate lengths of time, examination can achieve a sensitivity level close to that of spleen aspirates (> 95%) [16].

Finally, parasite tissue burden is another important aspect. In our study, although parasites were scarce in the early phases of the disease, the expertise and persistence of the microscopist allowed positive results to be achieved; some smears in fact required inspection of a large number of fields, and parasite numbers, in some cases, were as low as one or two in the entire slide. Therefore, parasite tissue burden is another factor influencing the positivity of direct microscopy; in visceral leishmaniasis, a cytokine mediated cell-type response defines patients as scarcely, moderately, or heavily parasitized [17].

Spleen size larger than 5 cm on admission was associated with a greater number of positive results by direct microscopy. On the other hand, when spleen size is small ( $\leq$  5 cm), IFAT may be a better alternative for diagnosis.

Although culture was the least sensitive method in the study (60.5%), the sensitivity of culture may vary from 40% to 50% when BMAs are used, and from 70% to 98% with the use of splenic aspirates [17]. The main difficulty with cultures is the

high contamination rate in the early stages [18, 19]. Moreover, culture-based diagnosis is too slow for the purpose of beginning treatment.

A wide range of serological methods is available for diagnosis of visceral leishmaniasis [18, 19]. Among the several serological techniques employed, Indirect Immunofluorescence is one of the most widely used in Brazil [1]. ELISA is a more sensitive test [2] and may use highly sensitive recombinant antigens such as rK39 [19]; the direct agglutination test (DAT) is simple, cheap, and highly specific and sensitive, but commercial kits for IFAT are supplied without cost by the Brazilian Ministry of Health. Change of the antigens used in serological methods can improve sensitivity and eliminate false-positive results [20]. Perhaps the use of an antigen based on a regional strain of *Leishmania* may provide better results.

In the present study, IFAT was highly sensitive and was found to be a suitable alternative to parasite detection in the conclusive diagnosis of visceral leishmaniasis in pediatric patients when strong clinical suspicion is present, although in our setting parasite detection is favored by health professionals. In fact, the least requested method for diagnosis was serology.

Molecular techniques such as those based on PCR have been compared with traditional methods, with promising results [21]. The present study showed that the association of microscopy and serology can provide diagnosis in 98.5% of cases. Considering that the majority of cases of visceral leishmaniasis occur in poor and suburban areas of the countries where it is prevalent [2] and where laboratory resources are probably scarce, conventional methods for diagnosis of the disease are still indispensable, and the provision of professional training in basic techniques should be incremented.

No currently available method for visceral leishmaniasis diagnosis exhibits all the desirable characteristics of high sensitivity and specificity, in addition to ease of use and low cost. We conclude that the use of more than one conventional technique in the diagnosis of visceral leishmaniasis in children is recommended in our region while a single sensitive, specific, less invasive method is not available. Using BMA direct examination and IFAT, confirmation of the disease might be possible in nearly 100% of cases.

### **Acknowledgments**

Thanks are given to the staff of the laboratories of Parasitology (Geucira Cristaldo and Zélia Soares da Silva) and Immunology (Dr. Iza K.H. Akamine and Carla Roseli dos Santos) of UFMS, and of the Central Laboratory of Public Health (LAC), especially to Ruth F. F. da Silva.

## References

1. Gontijo C. M. F., Melo M. N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras epidemiol* **2004**; 7: 338-49.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2004**; 27:305-18.
3. Osman O.F., Oskam L., Zijlstra E.E., et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* **1997**; 35:2454-7.
4. Lachaud L., Dereure J., Chabbert E., et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* **2000**; 38:236-40.
5. Salotra P., Sreenivas G., Pogue G.P., et al. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post- kala-azar dermal leishmaniasis. *J Clin Microbiol* **2001**; 39:849-54.
6. Cortes S., Rolão N., Ramada J., et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers . *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2004**; 98:12-7.
7. De Doncker S., Hutse V., Abdellati S., et al. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans R Soc Trop Méd Hyg* **2005**; 99:25- 31.
8. da Silva E.S.; Gontijo C.M., Pacheco R. da S., et al. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol Res* **2004**; 3:251-7
9. Sundar S. Indian kala-azar: better tools needed for diagnosis and treatment. *J Postgrad Med* **2003**; 49:29-30.
10. Campos Jr D. Características clínico-epidemiológicas do Calazar na criança. Estudo de 75 casos. *J Pediatr (Rio J)* **1995**; 71:261-5.
11. Rey L.C., Martins C.V., Ribeiro H.B., et al . American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. *J Pediatr (Rio J)* **2005**; 81: 73-84.



12. Queiroz M.J., Alves J.G., Correia J.B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr (Rio J)* **2004**; 80:141-6.
13. Pastorino A.C., Jacob C.M., Oselka G.W., Carneiro-Sampaio M. M. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr (Rio J)* **2002**; 78:120-7.
14. Pedrosa C.M., da Rocha E.M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* **2004**; 37(4):300-4.
15. Bain B. J. Bone marrow aspiration. *J Clin Pathol* **2001**; 54: 657-663.
16. da Silva M.R., Stewart J. M., Costa C.H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **2005**; 72: 811-4.
17. Murray H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int J Infect Dis* **2000**; 4:158-77.
18. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* **2006**;123(3):311-30.
19. Singh S., Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med.* **2003**; 49(1):55-60.
20. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* **1995**; 21:123-52.
21. Gatti S., Gramegna M., Klersy C., et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: the sensitivities and specificities of traditional methods and a nested PCR assay. *Ann Trop Med Parasitol* **2004**; 98: 667-76.

## Tables

Table 1. Positivity of three conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children, by duration of the disease. NHU-UFMS, Campo Grande, MS, Brazil, 1998-2005.

Duration of the disease (days )	BMA microscopy * (Positive/total tested)	BMA culture** (Positive/total tested)	IFAT*** (Positive/total tested)
≤ 30	66/81 (81.5%)	35/61 (57.4%)	47/55 (85.5%)
> 30	31/35 (88.6%)	17/25 (68.0%)	21/24 (87.5%)
Total	97/116 (83.6%)	52/86 (60.5%)	68/79 (86.1%)
	* $p = 0.344$ ( $\chi^2$ test)	** $p = 0.360$ ( $\chi^2$ test)	*** $p = 1.000$ (Fisher's exact test)

Table 2. Positivity of three conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children, by spleen size on admission. NHU-UFMS, Campo Grande, MS, Brazil, 1998-2005.

Spleen size (cm)	BMA microscopy *	BMA culture**	IFAT***
	(Positive/total tested)	(Positive/total tested)	(Positive/total tested)
≤ 5	10/16 (62.5%)	6/10 (60.0%)	7/8 (87.5%)
> 5	87/100 (87.0%)	46/76 (60.5%)	61/71 (85.9%)
Total	97/116 (83.6%)	52/86 (60.5%)	68/79 (86.1%)

\**p* = 0.024 (Fisher's exact test)      \*\**p* = 1.000 (Fisher's exact test)      \*\*\**p* = 1.000 (Fisher's exact test)

## **TRABALHO NÚMERO 3**

**SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF PCR IN GIEMSA-STAINED SLIDES  
FOR DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN**

SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF PCR IN GIEMSA-STAINED SLIDES FOR  
DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN

Brustoloni YM<sup>1</sup>, Pirmez C<sup>2</sup>, Cunha RV<sup>3</sup>, Dorval ME<sup>4</sup>, Oshiro ET<sup>4</sup>, Oliveira ALL<sup>1</sup>,  
Lima RB<sup>2</sup>

1. Department of Pediatrics\*

2. Department of Biochemist and Molecular Biology\*\*

3. Department of Medicine \*

4. Department of Patology\*

\* Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil

\*\* Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

### **Abstract**

Identification of the causal agent of human leishmaniasis by conventional methods is difficult even in a well-equipped hospital, and improved methods of diagnosis, such as PCR-based approaches, are now being used. DNA *Leishmania* can be searched in diverse biological samples (bone marrow, blood, spleen, lymph nodes) and materials (bone marrow or blood spotted on filter paper, Giemsa-stained slides, paraffin-embedded tissues). A total of 170 specimens of archived Giemsa-stained bone marrow slides from patients with visceral leishmaniasis or from controls with other diseases or conditions were studied by PCR, targeting the conserved region of the minicircle molecule. The method showed good sensitivity (92.3%) and specificity (97.5%), as well as positive (98.8%) and negative (91.7%) predictive values. When compared with conventional methods, PCR was more sensitive than direct examination (79.1%) or culture (59%). In addition, the method detected visceral leishmaniasis in 16 of 19 patients (84.2%) with negative microscopy and in 4 of 7 (57%) with negative direct microscopy and culture. PCR in Giemsa-stained bone marrow slides is a suitable tool for confirming diagnosis in patients with visceral leishmaniasis and may be useful in the diagnosis of difficult cases. Slide smears are easily stored, do not require special storage conditions such as low temperatures, and can be easily mailed to centers where PCR is available, making it an excellent option for diagnosis in the field.

**Keywords:** visceral leishmaniasis, polymerase chain reaction, diagnosis, molecular methods, bone marrow

## **Introduction**

Conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis, such as parasitological or serological tests still have limitations,<sup>1-4</sup> and improved tools for this purpose are needed. Polymerase chain reaction (PCR), a technique of DNA amplification that allows a single gene to be amplified into millions of copies, reaching a workable amount in a few hours, has revolutionized contemporaneous etiologic diagnosis of infectious diseases. The description of species-specific kinetoplast DNA minicircles sequences (kDNA),<sup>5</sup> with the possibility of amplification by PCR, made viable the utilization of the method for diagnosis of leishmaniasis in the early 1990s.<sup>6,7</sup> Currently, PCR techniques have been employed with a high level of accuracy by several researchers.<sup>8-12</sup>

Various biological samples have been used for diagnosis of visceral or cutaneous leishmaniasis by PCR: bone marrow,<sup>10,13,14</sup> human<sup>12,15-18</sup> and canine blood,<sup>19,20</sup> lymph nodes,<sup>21</sup> buffy coat,<sup>16</sup> canine conjunctival or dermal scrapings,<sup>22</sup> and skin or mucosal biopsies.<sup>23</sup> Moreover, PCR has made possible the use of dried or old materials: *Leishmania* DNA has been extracted and amplified from blood or bone marrow aspirates spotted on filter paper,<sup>10,24</sup> paraffin-embedded tissues,<sup>25</sup> Giemsa-stained slides,<sup>26</sup> and museum specimens.<sup>27</sup>

In Mato Grosso do Sul, southwestern Brazil, the Teaching Hospital of the Federal University of Mato Grosso do Sul (NHU-UFMS) is a reference center for diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis, receiving patients and Giemsa-stained bone marrow aspirate (BMA) slides from various cities in the state for diagnostic confirmation or exclusion. The smears are analyzed by direct microscopic examination and then archived at room temperature. The objective of this study was to evaluate the use of PCR in visceral leishmaniasis diagnosis using archived smear slides. The performance of this retrospective diagnosis was compared with direct microscopy and culture.

## **Methods**

Patients were examined at NHU-UFMS in Campo Grande, the capital city of Mato Grosso do Sul, Brazil, from January 1998 to September 2004. Bone marrow aspirates (BMAs) were collected by sternal puncture or, more rarely, from the posterior iliac crest. Stained slides prepared on admission were analyzed by direct microscopic examination and then archived in the Departments of Pathology (Parasitology) or Hematology. Diagnosis of VL was based on clinical presentation, which included fever, hepatoesplenomegaly, pancytopenia and hypergammaglobulinemia, associated with positive BMA direct microscopy and/or culture or serology (Indirect Immunofluorescence Antibody Test); children with a suggestive clinical picture whose laboratorial tests were negative but who responded to a therapeutic trial with antimonials were include too. Patients who did not have a confirmed leishmaniasis diagnosis but who had other diseases or conditions detected served as controls.

**Direct examination (BMA microscopy):** Amastigotes were detected by microscopic examination of Giemsa-stained slides. Four slides for each patient were analyzed with a 10× eyepiece and a 100× oil objective. More than 1000 microscopic fields were examined, when necessary; before deciding for a negative result, the entire slides were reviewed.

**Culture:** BMAs were cultured in Novy- MacNeal-Nicolle (NNN) with Schneider's insect medium supplemented with 20% fetal calf serum, incubated at 24 °C, and weekly examined by microscopy for the presence of parasites until eight weeks.

**Serology:** when serology was possible to be obtained, Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) was performed with a commercial kit for the diagnosis of human leishmaniasis (Fiocruz - Bio-Manguinhos), using promastigotes as antigens. Titers of 1:40 or greater were considered positive.

**DNA extraction:** archived Giemsa-stained bone marrow slides were cleaned with tissue paper for removal of the immersion oil originally used for direct microscopy, wetted with sterile water and scraped with a sterile scalpel. The material was added to 300 µL of sterile water, and DNA extraction was conducted using the GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech), according to the



manufacturer's instructions, except that the final elution volume was reduced to 20 µL. After purification, the DNA samples were stored at -70° C until use.

**PCR amplification:** The DNA target for PCR amplification was the conserved region of the minicircle molecule (kinetoplastid mitochondrial DNA; kDNA), using a “hot-start” PCR technique. Briefly, each reaction contained 5 µL of 10× buffer (Promega), 100 ng of 5' and 3' oligonucleotide primers (primer A: 5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCCACCCC-3'; primerB: 5'-GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA-3'), 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (Promega), 1.5-mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U of *Taq* polymerase (Perkin Elmer), 10× buffer, sterile water, and 2 µL of the DNA sample. PCR was performed in a total reaction volume of 50 µL, under the following conditions: a first heating step of 4 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 30 s, each consisting of denaturation at 94 °C, annealing at 50 °C, and extension at 72 °C, with a final elongation at 72 °C for 10 min. A negative control without DNA in the mixture and a positive control containing 80 fg of *Leishmania* DNA were included in each experiment.

Ten microliters of the amplified products were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and visualized under UV. A 50-bp or 100-bp DNA ladder (Promega) was used as a marker. Samples were considered as positive when a PCR of 120 bp could be detected. To prevent contamination, DNA extraction and PCR were performed in separated areas.

**Ethical issues:** The study was conducted upon approval by the Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul.

## **Results**

Ninety-one children had a diagnosis of visceral leishmaniasis based on positive direct examination (n = 72), culture (n = 5), serology (n = 7), or response to therapy with antimonials (n = 7). Seventy nine patients with diseases or conditions other than visceral leishmaniasis, as follows, were used as controls: leukemias (n = 28), idiopathic thrombocytopenic purpura (n = 14), splenomegaly (n = 5), bacterial infections (n = 5), normal bone marrow (n = 5), lymphoma (n = 4), multiple myeloma (n = 3), systemic lupus erythematosus (n = 3), bone marrow aplasia (n = 2), myelodysplastic syndrome (n = 2), other (n = 8). Direct microscopy for parasites was negative for all controls. Cultures were performed (and were negative) only for those patients with splenomegaly, bacterial infections, normal bone marrow, or other conditions (n = 23), but it was not performed for patients who had a confirmed diagnosis of hematological disease.

