



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

JOSÉ NIVON DA SILVA

ESTUDO DO TESTE RÁPIDO IMUNOENZIMÁTICO
ATRAVÉS DO ANTÍGENO RECOMBINANTE rK39 PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
AMERICANA: Correlação Clínico-Terapêutica

Fortaleza

2004

JOSÉ NIVON DA SILVA

**ESTUDO DO TESTE RÁPIDO IMUNOENZIMÁTICO
ATRAVÉS DO ANTÍGENO RECOMBINANTE rK39 PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
AMERICANA: Correlação Clínico-Terapêutica**

Dissertação apresentada ao Corpo Docente do
Curso de Mestrado em Patologia do
Departamento de Patologia e Medicina Legal
da Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará, para requisito parcial do
título de Mestre em Patologia.

Orientador: Dr. Ivo Castelo Branco Coêlho

Fortaleza

2004

S58e Silva, José Nivon da

Estudo do teste rápido imunoenzimático através do antígeno recombinante rK39 para diagnóstico de leishmaniose visceral americana: correlação clínico-terapêutica / José Nivon da Silva. – Fortaleza, 2004. 112f. : il.

**Orientador: Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coêlho
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Patologia.**

1. Leishmaniose Visceral 2. Técnicas e Procedimentos de Laboratório 3. Recombinação Genética 4. Antígeno I. Coêlho, Ivo Castelo Branco (Orient.) II. Título.

CDD: 616.9364

JOSÉ NIVON DA SILVA

**ESTUDO DO TESTE RÁPIDO IMUNOENZIMÁTICO ATRAVÉS DO ANTÍGENO
RECOMBINANTE rK39 PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
AMERICANA: Correlação Clínico-Terapêutica**

Dissertação apresentada ao Corpo Docente do Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, para requisito parcial do título de Mestre em Patologia.

Prof. Ivo Castelo Branco Coêlho

Orientador

Prof. Dr. Luis Carlos Rey

Membro

José Wellington de Oliveira Lima

Membro

Antônio Wilson de Vasconcelos

Membro

Fortaleza

2004

É claro que sem que se modifiquem as condições de vida, através da elevação da renda *per capita* das populações das áreas afetadas, da educação sanitária e do saneamento básico das habitações, tornando-as impróprias à vida de animais reservatórios e vetores, a redução da moléstia não poderá marchar para a erradicação, nem mesmo para o controle efetivo.

Joaquim Eduardo de Alencar

- À minha esposa, **Maria da Luz de Almeida**, e meus filhos, **Álvaro Brício Assumpção Almeida e Silva** e **Sophia Gabriela Almeida e Silva**, por compreender os momentos da minha ausência em suas vidas, minha fortaleza, meu porto seguro.
- A meus pais **Antônio José da Silva (Antônio Baião)** e **Francisca Josefa da Silva (Nazinha)** e irmãos **José Napoleão, Wilson Madeiro, Juarez Antônio, Maria Erinita, Wellington Antônio, Ebenone Antônio, Cícero Antônio, Alboino Antônio**, pela constante luta em mostrar que somente através da educação teremos uma nação justa e igualitária, na marcha para o desenvolvimento globalizado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

- "A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível".

- A Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP, pelo apoio financeiro concedido através de bolsa de pesquisa, de grande importância para conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Ivo Castelo Branco Coelho** por sua inestimável orientação científica, por sua paciência, seus conselhos e sugestões, por sua amizade e por todo o incentivo dado à realização deste trabalho.

Ao **Dr. José Wellington de Oliveira Lima**, pelo apoio estatístico, que foi de fundamental importância para os meus resultados.

À **prof^a. Izabel de Alencar Barros Vasconcelos** por suas sugestões e pela contribuição para o aperfeiçoamento do trabalho.

Ao **Dr. Antônio Wilson de Vasconcelos**, pelas orientações sobre a fisiopatologia e mecanismos causadores de lesões patológicas, encontradas nos diversos órgãos e sistemas, ocasionadas pela Leishmaniose visceral

Ao Professor **Dr. Roberto Badaró**, pioneiro no estudo do Antígeno Recombinante K39 em Salvador-Bahia, e pela dedicação e colaboração ao engrandecimento inequívoco da arte de fazer medicina.

Ao **Dr. Luis Carlos Rey**, pela colaboração durante o decorrer da pesquisa e pela contribuição na elaboração dos resultados. Meu muito obrigado.

Aos **Drs. Christiane Araújo Chaves Leite e Robério Dias Leite**, pela notoriedade social e científica relevante ao saber médico, reconhecidamente empregado a Pediatria no Estado e no País

À **Dr^a Evangelina Roberto Pompeu**, diretora do Hospital São José de Doenças Infecciosas. Ao **Dr. Eugênio Lincoln Campos Maia**, diretor do Hospital Universitário Walter Cantídio e **Dr^a Ana Maria Cavalcante**, diretora do Hospital Infantil Albert Sabin, por

permitir o acesso irrestrito na busca ativa de pacientes internados nas dependências das referidas unidades terciárias de saúde pública.

Aos residentes de Infectologia do Hospital São José de Doenças Infecciosas **Joseval da Rocha Viana, Mariana Mota Moura Fé, Renata Amaral de Moraes, Bráulio Matias de Carvalho, Edson Buhamna Abreu e Ronaldo Alves Alexandre** pela inestimável colaboração prestada a discussão de casos clínicos e diagnósticos diferenciais dos pacientes envolvidos no protocolo de pesquisa.

À **prof^a. Tatiana Pascholette da Silva Rodrigues** pelo valioso auxílio nos testes por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Aos professores do Curso de Mestrado em Patologia pelos suportes prático e teórico fundamentais.

Aos acadêmicos de Medicina da UFC **Clarissa Férrer Carvalho, Rodrigo de Paiva Bezerra, José Mário de Lima Júnior, Rafael de Oliveira Cavalcante e Samuel Luz Moreno** que contribuíram brilhantemente para a agilização do trabalho, revisão de prontuários médicos, digitação dos textos e levantamento bibliográfico.

A **Alísio Bandeira Girão** pelo fundamental apoio na realização dos testes de imunofluorescência indireta para Calazar.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal que prestaram valoroso auxílio desde o início do trabalho.

As minhas amigas do Departamento de Patologia da UFC **Francileide Paiva de Oliveira e Paula Paz Palácio** pelo apoio durante a digitação desta pesquisa.

Aos pacientes, por terem sido a fonte maior e inesgotável de contribuição para o saber, fomentando a elaboração e conclusão desta pesquisa.