Figure 1 shows the patterns obtained with DNA extracted from the archived bone marrow slides by PCR, with the expected amplified 120-pb products.

PCR and direct microscopy were performed in all the 91 patients with suspected visceral leishmaniasis, and culture was possible to be obtained in 88 cases. Table 1 shows the results of the three methods. Among the 91 children with a diagnosis of VL based on parasitological tests (direct microscopy and/or culture), serology, or response to therapeutic trial with antimonials, PCR was positive in 84, yielding a sensitivity of 92.3% (84.3-96.6, 95% CI).

Taking into account only those children with a positive parasitological test (positive direct examination or culture, n = 77), PCR was positive in 73, thus increasing its sensitivity to 94.8% (86.5-98.3, 95% CI). Positive and negative predictive values were 97.7% (91.1-99.6, 95% CI) and 91.7% (83.0-96.3, 95% CI), respectively. PCR specificity was 97.5% (90.3-99.6, 95% CI), since two out of the 79 patients with other diseases, in the control group, were positive to visceral leishmaniasis.

Table 2 shows that PCR was positive in 68 out of 72 patients with positive direct microscopy (94.4%) and also that 16 of 19 (84.2%) patients with negative result by direct microscopy were positive by PCR. On three occasions, it was not possible to establish diagnosis by conventional methods or by PCR.

In seven patients, diagnosis was based only on clinical criteria, with a favorable response to antimony; PCR was positive in four of them (57%).

## **Discussion**

The present experiment suggests that it is possible to reach a retrospective diagnosis of visceral leishmaniasis from stored Giemsa-stained bone marrow slides. PCR allowed the retrieval of archival cases, since the test showed a high sensitivity and specificity.

All 91 patients were doubtless ill with visceral leishmaniasis (even those seven lacking parasitological or serological confirmation), as all of them exhibited a strong suggestive clinical picture and were cured with specific medication. Nevertheless, the inclusion of patients in the absence of a gold-standard diagnosis may have important consequences when the sensitivity of a method is being evaluated. When we analyzed only those cases for which parasitological proof was available, the sensitivity of PCR was found to be as high as 95%. Considering that we used dried, old materials for the extraction of DNA, some of them archived for as long as six years, the sensitivity achieved was highly satisfactory.

PCR exhibited higher sensitivity (92.3%) than direct microscopy of BMAs (79.1%) or culture (59%) for diagnosis of visceral leishmaniasis in our patients. The good performance of the assay was reflected in its ability to detect DNA of the parasite in 84.2% of patients (16 of 19) for whom direct microscopy was negative. This capacity was also revealed in another study: BMA PCR was positive in 8 of 12 (66.7%) immunocompetent patients clinically suspected of having visceral leishmaniasis in whom parasites could not be detected by BMA microscopy.<sup>14</sup> Moreover, 57% (4 of 7) of those patients with no positive parasitological proof (direct microscopy or culture) or serological test were positive by PCR, showing that the method may be helpful in the diagnosis of difficult cases.

BMA PCR is usually positive when BMA microscopy detects parasites. When comparing microscopy and PCR techniques performed on BMA aspirates, results are generally concordant and equally sensitive: Osman et al.<sup>17</sup> showed that, of 13 BMAs collected, all were positive by PCR and 12 by microscopy; Salotra et al.<sup>8</sup> and Cascio et al.<sup>14</sup> respectively report 8 and 9 aspirates positive by both methods. In our samples, 94.8% of those positive on direct examination were also positive by PCR. Nevertheless, negative PCR results have been reported in a few patients with positive parasitological proof: 2 of 10 samples in one study<sup>10</sup> and 1 of 3 in another.<sup>13</sup> Similarly, four of our patients with a positive microscopic examination had a negative PCR, which can be

explained by the fact that parasite loads may be unequal in different smears: four slides were examined by microscopy for each patient, whereas only one smear (or two smears in 13 instances) was analyzed by PCR.

In the control group we included a great number of patients whose differential diagnosis with visceral leishmaniasis is frequently required; PCR was positive in two patients without visceral leishmaniasis. Positive BMA PCR results (2 of 59 individuals without confirmation of visceral leishmaniasis) are reported in immunocompromised patients<sup>13</sup> or in peripheral blood of individuals living in endemic areas of the disease (5 of 39 in one study,<sup>11</sup> 2 of 20 in another<sup>8</sup> -the latter of whom are thought to be asymptomatic carriers, since they had a positive ELISA with recombinant antigen k39 serology). We did not test our controls using any serological method, but the possibility of asymptomatic carriers may be suggested. Although the occurrence of false positives because of contamination is unlikely, it cannot be ruled out.

DNA extraction and amplification of *Leishmania* by PCR in Giemsa-stained slides archived for up to 4 years was attempted with success for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis,<sup>26</sup> showing the feasibility of establishing a new strategy for studying archived materials. Similarly to specimens collected on filter paper, slides can be easily stored, do not require low-temperature facilities for conservation, and can be easily mailed to reference centers for diagnostic confirmation or exclusion. The possibility of elucidating cases of visceral leishmaniasis for which no previous diagnostic proof is available is an encouraging step toward the use of PCR in diagnosis in the future.

## References

1. Kafetzis DA, Maltezou HC. Visceral leishmaniasis in paediatrics. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:289-94.
2. Sundar S. Indian kala-azar--better tools needed for diagnosis and treatment. *J Postgrad Med* 2003; 4: 29-30.
3. Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70:72-7.
4. da Silva MR, Stewart JM, Costa CH. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 811-4.
5. Kennedy WP. Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of *Leishmania* isolates by recombinant DNA techniques and in situ hybridisation. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 12: 313-25.
6. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71: 267-75.
7. Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, Basu D, De Bruijn MH, Adhya S, et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology* 1992; 105: 183-92.
8. Salotra P, Sreenivas G, Pogue GP, Lee N, Nakhasi HL, Ramesh V, et al. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 849-54.
9. Gatti S, Gramegna M, Klersy C, Madama S, Bruno A, Maserati R, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: the sensitivities and specificities of traditional methods and a nested PCR assay. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98: 667-76.
10. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98:12-7.
11. De Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh Karki BM, Decuypere S, et al. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99:25-31.

12. Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3038-41.
13. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32:746-9.
14. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2454-7.
15. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38:236-40.
16. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol* 2001; 39:613-7.
17. Cascio A; Calattini S, Colomba C, Scalamogna C, Galazzi M, Pizzuto M, Camilli R et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. *Pediatrics* 2002; 109(2):E27.
18. Adhya S, Hassan MQ, Mukherjee S, Manna PP, Basu A, Sen S et al. Visceral leishmaniasis in India: promises and pitfalls of a PCR-based blood test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:S179-83.
19. Silva ES, Gontijo CM, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Hyg* 2001; 65:896-8.
20. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002; 40:210-5.
21. Osman OF, Oskam L, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, El-Hassan AM, et al. Use of PCR for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1621-4.

22. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 2002; 125:197-207.
23. Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1819-23.
24. da Silva ES, Gontijo CM, Pacheco Rda S, Brazil RP. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol Res* 2004; 3: 251-7.
25. Lanús EC, Piñero JE, González AC, Valladares B, de Grosso ML, Salomón OD. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:187-92.
26. Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of leishmania from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous Leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 31-4.
27. Costa LMC. Leishmaniose tegumentar americana: uso de técnicas de biologia molecular no diagnóstico de infecção de roedores da coleção do Museu Nacional – UFRJ / American tegumentar leishmaniose [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública; 1998.

## Tables

Table 1. BMA microscopy, culture and PCR in patients with visceral leishmaniasis and controls.

---

	Patients (n=91)		Controls (n=79)	
	n tested / n positive (%)		n tested / n positive (%)	
BMA microscopy	91	72 (79,1)	79	0 (0,0)
Culture	88	52 (59,0)	23	0 (0,0)
PCR	91	84 (92,3)	79	2 (2,5)

---



Table 2. Comparison of PCR and direct microscopy for detection of *Leishmania* in bone marrow aspirates Giemsa-stained slides, in patients with visceral leishmaniasis

---

PCR results	Direct microscopy		Total
	Positive	Negative	
Positive	68	16	84
Negative	4	3	7
Total	72	19	91

---

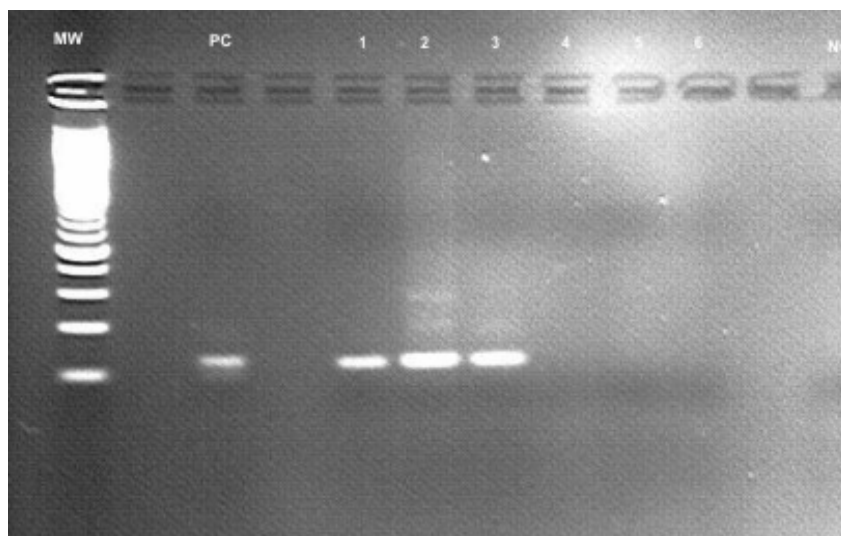


Figure 1. PCR amplification products of bone marrow Giemsa-stained slides. MW= 100 bp DNA ladder size marker; PC = positive control; 1, 2, 3 = patients with visceral leishmaniasis (PCR-positive); 4, 5, 6 = patients with other diseases (PCR-negative); NC = negative control

## **TRABALHO NÚMERO 4**

### **EXPERIÊNCIA HOSPITALAR NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

## EXPERIÊNCIA HOSPITALAR NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Brustoloni YM , Cunha RV, Consolo LZZ, Oliveira ALL, Dorval ME, Oshiro ET.

### **Resumo**

Relatos detalhados do tratamento da leishmaniose visceral (LV) são escassos na literatura nacional. O objetivo deste estudo foi analisar retrospectivamente o tratamento da doença em 116 crianças admitidas em um hospital de referência no Mato Grosso do Sul, entre janeiro de 1998 e fevereiro de 2005. O antimoniato de meglumina apresentou elevada eficácia (96,8%), sendo útil no tratamento de pacientes sem doença severa, de muitos com sinais de possível evolução para gravidade e mesmo de casos graves. Os efeitos adversos mais comuns foram as elevações de enzimas hepáticas (22,5%) e pancreáticas (17,5%) e as alterações eletrocardiográficas (18%), geralmente pouco graves e reversíveis. Pancreatite, uma reação adversa grave e pouco descrita em crianças, ocorreu em um caso. A anfotericina B foi utilizada em 18 pacientes. Diversos problemas no manejo das drogas foram detectados, como a prescrição inadequada de antimoniato, a troca inapropriada deste para esquema de segunda linha, a ocorrência de recidivas e a hipopotassemia freqüente com uso de anfotericina B. Concluímos que o antimoniato de meglumina, devido à sua eficácia, boa tolerância e baixo custo, é uma droga adequada para ser utilizada como primeira opção no tratamento da leishmaniose visceral na infância. Seu uso, no entanto, deve ser cauteloso, exigindo atenção na prescrição e monitoramento de enzimas hepáticas e pancreáticas e de alterações eletrocardiográficas. Índices baixos de letalidade podem ser obtidos quando esses cuidados são associados ao uso vigoroso de antibióticos, correção de anemias e plaquetopenias severas e disponibilidade de serviço de terapia intensiva para o tratamento de pacientes com complicações infecciosas e hemorrágicas mais graves.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral, calazar, diagnóstico, tratamento, criança.

### Abstract

Detailed reports on the treatment of visceral leishmaniasis in children are scarce in the Brazilian literature. The aim of this study was to analyze retrospectively the treatment of the disease in 116 children admitted to a reference hospital in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, from January 1998 to February 2005. Antimony had a high level of efficacy (96.8%) and was found to be useful in the treatment of patients without severe disease, of many patients bearing signs of potential evolution to severity, and even of some severe cases. The most common adverse effects were elevations in hepatic (22,5%) and pancreatic (17.5%) enzymes and electrocardiographic changes (18%), usually less serious and reversible. Pancreatitis, a severe adverse reaction little reported in children, occurred in one patient. Amphotericin B was used in 18 patients. Many problems in drug management were detected, such as antimoniate inadequate prescription, its inappropriate change to second-line therapy, the occurrence of relapses and frequent hypokalemia with the use of amphotericin B. We conclude that meglumine antimoniate, for its efficacy, good tolerability, and low cost, is an adequate drug to be used as first-line therapy in the treatment of childhood visceral leishmaniasis. It should, however, be used with caution, as attention is required in its prescription, and hepatic and pancreatic enzymes and electrocardiographic changes have to be monitored. Low mortality rates can be achieved when these precautions are associated with an ample use of antibiotics, treatment of severe anemia and thrombocytopenia, and availability of intensive care units to treat patients with more severe infectious and hemorrhagic complications.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis, kala-azar, diagnosis, treatment, children

## **Introdução**

Nos últimos anos, novas opções terapêuticas têm surgido no tratamento da leishmaniose visceral (LV). Em contraste com os clássicos antimoniais, que exigem uso prolongado (em torno 3 a 4 semanas) e possuem efeitos tóxicos às vezes graves<sup>1-3</sup>, novas formulações lipídicas da anfotericina B estão agora disponíveis, possibilitando tratamentos por períodos de tempo tão curtos quanto 5 a 10 dias, com elevada eficácia e menor número de efeitos colaterais<sup>4-6</sup>. Essas drogas têm sido utilizadas como primeira opção terapêutica em alguns países do sul da Europa<sup>4-5</sup>, inclusive em pacientes pediátricos<sup>6-7</sup>.

No Brasil, os antimoniais pentavalentes são indicados como primeira opção no tratamento da leishmaniose visceral<sup>8</sup>. A anfotericina B é a clássica droga de segunda escolha, utilizada nos casos de toxicidade ou resposta insatisfatória aos antimoniais; seu emprego é indicado como primeira opção no tratamento de gestantes<sup>8</sup> e, mais recentemente, também de pacientes graves<sup>9</sup>.

Apesar da existência de vários estudos sobre a LV na infância registrados na literatura nacional, a maioria restringe-se ao relato de características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, com poucas informações referentes ao tratamento<sup>10-14</sup>.

O objetivo deste trabalho é descrever o tratamento de crianças com LV internadas em um hospital universitário de referência, detalhando-se as condições clínicas iniciais dos pacientes no momento da admissão, as drogas indicadas e as dificuldades encontradas durante sua utilização, a ocorrência dos principais efeitos adversos, a duração dos esquemas terapêuticos, a resposta ao tratamento e as medidas de suporte empregadas (antibióticos, concentrado de hemácias e de plaquetas, necessidade de cuidados intensivos).

## **Métodos**

O estudo foi baseado na análise retrospectiva de prontuários de crianças admitidas para tratamento de leishmaniose visceral no núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU-UFMS), no período de janeiro de 1998 a fevereiro de 2005. Os participantes foram pacientes pediátricos com LV confirmada por microscopia direta e/ou cultura de aspirado medular positivas, Imunofluorescência  $\geq 1:40$  até 2002 e a 1:80 a partir dessa data, ou DNA de *Leishmania* detectado por PCR em lâminas de mielograma (n=114), e crianças que apresentavam sintomatologia sugestiva, sem comprovação laboratorial da doença, porém com resposta terapêutica favorável ao tratamento antimonial (n=2). Participaram do estudo somente pacientes cujo tratamento foi realizado no Hospital ou que o iniciaram em outro local, desde que por poucos dias (no máximo 3), e que foram enviadas ao nosso serviço para a sua realização, já que este é considerado de referência para o diagnóstico e tratamento da doença. No total, 116 crianças foram analisadas.

Os dados coletados foram sexo, idade, tempo de duração da doença, exame físico completo, exames laboratoriais colhidos por ocasião da admissão e depois semanalmente, ou em menor período de tempo, quando necessário: hemograma completo, aspartato aminotransferase -AST- valor de referência (VR) = 15 a 37 U/L, alanino aminotransferase -ALT- VR=30 a 65 U/L, amilase (VR= 25 a 115 U/L), lipase, quando suspeita de pancreatite (VR=114 a 286 U/L), uréia, creatinina, potássio (VR= 3,5 a 5,0 mEq/l) proteínas totais e frações e RX de tórax. Eletrocardiogramas seriados, realizados antes e semanalmente durante o tratamento, foram analisados. O intervalo QT, corrigido para a frequência cardíaca (QTc), foi calculado utilizando-se a fórmula da Bazzet, dividindo-se o intervalo QT pela raiz quadrada do intervalo R-R; prolongamento do mesmo foi considerado se  $> 0,45$  segundos<sup>15</sup>. Foram também pesquisadas a presença de forma ou inversão anormal de onda T e de elevação ou depressão de segmento ST.

As condições clínicas iniciais dos pacientes no momento da admissão foram retrospectivamente identificadas utilizando-se as definições de “sinais de gravidade”, “sinais de alerta” e “alterações laboratoriais significativas”, recentemente recomendadas por técnicos do Ministério da Saúde<sup>9</sup>. Esses critérios não foram aplicados na época da admissão das crianças.

Para a avaliação da resposta ao tratamento, foram consideradas: a)- cura clínica inicial: aquela obtida pelos pacientes quando ao final da terapia estiveram sem febre, com diminuição da esplenomegalia de pelo menos 40% do valor inicial, melhora do estado geral e das provas laboratoriais b)-recidiva: quando houve reaparecimento de sintomas sugestivos e esplenomegalia e detecção de amastigotas em aspirado medular após a cura clínica inicial c)-cura clínica final: quando não houve retorno dos sinais e sintomas por um período de até 1 ano ou mais após o paciente ter sido considerado curado clinicamente.

Para verificar-se a reação de causalidade entre as drogas utilizadas e o aparecimento dos efeitos clínicos adversos, aplicou-se o algoritmo de Naranjo, recomendado pela Organização Mundial de Saúde<sup>16</sup>.

O antimoniato foi utilizado na dose de 20mg/kg/dia de antimônio pentavalente (Sb<sup>v</sup>), considerando-se que 5 ml contêm 81 mg Sb<sup>v</sup>, diluídos em 100ml de SG 5% e administrados em 1 hora por via endovenosa (EV). A maioria dos pacientes foi tratada com antimoniato de meglumina fornecido pelo Ministério da Saúde (Glucantime®, Aventis). Em 30 de abril de 2000, o Ministério distribuiu para as Secretarias Estaduais de Saúde uma formulação de antimoniato cuja suspensão foi recomendada a partir de janeiro-fevereiro 2001, devido à notificação de eventos adversos graves por contaminação com arsênio e chumbo<sup>17</sup>.

A anfotericina B convencional (desoxicolato de anfotericina B) foi empregada na dose de 1mg/kg/dia, em esquema diário, por via EV em 4 a 6 horas, diluída em SG5% numa concentração final de 10mg/100ml, com infusão paralela de igual volume de SG5%, adicionado de prometazina (0,5mg/kg), dipirona (10mg/kg) e hidrocortisona (0,7mg/kg), para diminuir as reações infusionais. As apresentações comerciais utilizadas foram variadas, dependendo da disponibilidade orçamentária do hospital durante a internação dos pacientes.

A única apresentação lipídica de anfotericina B utilizada foi uma dispersão coloidal (Amphocil®, Zodiac), usada na dose de 2 mg/kg/dia por 7 a 10 dias.

Os pacientes foram seguidos em regime ambulatorial por pelo menos 1 ano após o tratamento, e eram orientados para retornarem, mesmo após esse tempo, se sintomas sugestivos recomeçassem.



O programa Epi-Info 3.2.2 foi utilizado para a análise estatística. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

## **Resultados**

Todas as 116 crianças eram procedentes do Estado de Mato Grosso do Sul. A idade variou de 6 meses a 13 anos e 1 mês (média= 4 anos e 2 meses; mediana = 3 anos e 1 mês). Cinquenta e nove (50,8%) eram do sexo masculino e 57 (49,2%) do feminino.

As condições clínicas das crianças por ocasião da admissão, as indicações terapêuticas iniciais e a evolução de acordo com a droga utilizada estão descritas na Tabela 1. Dos 116 pacientes, 111 receberam antimoniato de meglumina como primeira escolha, três foram tratados com anfotericina B convencional e dois com anfotericina B dispersão coloidal (Amphocil®).

Quando os pacientes foram classificados quanto às condições clínicas iniciais, verificou-se que 103 crianças eram portadoras de quadro clínico sem gravidade, e 13 foram classificadas como graves: com desnutrição severa, icterícia, hemorragias (exceto epistaxe), edema generalizado e toxemia (letargia, má perfusão, cianose, taquicardia, hiperventilação, instabilidade hemodinâmica) (Tabela 1).

Das 111 crianças que utilizaram o antimônio pentavalente, a maioria (n=100) era portadora de quadro clínico sem sinais de gravidade (Tabela 1). Esse grupo, no entanto, incluía pacientes com “sinais de alerta”, cuja presença indica a probabilidade de evolução para situações de gravidade: idade entre 6 meses e 1 ano (n=13), infecção na admissão (n=74), recidiva de quadros tratados em outro hospital (n=2), febre havia mais de 60 dias (n=10). Também havia crianças que apresentavam alterações laboratoriais significativas: hemoglobina menor que 7g/dL (n=62), menos de 500 neutrófilos (n=6), plaquetas abaixo de 50.000 (n=22), albumina menor que 2,5g/dL (n=25). A maioria desses pacientes evoluiu satisfatoriamente ao tratamento antimonial.

Dos 13 casos que poderiam ser considerados graves, 11 receberam antimoniato de meglumina como primeira indicação terapêutica; 7 evoluíram favoravelmente (Tabela 1).

Das 111 crianças que utilizaram inicialmente o antimoniato, apenas 96 completaram o tratamento. Quinze não terminaram o esquema: 3, devido a reações adversas (pancreatite, convulsão, reação febril importante); 1, por suspensão do fornecimento do Sb<sup>v</sup> (apresentação tóxica); 2, por superdosagem (1 paciente recuperou-se e outro evoluiu para óbito); 1, por óbito após 3 dias da chegada ao hospital; 8, por apresentarem resposta terapêutica lenta, sendo considerados à época como não respondedores ao tratamento instituído, substituindo-se a droga para anfotericina B.

Destes 8 pacientes, houve casos em que a troca do Sb<sup>v</sup> foi feita em tempos tão curtos como após 7 dias do início de seu uso; 7 deles tinham doença avançada e todos foram considerados portadores de infecção bacteriana secundária, fatores que poderiam ser responsáveis pela resposta terapêutica lenta; 6 já haviam apresentado melhora dos parâmetros laboratoriais em relação à entrada no momento da troca. Consideramos, portanto, a alteração do esquema terapêutico inapropriada, e esses pacientes foram excluídos da análise da eficácia do antimonial pentavalente.

Além das 3 crianças que iniciaram o tratamento com anfotericina B, mais quinze utilizaram essa droga como segunda opção, totalizando 18 pacientes; um deles, gravemente desnutrido, apresentou reação adversa severa (miocardite e insuficiência cardíaca congestiva), situação provavelmente resultante de agravamento de miocardiopatia nutricional, e teve a medicação suspensa, recebendo posteriormente cetoconazol e halopurinol; portanto, 17 completaram o tratamento.

As reações adversas observadas durante a utilização do antimoniato de meglumina estão representadas na Tabela 2. Seis crianças apresentaram níveis de AST superiores a 5 vezes o maior valor de referência após início do tratamento (uma delas já com níveis acima de 6x na entrada), porém apenas duas necessitaram interrupção do esquema por uma semana, retornando depois, sem problemas. Os aumentos ocorreram após a segunda semana e regrediram a valores normais antes do término da terapia.

Setenta e quatro pacientes tiveram dosagem de amilase realizada. Na maioria das vezes em que houve aumento dessa enzima (12/13), este foi assintomático, pouco intenso e transitório. Apenas uma criança do sexo feminino, de 3 anos e 11 meses de idade, apresentou um quadro de pancreatite clínica: a partir do 4º dia de tratamento, houve dor abdominal, náuseas, vômitos e elevação de amilase em torno de oito vezes em relação à entrada e de 3 vezes acima do limite superior do método (349 U/L), e de lipase em torno de 7 vezes o valor máximo de referência (2020U/L) no oitavo dia. O antimoniato foi suspenso, com melhora da sintomatologia e dos parâmetros laboratoriais. A paciente foi tratada com anfotericina B, com boa evolução.

Setenta e duas crianças em uso de SB<sup>v</sup> realizaram eletrocardiogramas durante o tratamento, num total de 279 exames. As alterações eletrocardiográficas mais precoces foram o achatamento de onda T, registrada em 1 paciente no 5º dia de uso de antimoniato e reversível na segunda semana, e o aumento do intervalo QTc de 0,43 para 0,48 segundos, no 10º dia. A alteração mais encontrada foi o aumento do intervalo QTc,

que ocorreu em 9 pacientes (12,5%) após a segunda semana; o mais longo intervalo foi de 0,50 segundos e foi detectado com 18 dias de tratamento. Achatamento/inversão de onda T ocorreu em quatro crianças (5,5%) e supradesnívelamento de ST em duas (2,7%).

Sete pacientes encontravam-se em tratamento com  $Sb^V$  no período em que a formulação contaminada com metais pesados foi distribuída, entre eles, um menino de 10 meses, que após o décimo - segundo dia de terapia apresentou um quadro compatível com crise convulsiva de difícil controle (líquor e tomografia de crânio normais), só demonstrando melhora após a retirada da medicação.

As reações observadas durante a infusão do antimoniato, como febre, cianose e tremores (Tabela 1), ocorreram tanto em fases iniciais como finais do uso da droga. A continuidade do tratamento foi possível em todos os casos, com exceção de 1, em que a medicação foi suspensa devido à insatisfação dos pais diante desse efeito adverso, de ocorrência constante.

Prescrição inadequada de antimoniato foi detectada em três casos. Um paciente teve o cálculo da medicação baseado no sal bruto, o antimoniato de meglumina, e não na dose do  $Sb^V$ , como seria o correto. A ampola de Glucantime® só traz gravada a concentração de do sal bruto (300mg/ml) que, se utilizada para o cálculo da dose, fornece uma quantidade de  $Sb^V$  muito menor do que a necessária. O erro foi corrigido quando percebido, mas isso resultou em subdosagem por 13 dias. Superdosagem inadvertida ocorreu em duas crianças, por alteração no horário da prescrição (administrada à tarde em um dia e pela manhã no outro): ambas, portanto, receberam duas doses de 20mg/k em menos de 24 horas (total: 40 mg/kg/dia); uma desenvolveu insuficiência hepática, mas apresentou boa evolução após cuidados intensivos; a outra, havia recebido, em outro hospital, uma dose equivalente a 1.377 mg de  $Sb^V$  (17ml/dia, em torno de 3 ampolas e meia), apresentando insuficiência hepática e insuficiência renal aguda, sendo trazida ao nosso hospital para tratamento intensivo, mas evoluiu para óbito.

O tempo de tratamento das 96 crianças que completaram o esquema com Glucantime® está demonstrado na Tabela 3. Uma única usou a medicação por mais de 40 dias (57 dias), que foi a que recebeu subdose. Três (3,1%) pacientes tratados por 28 dias apresentaram recidiva do quadro clínico.

Quanto à resposta terapêutica ao antimoniato, julgamos que os dois pacientes que evoluíram para óbito não foram considerados não respondedores a essa medicação, já que 1 deles chegou ao serviço em fase terminal da doença, apresentando desfecho fatal três dias após, havendo recebido apenas duas doses de tratamento, e o outro foi o que havia recebido superdosagem de SB<sup>v</sup>. Portanto, a cura clínica inicial foi obtida em todos os 96 casos que completaram o tratamento (100%). Como três (3,1%) recidivaram após o mesmo, obteve-se uma cura clínica final de 96,9 %.

A hipopotassemia (potássio sérico < 3,5mEq/L) foi o efeito adverso mais encontrado nas crianças que utilizaram anfotericina B (72,2%), e foi detectada já na primeira semana em 5 de 13 casos (38,4%), obrigando à monitorização constante dos níveis de potássio sérico, com reposição por via oral ou parenteral. Nenhuma criança apresentou alteração significativa da função renal.