LISTA DE SIGLAS E CONCEITOS:

ADA -	Adenosina desaminase
Anfixenose -	Infecção cuja transmissão se processa de maneira intercambiável entre o homem e animais
Antroponose -	Infecção cuja transmissão se restringe aos seres humanos e assim estes representam o papel de reservatórios.
Antropozoonose -	Infecção transmitida ao homem, a partir de reservatório animal.
APC -	Célula apresentadora de antígeno
ATP -	Adenosina trifosfato
A/G -	Relação entre albumina e globulina
BHC -	Hexacloroetano
C_{1q} -	Componente 1q do sistema complemento
C₃ -	Componente 3 do sistema complemento
C_{3b} -	Componente 3b do sistema complemento
C₉ -	Componente 9 do sistema complemento
Caso -	Pessoa ou animal infectado ou doente apresentando características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas específicas.
Caso índice -	Primeiro entre vários casos de natureza similar e epidemiologicamente relacionados.
Caso esporádico -	É o caso que, segundo informações disponíveis, não se apresenta epidemiologicamente relacionado a outros já conhecidos.
Caso alóctone -	É o doente, atualmente presente na área sob consideração, que tenha adquirido a sua doença em outra região de onde emigra ou onde esteve ocasionalmente.
Caso autóctone -	É o caso de doença que teve origem dentro dos limites do lugar em referência ou sob investigação.
CCDA -	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
CD₄⁺ -	Grupo de diferenciação número 4 (presença da célula CD ₄)

CD₈⁺ -	Grupo de diferenciação número 8 (presença da célula CD ₈)
CIE -	Contraímunoeletroforese
DDT -	Diclorodifeniltricloroetano
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
DTH -	Hipersensibilidade do tipo tardio (hipersens, retardada)
ELISA -	Enzyme-linked immunossorbent assay
FNS -	Fundação Nacional de Saúde
gp 63 -	Glicoproteína 63
HIAS -	Hospital Infantil Albert Sabin
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSJ -	Hospital São José
HUWC -	Hospital Universitário Walter Cantídio
IFN-γ -	Interferon gamma
IgM, IgG -	Imunoglobulinas tipo M e G
IL₂, IL₄, IL₅, IL₆, IL₁₀, IL₁₂: -	Interleucinas 2, 4, 5, 6, 10 e 12
Imunogenicidade -	Capacidade que tem o bioagente para induzir imunidade no hospedeiro.
Infectividade -	Capacidade que tem certos organismos de penetrar e desenvolver-se ou multiplicar-se no novo hospedeiro, ocasionando infecção.
Kda -	kilodaltons
LPG -	Lipofosfoglicano
LT CD₄⁺ -	Linfócito T auxiliar (presença da célula CD ₄)
LT CD₈⁺ -	Linfócito T citotóxico/supressor (presença da célula CD ₈)
LVA -	Leishmaniose visceral americana
MAC -	Complexo de ataque à membrana
NK -	Célula “natural killer”
NNN -	Nicolle, MacNeal e Novy
OMS -	Organização Mundial de Saúde (WHO)
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
RFC -	Reação de fixação do complemento
RIFI -	Reação de imunofluorescência in7direta
SIDA -	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

SMF/SER -	Sistema mononuclear fagocítico/Sistema retículo endotelial
Th₁, Th₂ -	Subpopulação de linfócitos T auxiliar 1 e 2 (LTh₁ e LTh₂)
TNF-α -	Fator de Necrose Tumoral – alfa
UFC -	Universidade Federal do Ceará
Vetor biológico -	Funciona como veiculador do agente infeccioso e desempenha o papel de abrigo biológico, no qual o agente cumpre parte do seu ciclo vital.
Virulência -	Capacidade de um bioagente produzir casos graves e fatais.
Zooantroponose -	Infecção transmitida aos animais, a partir do reservatório humano.
Zoonose -	Infecção transmissível ao homem, cujo agente tem um ou mais animais como reservatório.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Resultados do dipstick com rK39 (TRALd).....	64
Sensibilidade de técnicas sorológicas para diagnóstico da LVA, usando como padrão ouro, 88, 87 e 123 pacientes com quadro clínico sugestivo da doença e presença de <i>Leishmania sp</i> na medula óssea, respectivamente.....	65
Distribuição por faixa etária e por sexo, de 123 pacientes com LVA confirmada no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	66
Procedência de 123 pacientes com LVA, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	67
Distribuição quanto à renda familiar de 123 famílias com casos de LVA no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	68
Distribuição dos 123 pacientes quanto aos sintomas apresentados, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	68
Frequência relativa ao estado geral em 123 pacientes na admissão, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	69
Distribuição do tamanho do fígado e do baço em centímetro (cm) em 123 pacientes estudados, no período de julho 2001 a julho de 2003.....	70
Distribuição da celularidade dos mielogramas em 30 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	71
Distribuição da plaquetopose megacariocítica em 30 mielogramas, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	71
Distribuição do número de hemácias (em milhões/mm ³) em 123 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	74
Distribuição da hemoglobina em g/dL em 123 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	75
Distribuição dos valores de leucócitos em 123 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	75
Distribuição da contagem de plaquetas em 123 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003.....	76
Indicação de antibioticoterapia em 65 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.....	77

RESUMO

A confirmação diagnóstica de leishmaniose visceral ou calazar é realizada através da detecção do parasito por métodos diretos, através do encontro de formas amastigotas no interior de macrófagos ou monócitos, em aspirado esplênico, hepático, medula óssea, histopatológico de linfonodo e esfregaço do sangue periférico, com ampla variação de sensibilidade de acordo com o sítio pesquisado, constituindo-se o padrão-ouro a visualização de *Leishmania sp.* A pesquisa de anticorpos específicos para triagem diagnóstica da leishmaniose visceral através do ELISA, reação de imunofluorescência indireta e os testes de aglutinação direta possuem sensibilidade alta e especificidade limitada pelas reações cruzadas com tripanosomatídeos e micobactérias, incluindo-se tuberculose, hanseníase, doença de Chagas, e ainda, leishmaniose tegumentar e histoplasmoses. O teste intradérmico de Montenegro é sempre negativo durante a fase ativa da doença, e baseia-se na memória imunológica dependente de linfócitos Th1. O objetivo deste trabalho foi evidenciar a relevância do teste rápido para detecção de anticorpo anti-leishmania chagasi utilizando o antígeno recombinante rK39 que apresentou sensibilidade de 99,2%. Foram realizados testes sorológicos pelo ELISA que apresentou sensibilidade de 80%, e a reação de imunofluorescência indireta para calazar com sensibilidade de 82%. O gold-standard diagnóstico empregado para todos exames foi a pesquisa microscópica direta do parasito no aspirado de medula óssea e a positividade foi de 71%, em uma pesquisa realizada em hospitais terciários de Fortaleza-CE. A reação imunoenzimática para teste rápido em fita contendo antígeno rK39 apresentou elevada sensibilidade e especificidade permitindo diagnóstico imediato e início precoce do tratamento, além de confirmar alta densidade de epítomos exclusivamente para o gênero *Leishmania*, pois não houve reações cruzadas dentre várias doenças testadas. Detectamos títulos de anticorpos IgG anti-leishmania chagasi persistentemente positivos em pacientes tratados adequadamente para calazar, corroborando com evidências de que o rK39 não define doença em atividade e nem estabelece critérios de cura, fortalecendo que outras possibilidades diagnósticas sejam investigadas mediante um resultado positivo em indivíduo procedente de zona endêmica para calazar, em paciente portador de hepatoesplenomegalia febril e pancitopenia. O teste rápido rk39 deverá ter sua leitura imediatamente realizada e interpretada em até no máximo 10 minutos, objetivando tomada de decisões clínicas, e que sua implantação como método auxiliar de diagnóstico deveria fazer parte da rotina laboratorial, particularmente de serviços secundários e terciários de saúde em regiões endêmicas para leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral americana; Técnicas e Procedimentos de Laboratório; Recombinação Genética; Antígeno.