As doses totais de anfotericina B estão descritas na Tabela 3. Obteve-se cura clínica inicial em todas as crianças (100% dos casos) que completaram o tratamento. Dois pacientes recidivaram após a alta; um deles, já havia utilizado antimoniato (paciente recidivou duas vezes).

Oitenta e dois dos 116 pacientes (70,6%) foram considerados portadores de infecção por ocasião da admissão hospitalar e 18 (15,5%), durante a evolução da internação. Os processos infecciosos mais comuns foram a pneumonia, diagnosticada em 61,2 % dos casos, e a otite média aguda, em 11,2%. Oitenta por cento receberam antibióticos, por infecção suspeita ou confirmada.

Oitenta e três pacientes receberam transfusão de concentrado de hemácias (76 com hemoglobina menor ou igual a 7,0 na admissão ou evolução). Cinco crianças com plaquetas abaixo de 20.000 (4 com sangramentos) receberam transfusão de plaquetas; das 21 com plaquetas entre 20.000 e 50.000, 4 apresentaram sangramento e receberam plaquetas, 3 receberam e não sangraram e 15 nada receberam. Cinco foram transfundidas com plasma fresco congelado após sangramento e em 4 casos com hipoalbuminemia grave foi administrado albumina. Dos 116, 10 (8,6%) pacientes necessitaram de cuidados de terapia intensiva, em períodos que variaram de 1 a 13 dias, para tratamento de episódios infecciosos e hemorrágicos severos e de insuficiência hepática e renal.

O índice de óbito foi registrado em 2,6% (3 óbitos em 116 crianças). Todos os pacientes que apresentaram desfecho fatal tinham doença avançada na admissão, com

diagnóstico realizado tardiamente ( $\geq 60$  dias evolução). Infecção resultando em sepse esteve presente nos três casos; insuficiência renal e hepática, em dois (em um deles, secundárias à superdosagem medicamentosa); os 3 tiveram sangramentos. Todas foram submetidas à ventilação mecânica, e duas à diálise peritoneal.

## **Discussão**

No Brasil, o aumento da letalidade da leishmaniose visceral, devido principalmente ao diagnóstico tardio e, conseqüentemente, à existência de pacientes com maior gravidade, tem levado o Ministério da Saúde à adoção de novas estratégias no tratamento<sup>9</sup>. Entre elas, destaca-se a definição de critérios para a caracterização de pacientes graves, nos quais a anfotericina B deve ser indicada como droga de primeira linha, e o fornecimento da dispendiosa anfotericina B lipossomal (AmBisome®) em situações específicas de falha ou toxicidade ao desoxicolato de anfotericina B, transplantados renais ou pacientes com insuficiência renal<sup>9</sup>.

A utilização retrospectiva desses critérios nos pacientes do estudo permitiu a classificação dos casos em graves e não-graves, possibilitando uma melhor análise de sua evolução, após o uso das drogas utilizadas.

O valor do antimoniato foi demonstrado pela boa resposta nas crianças sem quadro clínico grave, muitas delas portadoras de sinais indicativos de possível evolução para gravidade, e com alterações laboratoriais significativas.

O número de casos graves que receberam antimoniato foi pequeno (n=11) para permitir a análise acurada da eficácia da droga nessa situação, mas a resposta favorável em torno de 60% deles (7/11), sugere que ela pode ser utilizada com cuidado nesses casos, quando há terapia adequada de suporte, com combate agressivo à infecção e ao sangramento. No entanto, a indicação de anfotericina B para os pacientes de maior gravidade, como agora recomendado pelo Ministério da Saúde<sup>9</sup>, é uma medida mais prudente, sendo esta a conduta atualmente adotada no serviço.

Os efeitos mais encontrados durante o uso do antimoniato, como o aumento de enzimas hepáticas e de amilase e as alterações eletrocardiográficas, foram detectados em proporção próxima a 20%, o que confirma que essa droga é bem tolerada em crianças. A comparação da ocorrência desses efeitos em outras crianças brasileiras é difícil de ser realizada, porque a maioria dos trabalhos descreve as reações adversas ao Sb<sup>V</sup> em pacientes submetidos a tratamento da leishmaniose cutânea e frequentemente incluem adultos em suas casuísticas<sup>18-20</sup>.

Os efeitos adversos dos antimoniais são mais relatados em adultos<sup>21,22</sup>. Pancreatite com repercussão clínica é descrita principalmente em imunossuprimidos, como HIV positivos ou transplantados renais<sup>23</sup>. A ocorrência em crianças, como a aqui

registrada, é rara, e só encontramos a descrição de 1 caso na literatura<sup>24</sup>. Especialmente as reações severas parecem ser muito mais encontradas em adultos<sup>22</sup>: de 12 casos graves descritos, houve 5 episódios de pancreatite, 3 de acometimento cardíaco severo, 7 casos de insuficiência renal aguda e 5 de acentuado envolvimento hepático, em oposição a ocorrência de 1 registro de insuficiência hepática e renal detectada em uma criança<sup>22</sup>.

A maioria das alterações eletrocardiográficas observadas durante o uso de antimônio pentavalente parece não acarretar conseqüências, mas um pequeno número de pacientes pode desenvolver arritmias ameaçadoras da vida ou fatais, ocorrendo mais freqüentemente quanto maior a dose e mais prolongada a duração do tratamento<sup>23</sup>. Algumas alterações detectadas após um período curto de utilização, a partir do 10º dia de tratamento<sup>19</sup> (semelhantes às demonstradas em nosso estudo), e inclusive com o emprego de doses baixas (15mg/kg/dia)<sup>25</sup>, têm sido relatadas, sendo portanto aconselhável a avaliação eletrocardiográfica rotineira desde o início do tratamento.

Crises convulsivas geralmente não são relacionadas entre os efeitos adversos mais comuns do antimonio<sup>23</sup>. A apresentação tóxica continha níveis elevados de arsênio e chumbo<sup>17</sup>. Apesar de o diagnóstico de intoxicação por chumbo não ter sido realizado na época, os sintomas neurológicos apresentados por nosso paciente lembram aqueles descritos na intoxicação por esse metal pesado<sup>26</sup>.

A resposta lenta ao antimonial, apresentada por alguns pacientes com doença avançada e com infecção (considerada responsável por resultados insatisfatórios ao tratamento)<sup>27</sup>, resultou em sua substituição precoce e inapropriada para esquema terapêutico de segunda linha. A utilização constante de Sb<sup>v</sup> por um período de tempo inferior ao mínimo recomendado, e a rotulação de pacientes como refratários a este, com adoção de esquema de segunda linha, sem que tivessem recebido a droga por tempo adequado, são fatores que contribuíram para o estabelecimento dos altos índices de resistência aos antimoniais na Índia<sup>28</sup>; portanto, essa atitude deve ser evitada. Recomenda-se pelo menos 40 dias de uso de Sb<sup>v</sup>, antes de se considerar uma falha terapêutica<sup>8</sup>. Atualmente, a insistência na manutenção do antimonio praticada no serviço demonstra que a maioria dos casos em crianças são responsivos a essa droga.

A duração ideal do tratamento com antimônio pentavalente ainda não está estabelecida<sup>29</sup>. O tratamento até 30 dias foi eficaz na maioria dos casos, entretanto, mais de 30 dias foram necessários em alguns pacientes com regressão do baço demorada, já tendo sido sugerido que esse órgão pode atuar como reservatório de infecção nessas



situações<sup>30</sup>. O aparecimento de recidivas, geralmente relacionadas a tratamento incompleto, sugere que a duração deste pode ter sido insuficiente em algumas crianças. Por outro lado, observou-se que casos com doença diagnosticada em fase inicial respondem rapidamente à terapia. O regime terapêutico, portanto, precisa ser individualizado<sup>30</sup>, levando-se em conta a extensão da doença apresentada pelo paciente antes do início do tratamento.

A resposta inicial à anfotericina B foi excelente (100%), e a maioria das crianças respondeu à quantidade cumulativa de 20mg/kg, mas duas delas apresentaram recidivas, e outras, também portadoras de doença avançada, necessitaram de doses superiores a 30mg/kg. Outros autores detectaram o uso dessas doses altas necessárias para a cura em pacientes brasileiros<sup>27</sup>. O número de crianças que utilizaram anfotericina B em nosso estudo foi pequeno e as doses ideais para tratamento necessitam ser melhor avaliadas em um grupo maior de pacientes. A análise da eficácia final da droga (88,3%) também deve ser analisada com cuidado, devido à ausência de uniformidade nas apresentações comerciais utilizadas.

A hipopotassemia, detectada durante a utilização de anfotericina B, geralmente descrita como efeito tardio, ocorreu já a partir da primeira semana de uso e em percentual elevado de casos (72,2%), muito maior do que o demonstrado na Índia (16%)<sup>31</sup>, determinando coletas freqüentes de sangue para a monitorização dos níveis séricos de potássio, o que trouxe incômodo às crianças, que toleram pouco procedimentos dolorosos.

Além das hemorragias, as infecções são complicações classicamente encontradas em pacientes que evoluem para óbito<sup>32</sup>. O uso amplo de antibióticos em casos de infecção bacteriana comprovada ou suspeita e o suporte de tratamento intensivo em pacientes com complicações infecciosas severas e hemorragias graves foram fatores que colaboraram para a obtenção do baixo índice de letalidade no serviço (2,6%).

Nos países em desenvolvimento, o preço elevado das apresentações lipossomais de anfotericina B impede seu uso em larga escala<sup>3</sup>. Em nosso meio, a aquisição de medicamentos de alto custo é difícil de ser obtida. Concluímos que o antimoniato de meglumina é altamente eficaz e bem tolerado em crianças e deve continuar a ser a droga indicada como esquema de primeira linha na infância. A inconveniência da necessidade de uso de antimônio por tempo prolongado poderá ser talvez resolvida por sua associação a outros agentes terapêuticos, encurtando o período de tratamento.

## Referências

1. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002; 2 : 494-501.
2. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004; 10(6):307-15.
3. Desjeux P. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. Options thérapeutiques pour la leishmaniose viscérale. *Med Mal Infect* 2005; Suppl 2:S74-6.
4. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366(9496):1561-77.
5. Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. Change in human visceral leishmaniasis treatment in Italy: retrospective study of 630 patients. *Parassitologia* 2004; 6 (1-2):199-201.
6. Minodier P, Robert S, Noël G, Blanc P, Retornaz K, Garnier JM. Amphotéricine B liposomale en première intention dans la leishmaniose viscérale infantile en région Provence-Alpes-Côte-d'Azur-Corse. [First-line liposomal amphotericin B for pediatric visceral leishmaniasis in southern France]. *Arch Pediatr* 2005; 12:1102-8.
7. Kafetzis DA, Velissariou IM, Stabouli S, Mavrikou M, Delis D, Liapi G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(1):26-30.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120 p.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Grave. Normas e Condutas. Brasília-DF, junho 2005. 51 p.
10. Campos Jr D. Características clínico-epidemiológicas do Calazar na criança. Estudo de 75 casos. *J Pediatr (Rio J)* 1995; 71:261-5.
11. Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78:120-7.
12. Pedrosa CM, da Rocha EM. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37(4):300-4.

13. Queiroz MJ, Alves JG, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80:141-6.
14. Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AA. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81: 73-84.
15. Chulay JD, Spencer HC, Mugambi M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34(4):702-9.
16. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. Guia Básico para a farmácia hospitalar. Brasília;1994. p. 77-82.
17. Silva Jr JB. Antimoniato de Meglumina. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34 (1): 103-105.
18. Deps PD, Viana MC, Falqueto A, Dietze R. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do estibogluconato de sódio BP88 no tratamento da leishmaniose. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33(6):35-43.
19. Saldanha AC, Romero GA, Guerra C, Merchan-Hamann E, Macedo V de O. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88 e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea. II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33(4):383-8.
20. de Paula CD, Sampaio JH, Cardoso DR, Sampaio RN. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(3):365-71.
21. Masmoudi A, Maalej N, Mseddi M, Souissi A, Turki H, Boudaya S et al. Glucantime par voie parentérale: bénéfice versus toxicité. [Glucantime injection: benefit versus toxicity]. *Med Mal infect* 2005; 35(1):42-5.
22. Oliveira ALL. Estudos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2000-2005. Rio de Janeiro; 2006. Doutorado [Medicina Tropical]. Instituto Oswaldo Cruz.
23. Rapp C, Simon F, Dordain ML. L'antimoniato de N-méthyl glucamine, ou Glucantime. *Med Trop (Mars)* 2000; 60:342-3.
24. Kuyucu N, Kara C, Bakirtaç A, Teziç T. Successful treatment of visceral leishmaniasis with allopurinol plus ketoconazole in an infant who developed pancreatitis caused by meglumine antimoniate. *Ped Infect Dis J* 2001; 20(4):455-7.

25. Ribeiro AL, Drummond JB, Volpini AC, Andrade AC, Passos VM. Electrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(3):297-301.
26. Brayden RM, Daley MF, Brown JM. Pediatria ambulatorial e comunitária. In: Hay Jr WW, Hayward AR, Levin MJ, Sondheimer JM, editores. *Current Pediatria – Diagnóstico e Tratamento*. 16<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2004. p. 187-202.
27. Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL, Costa CH. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 629-633.
28. Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001; 6:849-54.
29. Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, Spyridis P, Stavrinadis C, Karpathios T et al. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin Infect Dis* 2000; 31(5):1139-43.
30. Benjamin B, Annobil SH, Bassuni WA. Diagnostic and management problems in childhood visceral leishmaniasis in south-western Saudi Arabia. *Ann Trop Paediatr* 1994; 14(1):7-13.
31. Thakur CP, Singh RK, Hassan SM, Kumar R, Narain S, Kumar A. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93 (3):319-23.
32. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection* 2003; 31(3):174-7.

Tabela 1. Condições clínicas na admissão, escolha terapêutica e evolução do tratamento de 116 crianças com leishmaniose visceral

Condições clínicas iniciais ( n )	Escolha terapêutica ( n )	Evolução ( n )
Pacientes sem sinais de gravidade (103)	Sb <sup>v</sup> (100)	Cura clínica inicial (89) Não completaram o esquema (10) Superdosagem e óbito (1)
Com comprometimento hepático intenso		
AST acima de 9 x o limite superior do método	Anfotericina B (1)	Cura clínica inicial
AST acima de 20 x o limite superior do método	Anfotericina B (1)	Cura clínica inicial
	ABDC (1)	Cura clínica inicial
Pacientes com sinais de gravidade (13)		
Diarréia, vômitos, hipotensão	Sb <sup>v</sup> (1)	Cura clínica inicial
Hematêmese, melena , hematomas generalizados	Sb <sup>v</sup> (1)	Cura clínica inicial
Anemia severa, adenite por <i>S.aureus</i> , toxemia, sepse	Sb <sup>v</sup> (1)	Cura clínica inicial
Sangramento gengival incoercível após extração dentária	Sb <sup>v</sup> (1)	Cura clínica inicial
Edema generalizado, toxemia, pneumonia	Sb <sup>v</sup> (1)	Cura clínica inicial
Febre, apatia, gemência, artrite séptica por <i>S aureus</i>	Sb <sup>v</sup> (1)	Cura clínica inicial
Febre, apatia, gemência, taquicardia, pneumonia lobar	Sb <sup>v</sup> (1)	Cura clínica inicial
Desnutrição grave, mastoidite, pneumonia, hemorragias	Sb <sup>v</sup> (1)	Não completou o esquema, resposta lenta
Febre arrastada, pneumonia lobar, plaquetopenia grave	Sb <sup>v</sup> (1)	Não completou o esquema, resposta lenta
Dispnéia, gemência, taquicardia, pneumonia, derrame	Sb <sup>v</sup> (1)	Não completou o esquema, convulsão
Desnutrição grave, dispnéia, taquicardia, sepse, choque	Sb <sup>v</sup> (1)	Óbito após 3 dias
Insuficiência respiratória e hepática, hemorragias, sepse	ABDC (1)	Óbito após 13 dias
Desnutrido grave, gengivorragia, pneumonia	Anfotericina B (1)	Miocardite e insuficiência cardíaca
Sb <sup>v</sup> : antimônio pentavalente	ABDC: Anfotericina B dispersão coloidal	AST: aspartato aminotransferase

Tabela 2. Principais efeitos adversos encontrados em crianças que utilizaram antimoniato de N-metil glucamina e anfotericina B no tratamento de leishmaniose visceral, NHU-UFMS , 1998 – 2005.

Droga/ efeito adverso	N	%
<b>Antimoniato de N-metil glucamina</b>		
Aumento de aminotransferases .....	25/111	22,5
Até 3 vezes o valor normal de referência .....	19/25	76,0
Acima de 5 vezes o valor normal de referência .....	6/25	24,0
Alterações eletrocardiográficas *.....	13/72	18,0
Apenas aumento de QTc .....	7/13	53,8
Apenas alteração achatamento/inversão T.....	2/13	15,4
Supradesnivelamento ST .....	2/13	15,4
Aumento do QTc e achatamento/inversão T.....	2/13	15,4
Aumento de amilase **.....	13/74	17,5
Até 2 vezes o valor normal de referência .....	12/13	92,3
Pancreatite clínica .....	1/13	7,7
Febre, cianose, tremores durante a infusão .....	7/111	6,3
Artralgia .....	1/111	0,9
Conjuntivite alérgica .....	1/111	0,9
Nistagmo, desvio ocular, convulsão .....	1/111	0,9
<b>Anfotericina B convencional</b>		
Hipopotassemia .....	13/18	72,2
Potássio de 3,0 mEq/L a 3,3 mEq/L .....	4/13	30,8
Potássio de 2,0 mEq/L a 2,9 mEq/L .....	9/13	69,2
Febre, cianose, tremores durante a infusão .....	4/18	22,2
Alterações cardíacas .....	3/18	16,6
Miocardite e insuficiência cardíaca .....	1/18	5,5
Bloqueio de ramo direito .....	1/18	5,5
Sobrecarga de ventrículo esquerdo.....	1/18	5,5

Tabela 3. Duração do tratamento antimonial, doses totais de anfotericina B e resposta terapêutica em crianças com leishmaniose visceral, NHU-UFMS, 1998 – 2005.

Droga / duração / doses / resposta	N	%
<b>Antimoniato de N-metil glucamina (n=96)</b>		
Duração do tratamento		
de 20 a 30 dias .....	83/96	86,5
de 35 a 40 dias .....	12/96	12,5
acima de 40 dias .....	1/96	1,0
Resposta terapêutica		
Cura clínica inicial .....	96/96	100,0
Recidiva .....	3/96	3,1
Retratamento com antimoniato por 40 dias.....	1/3	33,3
Retratamento com anfotericina B, 20mg/kg.....	1/3	33,3
Retratamento com anfotericina B, 30mg/kg.....	1/3	33,3
Cura clínica final .....	93/96	96,9
<b>Anfotericina B (n=17)</b>		
Dose cumulativa		
até 20 mg/kg .....	12/17	70,6
de 30 a 35 mg/kg .....	4/17	23,5
40mg/kg .....	1/17	5,9
Resposta terapêutica		
Cura clínica inicial .....	17/17	100,0
Recidiva .....	2/17	11,8
Retratamento com 30mg/kg .....	1/2	50,0
Retratamento com 50mg/kg .....	1/2	50,0
Cura clínica final .....	15/17	88,2

## **TRABALHO Nº 5**

### **UNSATISFACTORY RESPONSE IN THE TREATMENT OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZILIAN CHILDREN: THE PROBLEM OF RELAPSE**



UNSATISFACTORY RESPONSE IN THE TREATMENT OF VISCERAL  
LEISHMANIASIS IN BRAZILIAN CHILDREN: THE PROBLEM OF RELAPSE

Brustoloni YM , Cunha RV, Oliveira ALL, Dorval ME, Oshiro ET.

**Abstract**

Only occasionally do HIV-negative patients relapse after an apparently successful treatment of visceral leishmaniasis. Clinical and laboratory characteristics and management of four HIV-negative Brazilian children who relapsed are described. None of them had severe malnutrition or concurrent illness that would account for relapse. Suggestive signs of potential relapse included discrete splenic regression after the first treatment course, the presence of a great number of parasites detected in bone marrow at the time of diagnosis, and the absence of regression in spleen size during post-treatment follow-up visits. However, steady regression of spleen size and the presence of a small parasite burden at diagnosis did not exclude the possibility of relapse. Recovery of clinical or laboratory variables at the end of therapy were not capable of predicting relapse in all cases. All children were afebrile and showed improvement of hematological parameters at the end of a therapy considered as successful. Three children relapsed in the first six months after therapy, but one had recurrence of the disease one year and seven months later. One child relapsed twice. We propose that children who are highly parasitized should receive longer courses of therapy. Current aspects related to relapse are discussed.

**Keywords:** visceral leishmaniasis, kala-azar relapse, children, treatment

## **Introduction**

Visceral leishmaniasis is caused by an obligate intracellular protozoan of the genus *Leishmania* that multiplies in macrophages of the reticuloendothelial system. As in other intracellular infections, eradication of all organisms, despite optimal treatment, is seldom achieved<sup>1</sup> and the disease is prone to relapse.<sup>2</sup> Recurrence may occur after an apparent response to any antileishmanial drug, such as antimony, pentamidine, or amphotericin B,<sup>3</sup> or even to the highly effective liposomal amphotericin B (AmBisome®)<sup>4</sup> or the newest oral drug miltefosine.<sup>5</sup> The factor responsible for a successful relapse-free state after antileishmanial treatment appears to be the satisfactory emergence and persistence of an effective T-cell-dependent immune response.<sup>6</sup>

From January 1998 to February 2005, 116 children with visceral leishmaniasis were treated in a reference hospital in the state of Mato Grosso do Sul, in Center-West region of Brazil. Ninety six of them completed treatment with meglumine antimoniate, with a cure rate of 96.8%; 18 received amphotericin B as first or second choice; and two were treated with an amphotericin B colloidal dispersion (Amphocil®). All patients were followed up after treatment for a period of at least one year. Four children relapsed, and are here described.

Relapse was defined as the reappearance of suggestive symptoms and splenomegaly and detection of amastigotes in bone marrow aspirate (BMA) after an initial clinical cure. Parasitological cure (absence of parasites in splenic aspirate or in BMA) at the end of a treatment course, currently required in formal treatment trial protocols to characterize “apparent or initial cure”,<sup>6</sup> was not assessed, because parents were in every occasion reluctant to allow repeated invasive procedures on their children.

### **Case 1**

A two-year-eight-month-old boy presented with a history of fever and cough lasting for 20 days, in addition to vomiting and apathy. Pallor and visceral enlargement were detected on physical examination and pancytopenia was revealed in laboratory tests (Table 1). He was just mildly malnourished (weight, 11.700 kg; WHO's z score < -1 to > -2)<sup>7</sup> and no intercurrent illnesses were detected. Visceral leishmaniasis was confirmed by detection of a great number of amastigotes under direct microscopy of BMA and by

positive culture of the same material in Novy- MacNeal-Nicolle (NNN) medium. Meglumine antimoniate was given (Figure 1) and he was afebrile in four days. Fever returned on the 13th day and bacterial pneumonia was diagnosed and treated with antibiotics. He was discharged in good overall condition. Three months and 10 days later the patient returned with fever and cough persisting for five days, abdominal distension, spleen size 3 cm greater than at discharge, foot edema, and pancytopenia. Again, direct microscopy and BMA culture were both positive. He was re-treated with conventional (deoxycholate) amphotericin B (Figure 1).

### **Case 2**

An eleven-month-old boy was admitted with a history of persistent pallor lasting for two months. He had been receiving iron therapy for an iron deficiency diagnosis, without improvement. Other complaints were fever, cough, vomiting, and weight loss. Weight was 8 kg ( $z$  score  $< -1$  to  $> -2$ , mild malnutrition). Hepatosplenomegaly was detected on physical examination and hematological parameters showed anemia and thrombocytopenia (Table 1). BMA direct microscopy revealed few protozoans; culture was positive. Meglumine antimoniate was initially given, but he had high infusion-related fever and rigors and soon the drug was replaced with conventional amphotericin B (Figure 1). He was discharged in good general condition and returned twice for follow-up. One month later, spleen measurements were the same as at discharge time (3 cm). In the second medical visit (2 months and 15 days after discharge) there were complaints of abdominal pain and fever, and spleen size was a little larger (4 cm). He was readmitted and BMA direct microscopy was positive again. Conventional amphotericin B was restarted and the patient responded well to a total dose of 30 mg/kg.

### **Case 3**

A two-year-six-month-old well-nourished boy was admitted with a history of fever and abdominal distension lasting for 8 days and a 4-kg weight loss over the past month. The patient was pale and had high fever (39 °C), with enlarged, soft, easily palpable spleen and liver and pancytopenia (Table 1). A BMA was collected and revealed a great number of amastigotes, culture was positive. He received parenteral meglumine antimoniate (Figure 1) and after five days of therapy he was afebrile. The patient was discharged in good general condition and returned one month later, asymptomatic and with spleen and liver measuring the same as at discharge time (6 and 4 cm,

respectively). At three months of follow-up (four months after discharge) there were complaints of fever and abdominal distension, and the spleen was found to have reached 11 cm. BMA revealed the presence of many amastigotes, but culture was negative. The patient had pneumonia and received oxygen, antibiotics, blood transfusions, and albumin. Improvement was slow, and a total dose of 30 mg/kg of amphotericin B was given. At discharge he was well. Living in another city, he returned only six months later, having already been ill for three months, with abdominal distension. He had had fever for two days, and visceromegaly was detected. Again, BMA was positive and culture negative. He received conventional amphotericin B at 1 mg/kg/day for 22 days, and this time the spleen measured 7.5 cm. Amphocil® became available and 14 mg/kg were given (2 mg/kg/day for seven days). In addition to this lipid formulation, 36 mg/kg of amphotericin B had already been given, but the spleen still measured 6 cm. Conventional amphotericin B was given until a total of 50 mg/kg was reached. He was discharged in good general condition and returned one, two, and six months later, with progressive visceral reduction. At the end of one year of follow-up he had no palpable spleen or liver and was well.

#### **Case 4**

A 10-year-old boy living in a known endemic area of visceral leishmaniasis was admitted to our ward with a 10-day history of high fever, hyporexia, and abdominal pain. On physical examination the patient was febrile and pale and had enlarged spleen and liver (Table 1). Laboratory tests showed pancytopenia and hypoalbuminemia. He weighed 24 kg and was considered to have mild malnutrition ( $z$  score  $< -1$  to  $> -2$ ). BMA revealed few *Leishmania* amastigotes, and culture was negative. After meglumine antimoniate was given, defervescence occurred on the fifth day of treatment. Laboratory parameters improved at the end of therapy, and at discharge the patient was well. He returned for follow-up five months later without complaints or visceromegaly, but the family requested that further follow-up be conducted in their city of residence. One year and seven months later, he returned with fever, cough, and abdominal pain lasting for 6 days, and splenomegaly was noted on physical examination. BMA direct microscopy was positive. Meglumine antimoniate was given for 40 days and the patient was afebrile on the third day. At discharge he was well. Still on follow-up after one year, he is asymptomatic and with no visceral enlargement.

### **Discussion**

It is now clear that the protective post-treatment mechanism in visceral leishmaniasis involves T cells.<sup>1</sup> Indeed, relapse is a growing clinical problem in patients with acquired T cell deficiencies associated with advanced HIV disease or in those treated with immunosuppressive agents (corticosteroids and anti-rejection drugs in organ transplant recipients).<sup>8</sup>

However, relapse may occasionally occur in otherwise healthy persons<sup>9</sup>; all four children in this report were in good health before the occurrence of visceral leishmaniasis and appeared to be immunologically intact patients. All of them had negative HIV serology and none were known to be immunodepressed by severe malnutrition or intercurrent illnesses sometimes associated with a poor response to therapy, such as tuberculosis.<sup>10</sup> Moreover, in “immunocompetent” patients, unidentified deficits of immune status would sometimes be probably responsible for leishmaniasis.<sup>11</sup>

In immunocompetent patients receiving antimony, relapse is infrequent and relapse rates lower than 5% are expected.<sup>12</sup> Regarding amphotericin B, most of the published experience has been generated in India, where it is currently employed as first-line parenteral therapy<sup>8</sup>; a report on its use in nearly one thousand treated patients showed a relapse rate of less than 1%.<sup>13</sup> Three of our child patients who relapsed had received meglumine antimoniate, accounting for a relapse rate of 3.1% relative to the group of 96 children treated with the drug. Two of our patients who used amphotericin B relapsed, but our experience with this drug is small (n = 18) and a greater number of treatments is necessary to reflect the real rate of relapse with its use.

Relapses are mainly reported among patients treated with shorter courses of therapeutic drugs, in incomplete schemes.<sup>14,15,16</sup> Increasing parasite drug resistance likely contributes to relapse also in otherwise healthy individuals. Resistance to pentavalent antimonials has been documented in about 65% of cases in India,<sup>3</sup> but it does not seem to be a problem in Brazil, since  $\geq 90\%$  cure rates are achieved with antimony.<sup>17,18</sup> The fact that to be cured two patients needed high doses of amphotericin B, the most potent antileishmanial drug, may indicate that the therapeutic failure initially observed with antimoniate might actually be attributed to incomplete parasite clearance as a result of undertreatment in patients with more severe disease, rather than to resistance to the regimen itself.