ABSTRACT

The visceral leishmaniasis diagnostic confirmation or Kala-azar is performed by detection of the parasite through direct methods of amastigotes within macrophages or monocytes, spleen aspirated, hepatic, bone marrow, lymph node histopathological and peripheral blood smear, with wide variation in sensitivity in accordance with the site searched, being the gold standard of Leishmaniasis sp. The specific antibodies for diagnostic of visceral leishmaniasis by ELISA, indirect immunofluorescence reaction and direct agglutination tests have high sensitivity and specificity cross reactions with limited by trypanosomatids and mycobacterium, including tuberculosis, leprosy, Chagas disease, leishmaniasis cutaneous and histoplasmosis. The Montenegro intradermal test is always negative during the active phase of the disease, and is based on immune memory bound on lymphocyte Th1. The purpose of this work was to highlight the importance of quick test for the detection of antibody anti-leishmania chagasi using recombinant rK39 antigen that presented sensitivity of 99.2%. There were serological by ELISA tests that presented sensitivity of 80%, and the indirect immunofluorescence reaction to Kala-azar with sensitivity of 82%. The gold-standard diagnosis made for all examinations was the direct microscopic search on parasite bone marrow aspirated and positivity was 71%, in a survey in tertiary hospitals in Fortaleza-CE. The immunoenzymatic reaction to quick test in tape containing rK39 Antigen has high sensitivity and specificity allowing immediate diagnosis and in the early beginning of treatment, in addition to confirm high-density epitopes exclusively for the Leishmaniasis genus, because there was no cross reactions among several diseases tested. We found evidence of IgG anti-leishmaniasis chagasi antibodies persistently-positive in patients treated appropriately for kala-azar, supporting with evidence that rK39 does not define disease activity and establishes criteria for cure, strengthening that other homogenizing are investigated by a positive result in individual from endemic area of Kala-azar, in disease carrier of febrile hepatosplenomegaly and pancytopenia. The quick test Rk39 must be read and interpreted immediately up to a maximum of 10 minutes driving clinical decision-making, and that its deployment as diagnostic helper method should be part of the laboratorial routine services, particularly in secondary and tertiary health endemic regions of visceral leishmaniasis.

Keywords: American visceral leishmaniasis; laboratory techniques and procedures; genetic recombination; antigen.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Histórico.....	19
1.2	Epidemiologia.....	21
1.3	Aspectos biológicos do parasito.....	24
1.4	Interação parasito-célula hospedeira.....	25
1.5	Aspectos imunológicas da Leishmaniose visceral americana.....	26
1.6	Aspectos morfológicos.....	29
1.7	Diagnóstico diferencial.....	35
1.8	Complicações do calazar.....	43
1.9	Profilaxia.....	46
1.10	Tratamento.....	47
2	OBJETIVOS.....	55
2.1	Geral.....	55
2.2	Específicos.....	55
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	56
3.1	Delineamento do estudo.....	56
3.2	Lócus da pesquisa.....	56
3.3	População alvo/amostra.....	56
3.4	Critérios de inclusão.....	57
3.5	Critérios de exclusão/descontinuação da pesquisa.....	58
3.6	Coleta de dados.....	58
3.7	Análise dos dados.....	58
3.8	Questões éticas da pesquisa.....	59
3.9	Provas diagnósticas.....	59
4	RESULTADOS.....	64
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICES.....	100

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral americana (LVA) apresenta várias sinonímias, sendo também conhecida como calazar, originada a partir da palavra indiana “Kala-azar”, que em hindu, significa febre negra ou doença mortífera. Na Ásia, por seu caráter endêmico, é confundida com formas malignas de malária, sendo denominada de Febre Dum-Dum, Febre de Assam, Febre caquexial, Esplenomegalia Tropical, Anemia Esplênica dos Lactentes e Febre Negra Indiana (MANSON-BAHR, 1955). Os gregos no século passado a chamavam de Ponos ou haplopinakon (BADARÓ e DUARTE, 2002). No mediterrâneo, é conhecida como leishmaniose visceral infantil, e no Brasil, como leishmaniose visceral americana ou calazar (GENARO et al, 2000).

A LVA é uma síndrome clínica febril infecciosa aguda, subaguda ou crônica, não contagiosa, sazonal, transmitida pelas fêmeas do inseto hematófago flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como “mosquito-palha, tatuquira, asa arrepiada, fleboto, cangalhinha ou birigui”. O inseto tem seu habitat no domicílio e no peridomicílio humano como canis, galinheiros e currais, tem atividade crepuscular e pós-crepuscular, e se alimentam de sangue de cães, homens (as fêmeas têm hábitos hematofágicos) e outros mamíferos e aves, pois necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos (NEVES, 1963; BRASIL, 1998). Após o repasto em um hospedeiro contaminado, as leishmânias evoluem no tubo digestivo do mosquito, e depois de 8 a 20 dias, o inseto estará apto a infectar um outro indivíduo em um próximo repasto sanguíneo (BRASIL, 1998). Durante um novo repasto introduzem no hospedeiro, o parasito através da saliva, que possui um peptídeo considerado um potente vasodilatador, o maxidilan (Ribeiro et al, 1989), cuja funções além de anestésica local auxilia no mecanismo de introdução da leishmânia em macrófagos e tecidos sanguíneos.

A LVA pode apresentar-se desde formas subclínicas até as com características clínica e laboratorialmente bem definida como: febre irregular de longa duração, adinamia, acentuada desnutrição energético-protéica (DEP), palidez cutâneo-mucosa, cabelos fracos e quebradiços, com o clássico sinal da bandeira, cílios alongados (sinal de Pittaluga), hepato e esplenomegalia, micropoliadenopatia, tosse intermitente, hemorragias, co-infecções bacterianas (causas de morbiletalidade) e alterações hematológicas: anemia; leucopenia;

plaquetopenia; hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia, por vezes em padrões comparáveis aos encontrados no mieloma múltiplo (NEVES, 1963; REY, 1992; BRASIL, 1998; GENARO et al., 2000).

1.1 Histórico

Em 1885, Cunningham fez a primeira observação do parasito em indivíduos infectados na Índia (GENARO et al., 2000). Entretanto, Pessoa; Silva e Figueiredo (1956) citam que a primeira descrição de *Leishmania sp.* foi feita por Borovsky em 1898, num paciente russo com a forma cutânea da doença. Em 1903, William Leishman realizou a primeira descrição do parasito, ao realizar a necrópsia de um soldado indiano que fora internado no Hospital de Netley, em abril de 1900. Ele era proveniente da estação de Dum-Dum (Calcutá, Índia), e possuía relatos de disenteria e hepatoesplenomegalia febril. Ainda em 1903, Charles Donovan (Alvar, 1994; Badaró e Duarte, 2002) confirma a descrição de Leishman, ao examinar cortes histológicos de baço de cadáveres cuja “causa mortis” era malária crônica, porém confundiu-se com o *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono, descrito em 1894, por David Bruce. Ainda neste mesmo ano, Ross criou o gênero *Leishmania* e denominou de *Leishmania donovani* o agente etiológico do calazar (BADARÓ e DUARTE, 2002).