Of the patients who are properly treated and respond, most improve after 7-10 days, the majority become afebrile in around seven days of therapy, hematological abnormalities improve within two weeks, and spleen size shows a steady regression at the end of treatment (40% or more, when compared to the initial dimensions).<sup>14,19</sup> All children became afebrile in less than a week, and hematological recovery was noted in all of them at the end of therapy (Table 1). Except for patient 3, whose discrete splenic regression would mean that partial cure was achieved (Table 1), indicating an incomplete response to treatment, a reduction of at least 40% in spleen size in two of the children and an impalpable spleen in the other were detected.

In addition to discrete splenic regression after the first treatment course, other signs would suggest that relapse would happen: an association with relapse and heavily parasitized patients had been previously described,<sup>10</sup> and in patients 1 and 3 amastigotes were detected in great numbers in bone marrow at the time of diagnosis. In patients successfully treated, mean spleen size is usually found to be markedly reduced in follow-up visits, but, in those who relapse, mean spleen size does not change after treatment,<sup>20</sup> as was the case with patients 1, 2, and 3. These signs, however, were not found in all four children; patients 2 and 4, who had a small number of amastigotes in BMA, did relapse.

The detection of a great number of parasites in bone marrow at the time of diagnosis might suggest that patients should be treated for longer courses. In Brazil, the recommended duration of treatment with meglumine antimoniate is of at least 20 days, with a maximum of 40 days,<sup>19</sup> depending on the severity of the disease. We propose that in these situations patients should be treated for 40 days.

Patient 3, who relapsed twice (Figure 1), was the most challenging to treat. In the second course of treatment, 30 mg/kg of amphotericin B were given; doses of 25 or 30 mg/kg generally cure patients who fail to respond to 20 mg/kg.<sup>13</sup> In the patient's last admission, a total dose as high as 50 mg/kg of amphotericin B was necessary to achieve cure. Although not a common occurrence, patients requiring such a high dose have been described in Brazil.<sup>17</sup> Patients with frequent relapses after treatment are reported by other authors.<sup>10,21</sup> Defective production of IL-2, IL-1 beta, and interferon gamma was detected in a difficult-to-treat patient.<sup>22</sup>

Unsuccessful immune response, involving several mechanisms resulting in alterations in T-cell-dependent parameters, is related to relapse<sup>6</sup>: a prominent or persistent Th2-cell-type response may neutralize the immunologic arm of the host

response to treatment; it may impose a considerably higher parasite tissue burden against which a drug is required to act, reducing initial treatment efficacy; and it may potentially foster either rapid recurrence or remote relapse of infection after apparently effective therapy.

The risk of relapse is highest in the first 6-12 months after therapy,<sup>8,9,21</sup> and post-treatment follow-up for six months is proposed.<sup>21</sup> Relapses are also believed to occur years after treatment.<sup>16</sup> Three of our child patients suffered recurrence within six months after therapy and one relapsed one year and seven months after treatment. As even in patients successfully treated of kala-azar visceral macrophages are presumed to harbor quiescent parasites probably for life,<sup>1</sup> some risk of relapse will always exist and patients must be advised to search for medical assistance whenever suggestive symptoms recommence.

Since even an apparent absence of parasites in splenic or bone marrow aspirate smears at the end of a treatment course does not preclude relapse,<sup>23</sup> several researchers have been looking for markers that might predict with accuracy which drug-treated, apparently cured patients would undergo recurrence. An enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen was valuable in monitoring drug therapy and in the detection of relapse<sup>24</sup>; a sharp decline in anti-rK39 antibody titers was seen in patients who evolved to definitive cure. After an initial fall, patients who relapsed showed a rise in antibodies to higher levels than those present in the pretreatment period.

Limited prospective studies show that polymerase chain reaction (PCR) tests performed in lymph nodes,<sup>25,26</sup> blood,<sup>27,28,29</sup> and bone marrow<sup>25,28</sup> can with significant precision identify a successful outcome of the disease and may be valuable in monitoring drug therapy and detecting relapse of the disease. Despite its promising prospect, predicting with accuracy which drug-treated, apparently cured patients are destined to relapse is not yet possible in all cases.

## References

1. Murray HW. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 2005; 174 (8):4916-23.
2. Murray HW, Hariprashad J, Fichtl RE. Models of relapse of experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996; 173:1041-3.
3. Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001; 6:849-54.
4. Minodier P, Robert S, Noël G, Blanc P, Retornaz K, Garnier JM. Amphotéricine B liposomale en première intention dans la leishmaniose viscérale infantile en région Provence-Alpes-Côte-d'Azur-Corse. *Arch Pediatr* 2005; 12:1102-8.
5. Sundar S, Jha TK, Sindermann H, Junge K, Bachmann P, Berman J. Oral miltefosine treatment in children with mild to moderate Indian visceral leishmaniasis. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:434-8.
6. Murray H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int J Infect Dis* 2000; 4:158-77.
7. World Health Organization Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series, 854. Geneva: World Health Organization; 1995.
8. Murray HW. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71:787-94
9. Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2185-97
10. Nyakundi PM, Rashid JR, Wasunna KM, Were JB, Muigai R, Kirigi G et al. Problems in the treatment of kala-azar: case report. *East Afr Med J* 1995;406-8.
11. Dereure J, Duong Thanh H, Lavabre-Bertrand T, Cartron G, Bastides F, Richard-Lenoble D et al. Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure. *J Infect* 2003; 47:77-81.
12. Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 1998; 56:1009- 18.
13. Thakur CP, Singh RK, Hassan SM, Kumar R, Narain S, Kumar A. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:319-23.



14. Herwaldt BL; Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46:296-306.
15. Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, Spyridis P, Stavrinadis C, Karpathios T et al. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1139-43.
16. Berhe N, Ali A, Hailu A, Yeneneh H. Relapse in Ethiopian visceral leishmaniasis (VL) patients after therapy with pentavalent antimonials: a ten year observation. *Acta Trop* 1994; 57:83-90.
17. Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL et al. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 629-633.
18. Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AA. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81: 73-84.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília:Ministério da Saúde, 2003. 120 p.
20. Benjamin B, Annobil SH, Bassuni WA. Diagnostic and management problems in childhood visceral leishmaniasis in south-western Saudi Arabia. *Ann Trop Paediatr* 1994;147-13.
21. Nyakundi PM, Wasunna KM, Rashid JR, Gachihi GS, Mbugua J, Kirigi G et al. Is one year follow-up justified in kala-azar post-treatment? *East Afr Med J* 1994; 71:453-9.
22. Bernard E, Quaranta JF, Durant J, Le Fichoux Y, Dellamonica P. Visceral leishmaniasis resistant to conventional treatments: value of amphotericin B. *Pathol Biol (Paris)* 1993; 41(8 Pt 2):817-9.
23. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354:1191-9.
24. Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:1220-4.
25. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, el-Hassan AM, el-Naeim DA, Kager PA. Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:397-400.

26. Osman OF, Kager PA, Zijlstra EE, el-Hassan AM, Oskam L. Use of PCR on lymph- node sample as test of cure of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91:845-50.
27. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38:236-40.
28. Cascio A, Calattini S, Colomba C, Scalamogna C, Galazzi M, Pizzuto M et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. *Pediatrics* 2002; 109(2):E27.
29. Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3038-41.

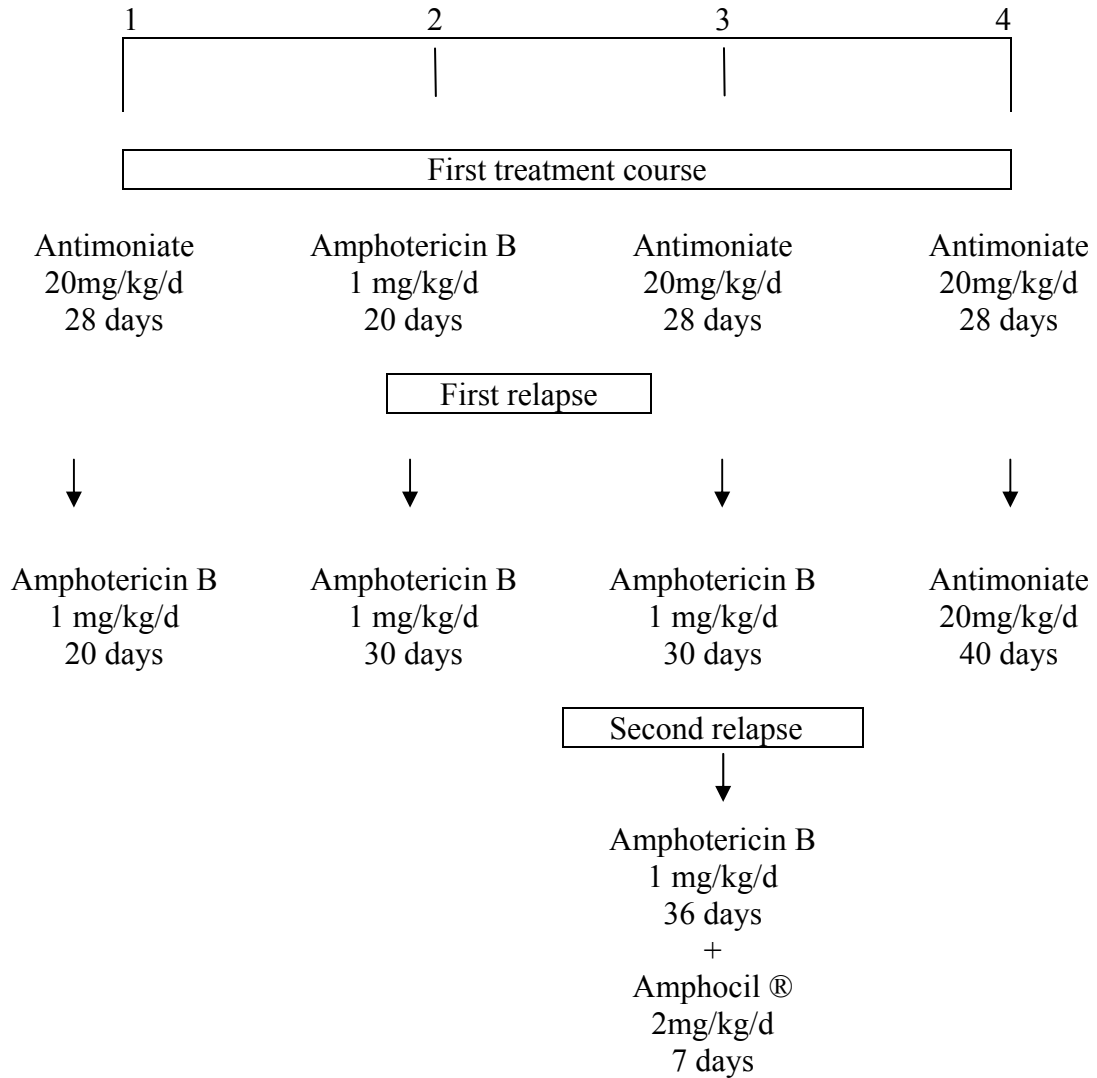


Figure 1. Treatment in first course and relapses of four patients with visceral leishmaniasis

Picture 1. Clinical and laboratorial characteristics of 4 children in first episode of visceral leishmaniasis and relapses

<b>Patient Sex Age</b>	<b>Episode or relapse/ date of adm.</b>	<b>Spleen size (cm) adm./ disch.</b>	<b>Liver size (cm) adm./ disch.</b>	<b>Hemoglobin (g/dL) adm./ disch.</b>	<b>Leukocytes (mm<sup>3</sup>) adm./ disch.</b>	<b>Platelets (x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>) adm./ disch.</b>	<b>Albumin (g/dL) adm./ disch.</b>	<b>Globulin (g/dL) adm./ disch.</b>
1 Male 2 y 8m	First episode/ Apr 30, 2002	8 / 5	5 / 3	6,5 / 7,7	4,100 / 6,700	89 / 211	2,1 / 3,7	5,4 / 6,1
	First relapse/ Sep 8, 2002	8 / 4	3 / 0	5,4 / 9,3	4,800 / 7,300	125 / 207	1,9 / 3,9	5,7 / 5,4
2 Male 11 m	First episode/ May 14, 2002	8 / 3	4,5 / 0	6,0 / 9,0	6,500 / 13,900	53 / 209	3,1 / 4,1	3,8 / 2,3
	First relapse/ Sep 2, 2002	4 / 2	1,5 / 0	6,7 / 8,5	4,200 / 10,400	59 / 197	2,9 / -	3,8 / -
3 Male 2y 6m	First episode/ Jun 5, 2003	8 / 6	6 / 4	5,8 / 9,0	3,900 / 6,100	125 / 204	2,1 / 2,9	6,8 / 6,4
	First relapse/ Nov 5, 2003	11 / 6	7,5 / 3	4,8 / 12,5	3,400 / 16,800	88 / 513	2,5 / 4,1	7,5 / 4,1
	Second relapse/ Jun 11, 2004	13 / 5	6 / 4	6,0 / 10,3	2,400 / 5,200	78 / 247	3,0 / 4,4	7,8 / 4,5
4 Male 10 y	First episode/ Sep 29, 2003	5 / 0	2 / 2	7,7 / 11	3,100 / 4,600	53 / 208	2,9 / 4,7	3,1 / 2,7
	First relapse/ Jul 19, 2005	8 / 1	1,5 / 0	8,1 / 13	1,600 / 5,100	55 / 218	3,6 / 4,7	3,8 / 3,5

adm: admission    dishc: discharge    y: years    m:months    d:day    - : not measured

## **7 . DISCUSSÃO**

As doenças que cursam com hepatoesplenomegalia e febre frequentemente desafiam os profissionais da área médica, pela existência de um amplo leque de possibilidades diagnósticas. No Mato Grosso do Sul, a presença do calazar durante muitos anos esteve associada a pacientes procedentes da região de Corumbá. Atualmente, no entanto, a expansão da doença no Estado, com características de urbanização, obriga a inclusão dessa possibilidade no diagnóstico diferencial das hepatoesplenomegalias febris em qualquer de suas localidades.

O artigo **“LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO MATO GROSSO DO SUL, REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL: UMA DOENÇA DE CURTA DURAÇÃO”** demonstra a rapidez da evolução dos casos em nosso meio, com um curto período de tempo entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico, e com alterações clínicas e laboratoriais precocemente detectadas, forma de apresentação provavelmente relacionada ao caráter epidêmico da LV em nossa região. Tem-se observado, com frequência, que em áreas urbanas com transmissão recente, a LV apresenta-se de forma epidêmica para as populações humana e canina (146); a maioria das crianças do estudo provinha de áreas onde a doença nunca havia sido registrada anteriormente.

Em nosso estudo, demonstramos que, em indivíduos nos quais as reservas orgânicas são pouco comprometidas, como nas crianças (geralmente sem doença de base) a doença mais rápida, se reconhecida precocemente e tratada adequadamente, origina uma letalidade mais baixa. Nosso último óbito foi registrado em fevereiro de 2002; estamos portanto há 4 anos sem casos fatais no serviço de Pediatria. A idade, no entanto, é um dos fatores de risco mais importantes para a morte no calazar nos extremos da vida (7).

A força da infecção é inversamente relacionada à distribuição da idade em doenças que geram longa imunidade. Quando a transmissão é maior em áreas endêmicas, muitas crianças pequenas adoecem, o que pode aumentar a mortalidade. Nos locais de introdução recente, mais pessoas mais velhas não imunes são infectadas e morrem (7), elevando a mortalidade ou letalidade, fato agravado pela falta de experiência dos médicos no reconhecimento da doença recentemente introduzida (7).

Isso foi evidenciado na epidemia de Três Lagoas; houve relato de maior número de óbitos em adultos, a maioria com doença de base (10).

A existência de pacientes com diagnóstico realizado com mais de 30 dias de evolução sugere a falta de reconhecimento da LV por profissionais da área médica, fato já descrito por outros autores (55). Em nosso estudo, 74,2% das crianças com mais de 30 dias de evolução eram provenientes de áreas onde a instalação da doença era muito recente, e a quase totalidade dos pacientes já havia procurado por atendimento médico anteriormente. Isso evidencia a necessidade urgente de repetir-se a capacitação dos profissionais locais da área médica para a realização de um diagnóstico mais precoce. Essas ações não podem ser descontinuadas, e devem ser repetidas periodicamente.

O segundo estudo, **COMPARISON OF CONVENTIONAL METHODS FOR DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN IN THE CENTER-WEST REGION OF BRAZIL**, já aceito para publicação, descreve os métodos convencionalmente utilizados para o diagnóstico da LV. As características clínicas e epidemiológicas da doença na maioria das vezes não são específicas, e confundem-se com diversas outras patologias; é, portanto, o diagnóstico laboratorial que subsidia a indicação do tratamento.

No Brasil, os métodos convencionais de diagnóstico ainda são utilizados na maioria das áreas onde a LV ocorre. O estudo avaliou a microscopia direta, a cultura de aspirado medular e a Reação de Imunofluorescência Indireta, em relação ao tempo de evolução e ao tamanho do baço no momento da admissão. A microscopia direta apresentou mais resultados positivos em crianças com baços de maior tamanho, o que sugere que em fases muito iniciais, quando os pacientes apresentam visceromegalia pouco expressiva, esse exame pode apresentar resultados negativos.

O artigo também ressalta os vários fatores que influem na positividade da microscopia direta, como a qualidade do material de aspirado de medula, a experiência do microscopista, o número de campos examinados e o tempo gasto para a leitura das lâminas, em casos difíceis. Em situações ideais, a sensibilidade do método poderia aproximar-se de 90% (52).

Em nosso estudo, experiência e tenacidade dos microscopistas foi um atributo indispensável na obtenção de resultados positivos nos exames de mielograma. Alguns autores ressaltam a existência de diferentes graus de parasitismo em pacientes com LV, determinados pelo tipo de resposta imunológica (52). A carga parasitária pode ser escassa, moderada ou elevada; apesar de as crianças pequenas encontrarem-se

geralmente situadas no grupo de pacientes altamente parasitados (52), muitas vezes o diagnóstico foi dificultado pelo pequeno número de parasitas nas amostras examinadas, característica esta que vem sendo notada na região: evolução rápida de casos e escassez de parasitas nas amostras clínicas (10). Estudos da imunidade desses pacientes, portanto, devem ser realizados, na tentativa entender-se melhor o processo de desenvolvimento de doença.

A associação da microscopia direta à cultura foi capaz de fornecer o diagnóstico em 98,5% dos casos, ou seja, na quase totalidade dos mesmos. Como o mielograma é o método preferido pelos profissionais de saúde em nosso meio, muitas vezes a sorologia não é solicitada. Na presença de dados clínicos e laboratoriais, uma sorologia positiva reagentemente autoriza o início do tratamento (59). Os dados apresentados ressaltam a necessidade da associação de mais de um método diagnóstico para a obtenção da maior positividade no diagnóstico da LV em crianças, enfatizando a necessidade da realização da sorologia como medida complementar.

Na realidade brasileira, métodos convencionais de diagnóstico são ainda indispensáveis. O investimento na capacitação de técnicos especializados na realização dessas técnicas deve ser incentivado.

O terceiro trabalho, **“SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF PCR IN GIEMSA-STAINED SLIDES FOR DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN”**, é o primeiro estudo no Estado que avalia a utilização de um método de biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase - PCR - no diagnóstico da LV em pacientes com a doença, através da detecção de DNA de *Leishmania* em lâminas de aspirado medular, coradas por Giemsa e estocadas. O teste demonstrou elevada sensibilidade e especificidade.

No Brasil, um pequeno número de trabalhos utilizando métodos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral estão sendo conduzidos, estudos que poderiam auxiliar a compreensão da validade destes no diagnóstico da doença, bem como dos diversos aspectos relacionados à sua epidemiologia nas áreas endêmicas (64). Portanto, nosso estudo é uma colaboração, apesar de pequena, na utilização do método, que ainda carece de validação para sua utilização no diagnóstico da LV.

Quando avaliamos os métodos convencionais de diagnóstico, ficou patente a necessidade do exame exaustivo das lâminas de mielograma para a obtenção de resultados positivos, em casos de pacientes pouco parasitados. Os métodos de PCR são alternativas promissoras no diagnóstico das leishmanioses, pois combinam alta

sensibilidade e especificidade à possibilidade de sua aplicação direta a amostras de tecidos diversos de uma forma bastante rápida, quando comparados com métodos tradicionais (64).

A PCR mostrou-se útil no diagnóstico de casos difíceis. A possibilidade de detecção de DNA em lâminas de aspirado medular mostra uma nova perspectiva para a elucidação de casos que apresentaram resultados negativos por outros métodos.

O aspirado de medula óssea é um material precioso para a realização do diagnóstico; lâminas para análise desse material podem ser facilmente enviadas para centros maiores de pesquisa. Com o início das atividades do laboratório de Biologia Molecular em nossa Universidade, em breve essa realidade será possível no Estado.

O trabalho também mostra que materiais biológicos arquivados são valiosas fontes de pesquisa e que sua conservação permite sua utilização em métodos mais sofisticados em tempos futuros, colaborando para o entendimento de uma determinada patologia em uma região específica.

O quarto trabalho, **“EXPERIÊNCIA HOSPITALAR NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS NO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL”**, descreve os aspectos mais importantes do tratamento da LV em crianças internadas em um hospital universitário de referência. Praticamente não encontramos na literatura trabalhos que relatem detalhadamente o tratamento, especialmente a frequência de reações adversas ao antimônio em crianças brasileiras.

O estudo confirmou que o antimoniato de meglumina é muito eficaz e bem tolerado em crianças. AmBisome® é a melhor droga para tratamento quando o custo das medicações não é fator limitante (147), como em países ricos do sul da Europa, o que não é o caso dos países em desenvolvimento. A diferença de custo entre o antimoniato de meglumina e a anfotericina B lipossomal impede o uso em larga escala desse medicamento: o preço de 25 ampolas de Glucantime® situa-se atualmente em torno de R\$ 156,58, enquanto que o de 10 frascos de AmBisome®, em torno de R\$ 12.950,80 (148). É provável que esse tratamento não pudesse ser estabelecido como primeira escolha em nosso meio, ainda mais em situações de epidemia, como a que estamos enfrentando.

Várias dificuldades foram detectadas durante o manejo das drogas, como superdosagem e subdosagem de Sb<sup>v</sup>, a ocorrência, felizmente rara, de alguns efeitos adversos graves, a troca inadequada de esquema terapêutico, o uso de antimônio com elevados níveis de metais pesados fornecido temporariamente pelo Ministério da Saúde,



a ocorrência de hipopotassemia na maioria das crianças que utilizaram anfotericina B, a constatação de recidivas. Esses dados mostram a complexidade do tratamento da leishmaniose visceral.

Há doentes portadores de LV que apresentam uma resposta terapêutica mais lenta; geralmente, são casos de doença mais avançada. É necessário evitar-se a troca inapropriada do antimoniato para esquema de segunda linha, sem que a indicação desta conduta esteja muito bem avaliada, a fim de preservar-se a droga da resistência que ocorre devido ao seu uso incorreto e por tempo insuficiente.

A infecção bacteriana secundária é um outro fator que colabora para uma resposta lenta ao tratamento. Várias vezes notamos uma falta de progressão na melhora clínica e laboratorial dos pacientes quando a infecção bacteriana se instala. Apesar da dificuldade de se diferenciar a presença desta das manifestações próprias da doença, o combate agressivo aos processos infecciosos pode ser medida salvadora da vida. Novos estudos devem ser realizados, definindo-se as indicações de antibioticoterapia em crianças com leishmaniose visceral.

O quinto estudo, **“UNSATISFACTORY RESPONSE IN THE TREATMENT OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZILIAN CHILDREN: THE PROBLEM OF RELAPSE”**, focaliza o problema da recidiva após tratamento, fato reconhecidamente possível, desde que o parasito pode permanecer quiescente em macrófagos por toda a vida.

Recidivas após o tratamento da leishmaniose visceral podem ocorrer mesmo quando este é realizado de maneira adequada, por tempo suficiente, com drogas potentes, como anfotericina B convencional ou lipossomal, já que a manutenção de um estado livre de relapso depende da resposta imunológica do hospedeiro. Há pacientes, entretanto, que apresentam recidiva da doença quando o tempo ou a dose total de tratamento foram insuficientes para proporcionar a cura, resultando em esquemas incompletos. Ao final de um curso de tratamento, portanto, deve-se procurar identificar aqueles que poderiam necessitar de terapia mais prolongada.

O artigo procurou analisar quais dados poderiam sinalizar a ocorrência de recidiva em 4 pacientes que apresentaram relapso após terapia. Os mais significativos foram: a pequena diminuição do tamanho do baço ao final de um curso de tratamento, a presença de abundantes formas amastigotas na medula óssea por ocasião da admissão e a ausência de diminuição progressiva do tamanho do baço durante as visitas de seguimento pós-tratamento. Esses parâmetros não são encontrados em todos os casos,

mas deve-se sempre procurar detectar aqueles pacientes que apresentem essas alterações, o que poderia colaborar de forma importante para a diminuição da ocorrência de relapso.

A alta densidade parasitária é um dos fatores relacionados à morte no calazar (149). Sugere-se tratamento prolongado em pacientes altamente parasitados.

## **8. CONCLUSÕES**

- A leishmaniose visceral apresenta-se como uma doença de evolução rápida em crianças no Mato Grosso do Sul, o que evidencia que essa forma de apresentação possa estar relacionada a ocorrência da doença em áreas epidêmicas, ou de introdução recente.
- Quando os profissionais de saúde estão mais atentos à presença da LV, essa forma de apresentação permite um diagnóstico mais precoce dos casos; o tratamento adequado de pacientes em fase pouco avançada resulta em uma evolução favorável na maioria destes.
- Os métodos convencionais de diagnóstico ainda são imprescindíveis em nossa região; a associação da microscopia direta de aspirado medular à sorologia por Imunofluorescência, permite a comprovação laboratorial da LV na quase totalidade dos casos.
- A PCR mostrou-se um método altamente sensível e específico para o diagnóstico da LV.
- Os antimoniais pentavalentes, utilizados com sucesso no tratamento da LV há mais de 50 anos, continuam sendo as drogas mais adequadas para a utilização em crianças, pois causam efeitos adversos de pouca gravidade, geralmente reversíveis, raras vezes precisam ser temporariamente suspensos durante o tratamento, e são muito eficazes, como demonstrado em nosso estudo.
- O tratamento da leishmaniose visceral é complexo, envolvendo muitos fatores, havendo necessidade de capacitação de profissionais para que o mesmo possa ser conduzido com sucesso.
- A baixa letalidade observada no serviço onde o estudo foi realizado (2,6%) só foi obtida devido à monitorização constante das alterações clínicas e

laboratoriais e do controle estreito das drogas utilizadas, e tratamento de suporte agressivo em casos graves.

- O aparecimento de recidivas, geralmente relacionadas a esquemas incompletos, demonstra que alguns pacientes podem necessitar de terapia de duração mais prolongada. O tratamento da leishmaniose visceral deve ser adequado na dose e na duração, para evitar o aparecimento de recidiva.
- O tratamento deve ser individualizado. Sua duração deve levar em conta a extensão da doença no início da terapia. A sugestão de terapia mais prolongada (por 40 dias) em pacientes altamente parasitados é uma das medidas que provavelmente poderiam auxiliar na prevenção de recidiva após o tratamento.
- O objetivo primordial do manejo dos pacientes com leishmaniose visceral é prevenir a morte, sempre inevitável se a mesma não é tratada. Muitas pessoas continuam morrendo devido à doença, muitas vezes por diagnóstico tardio, quando os casos evoluem sem reconhecimento até uma fase de tamanha gravidade que pouco se pode fazer. Os trabalhos apresentados refletem a necessidade de contínuo investimento na capacitação de profissionais de saúde, tanto da área médica, quanto daqueles que realizam o diagnóstico laboratorial, habilitando-os à elaboração de uma suspeita diagnóstica precoce dos casos, à confirmação etiológica e ao tratamento adequado dos pacientes, única maneira atual de vencer a morte pela doença.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 2003; 326 (7385):377-82
2. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelart M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002; 2 (8):494-501.
3. Murray HW. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71(6):787-94.
4. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366 (9496):1561-77
5. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27 (5):305-18.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento, de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120 p.
7. Costa. CHN. Present situation and new perspectives for the treatment of visceral leishmaniasis in the New World. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. [on line]. Brasília, Brasil, 2005. [capturado em 11 de agosto de 2006]. Disponível em: [bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES\\_Inf\\_final\\_leish\\_2005.pdf](http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES_Inf_final_leish_2005.pdf).
8. Lindoso JAL, Goto H. Leishmaniose Visceral: situação atual e perspectivas futuras. [on line]. BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista. Informe Mensal sobre Agravos à Saúde Pública Fevereiro, 2006 Ano 3 Número 26. [capturado em 22 de agosto de 2006]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26\\_lva.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_lva.htm)
9. Nunes VLB, Yamamoto YY, Rego Jr FA, Dorval MEC, Galati EAB, Oshiro ET, et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras* 1988; 8:17-21.
10. Oliveira ALL. Estudos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2000-2005. Rio de Janeiro; 2006. Doutorado [Medicina Tropical]. Instituto Oswaldo Cruz.
11. Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso do Sul. Sinan. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Boletim interno. Setembro, 2006.