Em 1904, o parasito foi cultivado em sangue citratado, a 22°C, e foram isoladas as formas flageladas da *L. donovani* (Rogers, 1908). Em 1908, na Tunísia, Charles Nicolle evidencia o papel do cão como hospedeiro intermediário da *L. donovani*. Em 1924, Knowles, Napier, e Smith identificaram as herpetomonas no intestino de *Phlebotomus argentipis*. Em 1931, Sinton descreveu convincente coincidência entre a distribuição de leishmaniose visceral e *Phlebotomus argentipis*, comprovando a transmissão do parasito em hamsters, pela picada de flebotomíneos, sendo esses insetos formalmente demonstrados como vetores biológicos da doença. Em 1942, Swaninath, Short e Anderson descreveram o ciclo evolutivo desta zoonose sendo a transmissão da *L. donovani* ao homem, feitas por picada de fêmeas do *P. argentipis*. De 1905 até 1950, o calazar foi descrito como endêmico em várias regiões do mundo, dentre elas o norte e leste da África, Ásia, da costa do Pacífico até a Ásia central, China e sul da

Mongólia, expandindo-se até a Índia e ainda em território europeu, como é o caso da Romênia, Bulgária, Costa do Mediterrâneo e leste da antiga URSS (LAINSON e SHAW, 1987; BADARÓ e DUARTE, 2002).

Em 1913, em Assunção, Paraguai, é relatado o primeiro caso autóctone nas Américas, durante necrópsia praticada em uma paciente que residia há 14 anos naquela cidade, mas era proveniente do município de Boa Esperança, Mato Grosso, Brasil, e tinha nacionalidade italiana (MIGNONE, 1913). Até 1934, havia sido descritos três casos, sendo um deles por Mignone e os outros dois casos, em pacientes vivos, na Argentina por Mazza e Cornejo Arias, em 1926 (ALENCAR, 1983).

A primeira observação sobre leishmaniose visceral no Brasil foi realizada em 1934, a partir dos relatórios de Penna, em exames histológicos de viscerotomia “post-mortem” em suspeitos de febre amarela. Registraram-se 41 casos de calazar em 47 mil sessões examinadas. Em 1936, Evandro Chagas descreveu o primeiro caso clínico de LVA no Brasil, em um adolescente de 16 anos, residente em Aracaju-SE (CHAGAS, 1936; ALENCAR, 1983). Chagas e Chagas, em 1938, estabeleceram o agente etiológico, denominado *Leishmania donovani chagasi* (apud BADARÓ e DUARTE, 2002). Entre 1936 e 1939, mais informações epidemiológicas foram obtidas a partir da comissão chefiada por Evandro Chagas, que descreveu a doença no homem, no cão e na raposa, e identificou o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* como o provável vetor biológico da LVA (ALENCAR, 1983). Em 1953, foram referidos 43 casos de calazar diagnosticados em pacientes vivos, enquanto que mais de 300 casos já haviam sido notificados por viscerotomia no Nordeste (PRATA, 1957). De 1953 a 1965, ocorreu o pleno reconhecimento da LVA como endêmica no Brasil, com focos notadamente em Sobral-CE (174 casos), Jacobina-BA (31 casos) e Piauí (45 casos) (ALENCAR, 1959; ALENCAR, 1978; LAINSON e SHAW, 1987; PESSOA, SILVA, e FIGUEREDO, 1956). Em 1954, Deane consolida como uma zoonose no Nordeste, com estudos de reservatórios naturais apontando a importância do cão doméstico e de um canídeo silvestre da espécie *Dusycion (Lycalopex) vetulus* na manutenção da endemia. Atualmente o agente etiológico da LVA é classificado como *Leishmania (Leishmania) chagasi*, de acordo com critérios genotípicos e fenotípicos para caracterização de espécies e subespécies e tem estrutura semelhante com a *L. infantum* (BADARÓ e DUARTE, 2002).

1.2 Epidemiologia

A leishmaniose visceral constitui uma das sete prioridades absolutas da Organização Mundial de Saúde (OMS) no combate das grandes endemias, devido ao seu caráter mundial, estimado em uma população exposta à transmissão de aproximadamente 360 milhões de indivíduos. Cerca de 2 milhões de novos casos surgem anualmente (1 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar americana e 500 a 600 mil de leishmaniose visceral), de modo que a prevalência mundial de LVA é de 12 milhões de casos anuais (WHO, 1998).

A LVA existe em 4 dos 5 continentes com exceção apenas da Oceania, concentrando-se em 94 países das regiões tropicais (27 no Novo Mundo e 67 no Velho Mundo – África, Europa e Ásia) (BADARÓ e DUARTE, 2002). Dentre esses, verifica-se que a maioria está em países em desenvolvimento, principalmente Brasil, Nepal, Índia e Sudão, que concentram mais de 90% dos casos mundiais (WHO, 1988). O baixo nível sócio-econômico e cultural, a má distribuição de renda da população, o êxodo rural e as secas periódicas, são fatores bastante comuns nas zonas rurais e periferias dos centros urbanos, justificando o maior surgimento de casos nas áreas endêmicas. O estado de Bihar (Índia) registrou em 1994 um dos maiores surtos epidêmicos já relatados, com 250 mil infectados. Recentemente atribuiu-se ao calazar, 100 mil mortes em epidemia no Sudão.

Nas Américas, há uma tendência crescente de casos autóctones em centros urbanos e periurbanos. Isto se deve às migrações a partir de áreas endêmicas e à expansão da favelização, onde grandes concentrações populacionais convivem em más condições sanitárias com cães infectados (GENARO et al., 2000).

Epidemiologicamente, a LVA assemelha-se ao calazar do Mediterrâneo (*Leishmania donovani infantum*). Apresenta-se como uma antroponose ainda predominantemente rural, 80% dos casos ocorrendo em crianças de 0 a 10 anos (61% abaixo dos cinco anos de idade) e com maior prevalência no sexo masculino (BADARÓ et al, 1985; EVANS et al, 1985). A suscetibilidade à doença clínica está intimamente relacionada com a desnutrição e com a baixa imunidade celular do indivíduo. O vetor *Lutzomyia longipalpis* é encontrado nos países onde a doença continua sendo ativamente registrada: Brasil (90% dos casos), Colômbia,

Venezuela, Bolívia, El Salvador, Honduras, México, Guatemala, Martinica, Guadalupe, Equador, Suriname, Paraguai e norte da Argentina (MATTOS, 1998).

Os canídeos silvestres (raposas) da espécie *Dusycion (Lycalopex) vetulus* são encontrados nas regiões sudeste, centro-oeste e nordeste e os da espécie *Cerdocyon thous* são encontrados na Amazônia, em áreas secas, sendo os reservatórios silvestres nas regiões do Pará e Ilha de Marajó, onde a doença é endêmica. O cão doméstico (*Canis familiaris*) é apontado como um dos principais reservatórios, servindo como fonte de infecção dos transmissores no Brasil, pois apresentam intenso parasitismo cutâneo em diversas áreas endêmicas como Ceará, Pará e Amazonas (DEANE; DEANE, 1954 e 1955; CUNHA e ALENCAR; ANDRADE, 1963; SILVEIRA et al, 1982; LAINSON e SHAW, 1987; LIMA, 1995).

Há relatos sobre identificação de *Leishmania chagasi* em gambás (*Didelphis albiventris*), naturalmente infectados, no Brasil e na Colômbia (SHERLOCK et al, 1984). Estes didelfídeos possuem habitat peridomiciliar e por existirem em maior número que às raposas, tornam-se importantes no ciclo de manutenção da endemia.

Na Índia, Nepal e China, a doença é causada por *Leishmania donovani*, tendo como peculiaridade o acometimento da pele (leishmaniose dérmica pós-calazar) sendo o ser humano o único reservatório conhecido. Na costa do Mediterrâneo, Arábia, noroeste da China e África, o agente etiológico é a *Leishmania infantum*, apresentando característico envolvimento ganglionar, febre, hepato e esplenomegalia.

No Brasil, a leishmaniose visceral é considerada doença endemo-epidêmica, com surtos periódicos a cada 5 a 10 anos, distribuída em 17 dos 27 estados de quatro das cinco regiões brasileiras. Sua maior incidência se dá no Nordeste, que concentra 92% dos casos, no Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro-Oeste (1%) (ALENCAR, 1983). Surtos epidêmicos urbanos foram registrados desde os anos 80 em Teresina (PI), e dessas em outros centros urbanos como São Luís, Natal, Aracaju, Belo Horizonte, Santarém, Corumbá e Fortaleza (BRASIL, 1998). São registrados cerca de 3000 a 4000 casos por ano no Brasil, com um coeficiente de incidência de 20,4 casos/100.000 habitantes em localidades do Nordeste. No Ceará, verifica-se uma incidência sazonal bimodal (ALENCAR, 1978), com picos três meses após os períodos chuvosos de inverno e de verão (“as populares” “chuvas do caju”). Em alguns locais, a letalidade pode chegar a 10%, mesmo nos pacientes submetidos a tratamento

convencional (BRASIL, 1998). A taxa de letalidade nos casos não tratados varia de 75 a 95%, em um a dois anos (BRASIL, 1996).

A co-infecção HIV/LVA representa atualmente uma preocupação para as autoridades sanitárias mundiais. Há registros de mais de 1000 casos em áreas rurais e suburbanas do sul da Europa, onde a LVA é endêmica, sendo que muitos casos entre os usuários de drogas injetáveis. Este tipo de transmissão expandiu-se para os países no norte da Europa (Alemanha, Finlândia e Noruega), mudando o perfil epidemiológico clássico de transmissão da doença, onde o inseto vetor e o cão participavam do ciclo natural. A LVA também é endêmica na Itália, onde o agente etiológico é a *Leishmania infantum* e os cães domésticos são os principais reservatórios.

Outras fontes de infecção possíveis são hemotransfusões, pois o diagnóstico sorológico não está incluído na triagem dos doadores de bancos de sangue; há ainda casos de infecção por exsangüineotransusão em recém-nascidos. Foi descrita outra fonte de transmissão vertical, por transfusão sangüínea materno-fetal (GENARO et al., 2000, porém são de pouca importância epidemiológica. Outro mecanismo de transmissão possível, descrito na Inglaterra na década de 1950, seria por intercuro sexual. Eventualmente a transmissão por picada de carrapato foi citada na literatura, mas não confirmada.

O programa de vigilância e controle da Leishmaniose visceral com o intuito de reduzir as taxas de letalidade por meio do diagnóstico e tratamento precoce estabeleceu critérios para a tomada de decisões, incluindo como **caso suspeito de leishmaniose visceral**: todo indivíduo com febre e hepatoesplenomegalia, procedente de área com ocorrência de transmissão de LVA, ou todo indivíduo com febre e hepatoesplenomegalia proveniente de área sem ocorrência de transmissão, desde que descartados os diagnósticos diferenciais mais freqüentes na região. Considera-se como **caso confirmado de leishmaniose visceral** quando houver a confirmação clínico laboratorial do encontro do parasito em exame direto ou cultura, ou quando a reação de imunofluorescência indireta for positiva com título de 1:80 ou mais desde que excluídos outros diagnósticos. O critério clínico epidemiológico é empregado para pacientes clinicamente suspeitos, sem confirmação laboratorial, provenientes de área com transmissão de LVA, mas com resposta favorável ao teste terapêutico.

1.3 Aspectos biológicos do parasito

- **Morfologia**

O parasito apresenta os seguintes aspectos morfológico:

Amastigota: forma obrigatoriamente intracelular (corpúsculos de Leishman-Donovan) (Locksley, 1985), arredondada ou oval, medindo 3 a 6 μm de diâmetro. Quando fixadas e coradas pelos métodos derivados do Romanowsky (Giemsa ou Leishman), o citoplasma cora-se em azul-pálido ou azul-claro; o núcleo grande e arredondado compreende 1/3 do corpo do parasito, que juntamente com o cinetoplasto em forma de pequeno bastão, coram-se de vermelho-púrpura.

Promastigota: forma alongada de 15 a 20 μm com flagelo de igual tamanho, cinetoplasto anterior ao núcleo; o flagelo torna-se livre a partir da porção anterior da célula. As formas infectantes, promastigotas metacíclicas, são encontradas livres ou aderidas na porção anterior do aparelho bucal do inseto vetor, que são inoculadas nos hospedeiros vertebrados durante o repasto sangüíneo.

- **Habitat**

Há uma grande variedade de hospedeiros mamíferos, como roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e, entre estes, o homem. No hospedeiro vertebrado, as amastigotas parasitam células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), presentes em órgãos como medula óssea, baço, linfonodos, fígado, rins, placas de Peyer, intestinos e interior de leucócitos. O ciclo biológico da *L. chagasi*, é do tipo digenético heteroxênico, transmitidos por insetos hematófagos fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, ao exercer o repasto sangüíneo. Ao picar um animal vertebrado infectado, o inseto ingere, juntamente com o sangue, células do SFM, macrófagos e leucócitos parasitados com as formas amastigotas, que no lúmen intestinal, multiplicam-se e transformam-se em promastigotas, a partir de 15 horas do repasto infectante, colonizando o trato digestivo médio e anterior do flebotomíneo. A seguir transformam-se em paramastigotas, aderidos ao epitélio por hemidesmossomos no esôfago e faringe. E quando o inseto exercer novo repasto sangüíneo sobre um hospedeiro susceptível, inoculará promastigotas metacíclicas infectantes

presentes no tubo digestivo anterior, probóscida, faringe e esôfago (Report of a WHO expert committee, 1990), que são fagocitadas por células do SFM, macrófagos teciduais e por granulócitos neutrófilos, que se transformam rapidamente em amastigotas, adaptando-se a novas condições fisiológicas intracelulares. As amastigotas multiplicam-se sucessivamente através de divisões binárias no interior do vacúolo fagocitário de macrófagos e quando densamente parasitados, rompem-se, pondo em liberdade amastigotas que serão novamente fagocitadas. Fecha-se o ciclo evolutivo vetor-vertebrado (NEVES, 1963; GENARO et al., 2000; BADARÓ; DUARTE, 2002).

1.4 Interação parasito-célula hospedeira

O mecanismo de escape das formas promastigotas ao Sistema Imunológico do hospedeiro ocorre por ativação pelas vias clássica e/ou alternativa das proteínas do Sistema Complemento com disposição de frações C3 e seus produtos de clivagem (C3b, C3bi, C3dg) na membrana do parasito. Moléculas de superfície dos promastigotas como GP63 (glicoproteína de peso molecular 63 kDa) e LPG (complexo glicofosforoglicano) são também indicadas como importantes na adesão do parasito e sua endocitose pelo macrófago, que por sua vez, possui receptores específicos para C3 e seus produtos CR1, CR2, CR3, CR4 do complemento. Os anticorpos da classe IgG e as fibronectinas participam do processo de adesão dos promastigotas infectantes ao macrófago por meio de receptores para porção Fc das IgG. Fisiologicamente, durante a endocitose pelo macrófago, a atividade respiratória da célula hospedeira aumenta intensamente a atividade dos fagolisossomos, liberando produtos tóxicos derivados do oxigênio, altamente lesivos para membranas celulares. O complexo lítico final do complemento (C5-C9) é capaz de promover adesão à superfície dos promastigotas e provocar a lise dessas formas. A presença de receptores para esses ligantes no macrófago resulta numa forma de escape da *Leishmania*, a qual interioriza-se no fagossomo que se funde aos lisossomos. Dessa forma o mecanismo microbicida do "burst" respiratório de macrófagos não será ativado e o parasito, pode sobreviver nas condições do novo ambiente, transformar-se em amastigota intracelular obrigatório, desenvolvendo-se e multiplicando-se por divisão binária, no meio ácido do vacúolo parasitóforo.