12. Rey LC. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Tonelli E, Freire LMS editores. Doenças infecciosas na infância e na adolescência. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2000, v 2, p.1239-1250.
13. Prata A, Silva LA. Calazar. In: Coura JR editor. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 713-737.
14. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 2004; 7: 338-49.
15. Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354 (9185):1191-9.
16. Galati EA, Nunes VL, Rego Júnior Fde A, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saude Publica 1997; 31(4):378-90.
17. dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998; 12(3):315-7.
18. Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, 1956.
19. Arias JR, Monteiro OS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis 1996; 2(2):145-6.
20. Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Arq Bras.Med Vet Zootec 2001; 53 (1):1-8.
21. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(8):811-27.
22. Falqueto A, Ferreira AL. Reservatórios extra-humanos do Complexo Leishmânia e dinâmica de transmissão da infecção ao homem. In: Coura JR editor. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 739-753.
23. Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol 2004; 120(3):229-33.
24. de Souza AI, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL.. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Vet Parasitol 2005; 128(1-2):41-5.

25. Costa CH, Gomes RB, Silva MR, Garcez LM, Ramos PK, Santos RS, et al. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 2000; 182(3):997-1000.
26. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2006; 48(3):151-156.
27. Murray HW. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int J Infect Dis* 2000; 4:158-77.
28. Kafetzis DA, Maltezou HC. Visceral leishmaniasis in paediatrics. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15(3):289-94.
29. Blackwell JM, Mohamed HS, Ibrahim ME. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. *Trends Parasitol* 2004; 20(6):268-74.
30. Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(4):334-7.
31. Badaró R, Jones T, Carvalho E, Sampaio D, Reed S, Barral A, R et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1986; 154(6):1003-11.
32. Gama ME, Costa JM, Gomes CM, Corbett CE. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(8): 889-93.
33. Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003; 49(1):31-8.
34. Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 1998; 56(6):1009-18.
35. Caldas AJ, Costa J, Aquino D, Silva AA, Barral-Netto M, Barral A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? *Acta Trop* 2006; 97(3):252-8.
36. Duarte MI, da Matta VL, Corbett CE, Laurenti MD, Chebabo R, Goto H. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83(1):73-6.
37. Costa NSS, Cerri GG. Alterações pulmonares intersticiais na leishmaniose visceral: avaliação pela tomografia computadorizada de alta resolução. *Radiol Brás* 1999; 32:159-167.
38. Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1990; 162(6):1354-9.

39. Salgado Filho N, Ferreira TM, Costa JM. Involvement of the renal function in patients with visceral leishmaniasis (kala-azar). *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(2):217-21
40. Khaldi F, Bennaceur B, Bem Othman H, Achouri E, Avachi R, Regaieg. Les formes sévères d'atteinte hépatique au cours de la leishmaniose viscérale. A propos de 7 cas. *Arch Fr Pédiatr* 1990; 47(4):257-60.
41. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW. Clinical aspects of kala-azar in children from the Sudan: a comparison with the disease in adults. *J Trop Pediatr* 1992; 38(1):17-21.
42. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection* 2003; 31(3):174-7.
43. Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(2):298-319.
44. Masmoudi A, Maalej N, Mseddi M, Souissi A, Turki H, Boudaya S, et al. Glucantime par voie parentérale: bénéfique versus toxicité. *Méd Mal Infect* 2005; 35(1):42-5.
45. Gasser RA, Magill AJ, Oster CN, Franke ED, Grögl M, Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1994; 18(1):83-90.
46. Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and Leishmania in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58(4):436-43.
47. Shahi SK, Ranga S, Thakur P, Khurana SK, Talib VH. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Indian J Pathol Microbiol* 1998; 41(3):361-72.
48. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123(3):311-30.
49. Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Méd* 2003; 49(1):55-60.
50. Zijlstra EE, Ali M.S, el-Hassan AM, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86(5):505-7.
51. Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82(1):66-8.



52. da Silva MR, Stewart JM, Costa CH. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72(6):811-4.
53. Campos Jr D. Características clínico-epidemiológicas do Calazar na criança. Estudo de 75 casos. *J Pediatr (Rio J)* 1995; 71(5):261-5.
54. Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AAM. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81(1):73-8.
55. Queiroz MJ, Alves JG, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80(2):141-6.
56. Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78(2):120-7.
57. Pedrosa CM, da Rocha E.M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37(4):300-4.
58. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saúde Publica* 2004; 20 (1):259-65.
59. Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. [on line]. Brasília, Brasil, 2005. [capturado em 11 de agosto de 2006]. Disponível em: [bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES\\_Inf\\_final\\_leish\\_2005.pdf](http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES_Inf_final_leish_2005.pdf).
60. Silva ES, Schoone GJ, Gontijo CM, Brazil RP, Pacheco RS, Schallig HD. Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Kinetoplastid Biol Dis* 2005; 4:4.
61. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21(2):123-52.
62. Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2001; 78(1):11-6.
63. Britto C, Pirmez C, Fernandes Octavio. Técnicas básicas de diagnóstico molecular em doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura JR editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 195-23.

64. Cupolillo E. Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. [on line]. Brasília, Brasil, 2005. [capturado em 11 de agosto de 2006]. Disponível em: [bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES\\_Inf\\_final\\_leish\\_2005.pdf](http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES_Inf_final_leish_2005.pdf).
65. Clark DP, Russel LD. Molecular biology made simple and fun. Vienna: Cache River Press; 1997.p 269-287. PCR. The polymerase chain reaction and its many uses.
66. White TJ, Madej R, Persing DH. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv Clin Chem* 1992; 29:161-96.
67. Kennedy WP. Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of *Leishmania* solates by recombinant DNA techniques and in situ hybridisation. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 12: 313-25.
68. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71:267-75.
69. Brewester S, Aslett M, Barker DC. Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitol Today* 1998; 14 (1): 437-438.
70. Barker DC. DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitol Today* 1987; 3(6):177-84.
71. Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7):3038-41.
72. da Silva ES, Gontijo CM, Pacheco Rda S, Brazil RP. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol Res* 2004; 3(2):251-7.
73. De Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh Karki BM, Decuypere S, et al. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99(1):25-31.
74. Adhya S, Hassan MQ, Mukherjee S, Manna PP, Basu A, Sen S, et al. Visceral leishmaniasis in India: promises and pitfalls of a PCR-based blood test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 Suppl 1:S179-83.
75. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):236-40.
76. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of

- visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):613-7.
77. Gatti S, Gramegna M, Klersy C, Madama S, Bruno A, Maserati R, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: the sensitivities and specificities of traditional methods and a nested PCR assay. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98(7):667-76.
78. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98(1):12-7.
79. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32(3):746-99.
80. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997; 35(10):2454-7.
81. Osman OF, Oskam L, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, El-Hassan AM, et al. Use of PCR for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6):1621-4.
82. Cascio A, Calattini S, Colomba C, Scalamogna C, Galazzi M, Pizzuto M, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. *Pediatrics* 2002; 109(2):E27.
83. Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsio L, et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1):357-61.
84. Salotra P, Sreenivas G, Pogue GP, Lee N, Nakhasi HL, Ramesh V, et al. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3):849-54.
85. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):236-40.
86. Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8(6):1220-4.

87. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, el-Hassan AM, el-Naeim DA, Kager PA. Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92(4):397-400.
88. Osman OF, Kager PA, Zijlstra EE, el-Hassan AM, Oskam L. Use of PCR on lymph- node sample as test of cure of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91(7):845-50.
89. Shaw J, Grimaldi G, Cupolillo E. Identificação de *Leishmania*. In: Coura JR editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 733-737.
90. Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(8):2185-97.
91. Minodier P, Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Gire C, Garnier JM, Dumon H. Traitement de la leishmaniose viscérale infantile. *Arch Pediatr* 1999; 6(1):59-66.
92. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19(11):502-8.
93. Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*.2001; 6(11):849-54.
94. Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2001; 190 (1-2):89-92.
95. Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(5):397-401.
96. Sundar S. Indian kala-azar--better tools needed for diagnosis and treatment. *J Postgrad Med* 2003; 49(1):29-30.
97. di Martino L, Davidson RN, Giacchino R, Scotti S, Raimondi F, Castagnola E, et al. Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin B. *J Pediatr* 1997; 131(2):271-7.
98. Barratt G, Legrand P. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Current Opin Infect Dis* 2005; 18(6):527-30.
99. Minodier P, Robert S, Noël G, Blanc P, Retornaz K, Garnier JM. Amphotéricine B liposomale en première intention dans la leishmaniose viscérale infantile en région Provence-Alpes-Côte-d'Azur-Corse. *Arch Pediatr* 2005; 12(7):1102-8.
100. Badaró R, Duarte MIS. Leishmaniose Visceral. In: Veronesi R, Foccacia R, editores. *Tratado de Infectologia*. São Paulo:Atheneu; 2002.p.1254-1279.
101. Rapp C, Simon F, Dordain ML. N-methyl glucamine antimoniate or Glucantime. *Med Trop (Mars)* 2000; 60(4):342-3.

102. Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med* 1992; 46(3):296-306.
103. Ribeiro AL, Drummond JB, Volpini AC, Andrade AC, Passos VM. Electrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(3):297-301.
104. Chulay JD, Spencer HC, Mugambi M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34(4):702-9.
105. Ortega-Carnicer J, Alcázar R, De la Torre M, Benezet J. Pentavalent antimonial-induced torsade de pointes. *J Electrocardiol* 1997; 30(2):143-5.
106. Mattos MS. Pancreatite: um dos efeitos adversos da terapia antimonial na leishmaniose. *An Bras Dermatol* 2000; 76(1):45-50.
107. Rodrigues ML, Costa RS, Souza CS, Foss NT, Roselino AM. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41(1):33-7.
108. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Grave. Normas e Condutas. Brasília-DF, junho 2005. 51p.
109. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004; 10(6):307-15.
110. Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68(2):151-62.
111. Tavares W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 521-535: Poliênicos e outros antibióticos antifúngicos.
112. Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis* 2005; 5 (12):763-74.
113. Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK. Comparison of regimens of amphotericin B deoxycholate in kala-azar. *Indian J Med* 1996; 103:259-63.
114. Thakur CP, Singh RK, Hassan SM, Kumar R, Narain S, Kumar A. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer

- modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(3):319-23.
- 115.Thakur CP, Narayan S. A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98(2):129-38.
- 116.Kayser O, Olbrich C, Croft SL, Kiderlen AF. Formulation and biopharmaceutical issues in the development of drug delivery systems for antiparasitic drugs. *Parasitol Res* 2003; 90 Suppl 2:S63-70.
- 117.Croft SL, Davidson RN, Thornton EA. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob chemother* 1991; 28 Suppl B:111-8.
- 118.Boswell GW, Buell D, Bekersky I. AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review. *J Clin Pharmacol* 1998; 38(7):583-92.
- 119.Desjeux P. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. Options thérapeutiques pour la leishmaniose viscérale. *Med Mal Infect* 2005; Suppl 2:S74-6.
- 120.Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ* 1998; 76(1):25-32.
- 121.Davidson RN, Di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Russo R, Gaeta GB, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q J Med* 1994; 87(2):75-81.
- 122.Minodier P, Robert S, Noël G, Blanc P, Retornaz K, Garnier JM. Amphotéricine B liposomale en première intention dans la leishmaniose viscérale infantile en région Provence-Alpes-Côte-d'Azur-Corse. *Arch Pediatr* 2005; 12(7):1102-8.
- 123.Kafetzis DA, Velissariou IM, Stabouli S, Mavrikou M, Delis D, Liapi G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(1):26-30.
- 124.Dietze R, Milan EP, Berman JD, Grogl M, Falqueto A, Feitosa TF, et al. Treatment of Brazilian kala-azar with a short course of amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion). *Clin Infect Dis* 1993; 17(6):981-6.
- 125.Dietze R, Fagundes SM, Brito EF, Milan EP, Feitosa TF, Suassuna FA, et al. Treatment of kala-azar in Brazil with Amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion) for 5 days. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(3):309-11.

126. Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral A, et al. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med* 1990; 322 (1):16-21.
127. Sundar S, Rosenkaimer F, Lesser ML, Murray HW. Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1995; 171(4): 992-6.
128. Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, et al. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65 (6):685-9.
129. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002; 347 (22):1739-46.
130. Sundar S, Jha TK, Sindermann H, Junge K, Bachmann P, Berman J. Oral miltefosine treatment in children with mild to moderate Indian visceral leishmaniasis. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22 (5):434-8.
131. Bhattacharya SK, Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, et al. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* 2004; 38(2):217-21.
132. Prasad R, Kumar R, Jaiswal BP, Singh UK. Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. *Indian J Pediatr* 2004; 71(2):143-4.
133. Sundar S; Murray HW. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ* 2005; 83(5):394-5.
134. Santangelo R, Paderu P, Delmas G, Chen ZW, Mannino R, Zarif L, et al. Efficacy of oral coxleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(9):2356-60
135. Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997; 25(5):1240-2.
136. Costa CH, Vieira JB. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34(2):223-8.
137. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002; 186(9):1314-20.
138. Moreira ED, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de Carvalho. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol* 2004; 122(4):245-52.

139. David JR, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick-Kendrick R, Lima JW. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(6):839-47.
140. Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol* 2004; 34(1):55-62.
141. Saraiva EM, de Figueiredo Barbosa A, Santos FN, Borja-Cabrera GP, Nico D, Souza LO, et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine* 2006; 24(13):2423-31.
142. Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005; 21(5):244-9.
143. Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Mato Grosso do Sul. Sinan. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Boletim interno. Agosto, 2006.
144. Galati EA, Nunes VL, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(2):175-93.
145. de Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo de flebotômíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad Saude Publica* 2003; 19(4):933-44.
146. Elkoury ANSM. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. [on line]. Brasília, Brasil, 2005. [capturado em 11 de agosto de 2006]. Disponível em: [bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES\\_Inf\\_final\\_leish\\_2005.pdf](http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES_Inf_final_leish_2005.pdf).
147. Bryceson A. Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2001; 190(1-2):81-4.
148. HiDoctor [homepage na Internet]. Brasil, 2006. [capturado em 27 de agosto de 2006] Disponível em: <http://tabprecos.cypass.net/index.asp?>
149. Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt BL. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med* 1996; 124(7):664-72.