1.5 Aspectos imunológicos da leishmaniose visceral americana

A Leishmaniose visceral americana é uma doença com disfunção imunológica específica resultando no parasitismo das leishmânias em macrófagos, hipergamaglobulinemia, ausência de resposta a testes intradérmicos de leishmanina, depressão da resposta imune celular e diminuição do número de linfócitos T e presença do complexo imune circulante, havendo persistência de títulos elevados de anticorpos anti-*leishmânia* anos após o tratamento, sugerindo que o parasito permaneça no hospedeiro após a cura clínica da doença (BADARÓ et al., 1985). Resposta imunológica humoral e celular contra o parasito são desenvolvidas pelo sistema imune do indivíduo, similar à resposta imunológica observada em modelos murinos, com padrões de resposta Th₁ e Th₂.

Na modulação da resposta imune, o macrófago apresenta os antígenos aos linfócitos T CD₄⁺. A resistência do hospedeiro associa-se à ação seletiva e diferenciação de células efetoras “T helper” CD₄⁺ (Th₁), que secretam um padrão de citocinas específicas pré-inflamatórias: IL-2, INF- γ , IL-12 e TNF- α . A susceptibilidade à infecção relaciona-se com a resposta de células CD₄ (Th₂) que produzem citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β , etc.

Estudos realizados com *L. major* com camundongos BALB/C infectados, que são geneticamente susceptíveis à leishmaniose, quando são infectados, desenvolvem resposta imune com células tipo Th₂, evoluindo para doença severa e progressiva. Animais C3H/HeN, que são geneticamente resistentes à *leishmânia*, quando são infectados, desenvolvem resposta imune com células tipo Th₁, produzindo INF- γ , controlando a multiplicação da *leishmânia*, tornando a doença autolimitada. Camundongos BALB/C tratados com Ac. Anti-IL-4 resultam em controle da leishmaniose. Animais C3H/HeN tratados com Ac. Anti-INF- γ resultam em progressão da infecção e doença severa.

Algumas citocinas possuem caráter regulador favorecendo ou inibindo a expansão de células Th₁ ou Th₂ dependente de fatores tais como: dose de antígeno, células apresentadoras de antígenos (APCs), via de inoculação e padrão genético do hospedeiro. A subpopulação Th₁ (IL-2, INF γ , IL-12, TNF- α) confere proteção, evitando o surgimento de doença. O TNF- α é importante na resposta natural e em imunizações induzidas por antígenos. O INF- γ inibe a resposta Th₂, controlando a multiplicação do parasito, é um potente ativador de macrófagos

na destruição dos parasitos; age sinergicamente com TNF- α , potencializando sua ação. Segundo Locksley (1985), a cura da leishmaniose visceral deve-se à liberação de citocinas ativadoras de macrófagos, especialmente o INF- γ , por linfócitos T sensibilizados.

A ativação dos macrófagos leva à indução de óxido nítrico sintase e à produção de óxido nítrico, tóxico para amastigotas intracelulares. A ausência de produção de INF- γ e a liberação de citocinas desativadoras de macrófagos, como as IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , em resposta a antígenos de *leishmânia*, diminuindo a chance de ocorrência de cura ou eliminação total do parasito. Acredita-se que a cura confira imunidade à cepa infectante. A IL-4 é uma citocina importante na progressão da doença, inibindo a ativação de macrófagos pelo INF- γ , a transcrição do TNF- α e a produção de H₂O₂, inibindo a expressão do receptor de IL-2 e a produção de INF- γ . A IL-10 age sinergicamente com a IL-4 e bloqueia a resposta Th1. Níveis aumentados de IL-10 em sobrenadante de Fator de estimulação de colônias de monócitos (MCSF) estimuladas por *L. chagasi* bloqueia a ativação de Th1 e conseqüentemente a resposta citotóxica, pela redução da produção de IL-12 (“down-regulation”) e INF- γ ; inibindo a ativação de macrófagos, diminuindo a capacidade de inativar a *leishmânia*. Anticorpo anti-IL-10 restaura a resposta linfoproliferativa e a produção de INF- γ em MCSF. Esta é a mais importante citocina envolvida na progressão da infecção para a LVA. IL-12 é produzida pelas células NK (natural killer), exerce papel fundamental na ativação da população de INF- γ e no direcionamento para resposta Th1. A incapacidade das células mononucleadas produzirem IL-12 suprime a resposta citotóxica. A adição de IL-12 restaura a produção de INF- γ e a resposta linfoproliferativa, ativando a resposta citotóxica. A IL-10 anula os efeitos da IL-12 na indução da produção de INF- γ .

Badaró, et al (1986) compararam a sensibilidade e especificidade de antígenos extraídos de cepas de *Leishmania chagasi* para o diagnóstico do calazar obtendo resultados satisfatórios. Os testes de ELISA, teste de aglutinação indireta e imunofluorescência indireta são sensíveis, mas resultados falso-positivos podem ocorrer com soros de indivíduos com Hanseníase, Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Toxoplasmose e Leishamiose tegumentar americana (LTA).

Como o calazar promove uma estimulação da linhagem de linfócitos B, com elevação das imunoglobulinas G (IgG) de maneira policlonal, os testes sorológicos contra

diversas doenças parasitárias e bacterianas podem se positivar na fase aguda, havendo falsos-positivos. Os testes cutâneos, por outro lado, tendem a ser negativos, por inibição da imunidade celular e da hipersensibilidade tipo IV (tuberculina, histoplasmina, tricofitina, candidina, etc). A reação de Montenegro (leishmanina) é negativa durante a fase aguda do calazar e volta a se positivar após o tratamento. Além disso, como o Montenegro apresenta reação cruzada com as leishmanioses cutâneas e mucocutâneas, não pode ser utilizado como parâmetro de prevalência exclusiva de leishmaniose visceral, em áreas onde as várias leishmanioses coexistem. É necessário portanto, um teste que sirva de “screening” sorológico específico para *Leishmania chagasi*.

Quando formas flageladas ou promastigotas metacíclicas infectantes são introduzidas na pele do hospedeiro vertebrado mamífero, reações teciduais inaparentes podem ocorrer, produzindo uma resposta inflamatória aguda inespecífica com marginação e exsudação de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos que fagocitam e destroem parasitos previamente opsonizados pelo complemento, auxiliado ainda por uma IgG específica que aumenta a fagocitose por esses granulócitos. Os macrófagos apresentam grande atividade fagocítica para as leishmânias, mas têm pouca ação leishmanicida. As amastigotas fagocitadas sobrevivem e se multiplicam no interior de vacúolos fagocíticos. Moléculas de superfície do parasito como LPG e GP63 protegem o parasito da lise no fagolisossomo inibindo os mecanismos oxidativos e as enzimas lisossômicas (RUSSEL; WILHELM, 1986; KING; CHANG; TURCO, 1987; ETGERS; BOUVIER; BORDIER, 1986). A enzima fosfatase ácida de superfície da *L. donovani* também bloqueia a produção de metabólitos oxidativos, protegendo o parasito no fagolisossomo. Quando parasitos opsonizados pelo complemento penetram nos macrófagos, há inibição da síntese de superóxidos promovendo condições favoráveis à sua sobrevivência. Ao contrário, quando a endocitose do parasito é mediada por receptores dos macrófagos para manose-fucose ou para fibronectina, a destruição do agente é facilitada.

Na modulação da resposta imunológica do hospedeiro, o macrófago apresenta o antígeno aos linfócitos T CD₄⁺, podendo haver evolução para o pólo hiperérgico caracterizado pelo perfil de linfocinas da subpopulação Th₁ (IL-2, INF- γ). O INF- γ inibe a proliferação de células Th₂ e é considerado o mais potente ativador de macrófagos na destruição da leishmânia, ação potencializada pelo TNF- α , destruindo as leishmânias através dos sistemas micro e macrofágicos, determinando o controle imunológico da doença. Outras substâncias

como o fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) também estimula macrófagos.

No pólo anérgico, a subpopulação de células Th₂ (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- β) determina a progressão da doença. A IL-4 inibe a expressão do receptor de IL-2 e produção de INF- γ , sendo o fator mais importante para mediar esta progressão, inibindo a ativação de macrófagos pelo INF- γ , a transcrição do TNF- α e a capacidade de produção de H₂O₂.

A IL-10 inibe a liberação de citocinas de células tipo Th₁. As leishmânias ultrapassam do ponto de inoculação e parasitam células do sistema SFM, multiplicam-se por divisão binária simples e se disseminam, causando hipertrofia e hiperplasia de vísceras maciças e colonizam macrófagos residentes em outros órgãos.

A indução das células para os pólos Th₁ ou Th₂ depende da dose do antígeno, da forma de apresentação pelas células apresentadoras de antígeno (APC), da via de inoculação e de fatores genéticos do hospedeiro.

Estudos genéticos em camundongos C5BL indicam a existência de um gene autossômico situado no cromossomo 1, conferindo resistência à espécie à infecção pela *L. donovani*, enquanto nos animais Balb/C a inexistência do gene confere susceptibilidade (LAURENTI, 1993), sugerindo que mecanismos genéticos determinem resistência natural ou susceptibilidade à infecção.

1.6 Aspectos morfológicos

No fígado, no pólo anérgico da doença, encontra-se o *padrão típico*, caracterizado por hipertrofia e hiperplasia acentuada das células de Kupffer, densamente parasitadas, ocupando a luz dos sinusóides, e focos de infiltrado linfoplasmocitário intralobulares. Os hepatócitos exibem esteatose macro e microgoticular de intensidade variável, atividade regenerativa discreta, sendo infreqüente a necrose de células isoladas.

Macroscopicamente, o fígado encontra-se aumentado de volume, ocupando grande parte da cavidade abdominal, deslocando as vísceras do sítio de implantação anatômica.

Mantêm-se preservadas a forma e a consistência com bordas regulares e superfície lisa do órgão. Cortes histológicos revelam preservação da lobulação com aspecto em noz-moscada pela esteatose discreta ou superfície congesta com pontilhados avermelhados ou apagamento da lobulação.

Reação imunohistoquímica com anticorpo policlonal específico para leishmania evidencia grande quantidade de material antigênico no citoplasma de células de Kupffer, macrófagos, estroma portal e espaço de Disse, com marcadores indicando presença de IgM, IgG e IgA.

À microscopia eletrônica observa-se intensa ativação das células de Kupffer com um aparelho fagocítico proeminente e presença de formas amastigotas íntegras e em desintegração em vacúolos fagocíticos. As células de Ito permanecem geralmente incólumes, sem exibir sinais de ativação (BADARÓ; DUARTE, 2002).

No padrão nodular hepático ocorre a escassez dos parasitos e o diagnóstico etiológico pode ser confirmado por reação imunohistoquímica, microscopia eletrônica ou métodos de biologia molecular. São indicados para este tipo de investigação indivíduos com epidemiologia e quadro clínico-laboratorial sugestivos de LVA, mas com pesquisa e/ou cultura de leishmânia negativas na medula óssea, fígado ou baço nas infecções subclínicas. Caracteriza-se histologicamente pela presença de células inflamatórias (linfócitos T e B, macrófagos e plasmócitos) na intimidade dos lóbulos hepáticos e nos espaços porta, sem predileção por zonas acinares. As formas amastigotas são escassas, não sendo vistas no citoplasma das células de Kupffer, exibindo discreta ou moderada hipertrofia e hiperplasia.

No padrão fibrogênico Gelin (1954) observou que, embora o fígado seja menos precocemente comprometido que o baço, representa um dos setores orgânicos mais afetados, onde o aumento de volume decorre de um processo de hiperplasia pulpar, reação macrofágica e eritroblástica acentuadas, culminando em uma hepatomegalia de grande vulto, podendo acompanhar-se de ascite e até de circulação colateral superficial de tipo porto-cava, na parede abdominal. Rogers (1908) descreveu o papel fibrogênico hepático da *Leishmania donovani* em 25% dos casos de calazar indiano, caracterizado por fibrose hepática intralobular difusa, semelhante à encontrada na sífilis congênita, sem fibrose portal e sem nódulos regenerativos. (BOGLIOLO, 1956; DUARTE, 1987; GOSWAMI, 1970; RODRIGUES DA SILVA; DE PAOLA, 1958; ROGERS, 1908). Os pacientes que apresentam hipertensão porta e

insuficiência hepática, quadro conhecido como “Cirrose de Rogers”, muito embora os critérios histológicos não compreendam uma verdadeira cirrose (GOSWAMI, 1970; ROGERS, 1908).

Nattan-Larrier (1918) confirma achados semelhantes em casos de autópsia provenientes da Índia, em indivíduos adultos com calazar crônico, assumindo a cirrose do fígado um aspecto bem delimitado e excepcionalmente difuso. Na “Cirrose de Laennec”, ocorre acentuado desarranjo da arquitetura lobular, distorção trabecular, neoformação e outros aspectos peculiares ao clássico tipo de fibrose hepática com cirrose franca.

Material antigênico de leishmânias e depósitos de IgG, IgM e IgA são identificados nas células de Kupffer e no espaço perissinusoidal por imunohistoquímica. A estimulação antigênica prolongada das células de Kupffer e sua hiperplasia e hipertrofia poderiam ser responsabilizadas por: (1) alteração da microcirculação no sinusóide e espaço perissinusoidal, levando à dificuldade de circulação de fluídos com estase e ampliação do espaço de Disse; (2) distúrbio na produção de collagenases e outras enzimas responsáveis pelo catabolismo do colágeno, causando desequilíbrio entre produção/degradação; (3) produção excessiva de fibronectina que, no espaço perissinusoidal, funcionaria como fator estimulador de fibrinogênese; (4) liberação de fator de crescimento de células de Ito, aumentando a fibrinogênese; (5) secreção de monocinas e prostaglandinas ativadoras da migração e proliferação das células de Ito (BADARÓ; DUARTE, 2002).

Segundo Duarte; Sesso; Brito (1978), em estudo de necropsia pulmonar de casos de LVA, observou-se incidência de pneumonite intersticial em 76,9%. Padrão histológico idêntico foi encontrado também em portadores de doença em fase ativa (ANDRADE e YAIBUKI, 1972; RASO; SIQUEIRA, 1964). Frequentemente relata-se quadro histológico típico de pneumonia intersticial associada a co-infecção com Leishmaniose/HIV (MATHERON et al., 1992).

O envolvimento septal pulmonar na LVA em hamsters infectados experimentalmente com cepas viscerotrópicas de *L. donovani* e *L. chagasi* revelou pneumonia intersticial em 85% dos animais infectados, evoluindo em três fases distintas: *exsudativa* inicial e fugaz, com infiltrado de neutrófilos nos septos; *celular* semelhante à forma mais encontrada no homem; *fibrótica* caracterizada por finas faixas de fibrose septal.

Estudo histológico pulmonar de cães naturalmente infectados com leishmania chagasi durante surto epidêmico revelou 80,6% de pneumonia intersticial distribuídas nas fases celular (46,9%), celular/fibrótica (21,9%) e fibrótica (12,2%), material antigênico no citoplasma de macrófagos livres na luz dos alvéolos ou corando formas amastigotas em apenas 30% dos casos. A etiologia leishmaniótica pode ser confirmada por reação imunohistoquímica utilizando-se anticorpo policlonal específico para leishmânias.

A tosse seca, persistente, que surge geralmente no início dos sintomas, prolonga-se durante o período de estado e desaparece com a cura da LVA (BADARÓ et al., 1986; PRATA, 1957). A broncopneumonia representa a infecção bacteriana secundária mais freqüente, causada pelos mesmos agentes etiológicos dos indivíduos imunocompetentes é uma importante causa de óbito na doença (NICODEMO, 1991).

Ao exame macroscópico, as alterações renais são pouco expressivas, podendo apresentar-se congestos e aumentados de volume. As anormalidades da função renal traduzem-se por proteinúria, hematúria macroscópica, uréia e creatinina elevadas no soro e clearance de creatinina diminuído (GUAN, 1991; HANDMAN; BUTTON; McMASTER, 1990), normalizando-se com o tratamento antiparasitário leishmanicida (DUTRA; MARTINELLIM; CARVALHO, 1985).

Ao exame microscópico dos rins, observa-se nefrite intersticial de intensidade variável entre graus discreto, moderado e intenso, sendo a região cortical a mais acometida, com exsudação de plasmócitos, linfócitos e macrófagos em torno dos pequenos vasos, não se observando vasculite nem agressão da membrana basal tubular ou do epitélio tubular. A pesquisa direta de formas amastigotas constitui-se achado raro, mesmo quando da utilização de colorações específicas que facilitem a visualização dos parasitos. Pode ser detectado por imunohistoquímica material antigênico de leishmânia nos focos inflamatórios, no citoplasma de macrófagos ou livres na matriz extracelular do interstício. O comprometimento inflamatório intersticial renal ocorre no homem, cães naturalmente infectados e em hamsters e cães inoculados experimentalmente com cepas viscerotrópicas de leishmânias (ALENCAR, NEVES; DIETZE, 1986).

A correlação clínico-patológica da nefrite intersticial em alguns indivíduos que progrediram para insuficiência renal aguda, associa-se à isquemia renal com moderada ou

intensa nefrite (NICODEMO; AMATO NETO, 1984) e a região medular geralmente não é acometida.

Nos glomérulos, ocorre hipertrofia e hiperplasia das células mesangiais, com espessamento membranoso fibrilar ou hialino da matriz mesangial. Há deposição de imunocomplexos circulantes no mesângio com IgG, IgM, IgA, fração C₃ do complemento, fibrinogênio e, ocasionalmente, antígeno leishmaniótico. À microscopia eletrônica observam-se pequenos depósitos eletrodensos no mesângio, na membrana basal próxima às células mesangiais e, por vezes, na região subendotelial ou subepitelial (BRITO et al., 1975; WEISINGER et al., 1978). Em hamsters e cães ocorre amiloidose glomerular extensa e grave por exaustão do SFM, em virtude da estimulação antigênica constante e prolongada. No homem, amiloidose glomerular raramente é encontrada, podendo ocorrer glomerulonefrite mesangioproliferativa com comprometimento da membrana basal glomerular e grande quantidade de imunocomplexos depositados nos glomérulos (SARTORI et al., 1991).

A esplenomegalia encontrada na LVA deve-se à reatividade do sistema reticuloendotelial (SRE) e à congestão dos sinusóides, podendo o baço chegar até a fossa ilíaca direita. À macroscopia do órgão verifica-se acentuado aumento de volume, consistência firme, cápsula tensa com espessamentos focais. À microscopia, evidencia-se hipertrofia e hiperplasia do SFM com macrófagos densamente parasitados por formas amastigotas abundantes na polpa vermelha e polpa branca apresentando redução da densidade celular linfocitária, particularmente em zonas T dependentes e polimorfismo celular. Ocasionalmente verificam-se focos de amilóide depositados na polpa branca e/ou nos sinusóides (DUARTE, 1975).

Nos linfonodos, geralmente não há exibição acentuada do aumento do volume, apesar da proliferação e parasitismo das células do SFM. O exame microscópico revela reatividade dos seios marginais, intermediários e medulares, com hipertrofia e hiperplasia. Os folículos linfóides, pouco aumentados de volume, exibem atividade dos centros germinativos ou hiper celularidade perifolicular e progressivo aumento de células pironinofílicas. Na área paracortical há depleção progressiva de linfócitos e plasmocitose. Esta proliferação folicular e diferenciação de linfócitos em plasmócitos podem explicar a hipergamaglobulinemia.

Cortes histológicos da medula óssea evidenciam hipocelularidade da série granulocítica e bloqueio de granulócitos na série neutrofílica. Portanto, levando a leucopenia

geralmente inferior a $3.000/\text{mm}^3$ e neutropenia decorrente de redução da reserva medular, de seqüestro esplênico ou de reações de autoimunidade.

A série vermelha apresenta hiper celularidade relativa em relação à granulocítica com predominância microeritroblástica. A anemia é decorrente de bloqueio de produção na medula óssea, seqüestro esplênico e hemólise por mecanismo imunológico.

A série megacariocítica apresenta-se normo ou hipocelular, mas hipoplaquetopênica. A plaquetopenia, geralmente moderada, é causa de hemorragia, é atribuída à diminuição de maturação medular e destruição periférica por fatores imunitários.

Existe hiper celularidade macrofágica com alto parasitismo por formas amastigotas. Linfocitose é mais acentuada em crianças. Também há plasmocitose, mas é evidente a escassez ou ausência de eosinófilos.

Hipoalbuminemia é freqüente e decorre do aumento do catabolismo protéico, fatores nutricionais, doenças parasitárias associadas e comprometimento jejunal, com perda entérica de albumina. A hipoalbuminemia é decorrente da enteropatia perdedora de proteínas, vista através da perda de albumina marcada com cromo 51 (TIMERMAN, 1990). A liberação de prostaglandina E_2 pelos macrófagos parasitados ao nível do microambiente da mucosa intestinal desencadeia o processo inflamatório. Muitos indivíduos queixam-se de mudanças no hábito intestinal, que variam de diarréia aguda profusa à constipação, enquanto outros são diagnosticados em cortes histológicos *post-mortem*, visualizando-se autólise da mucosa intestinal e ulcerações secundárias a processos infecciosos. A hipergamaglobulinemia decorre da ativação policlonal de linfócitos B, havendo inversão na relação albumina globulina característica laboratorial marcante para o diagnóstico.

Segundo Badaró e Duarte (2002), em estudo histológico de biópsias de intestino delgado, verifica-se freqüente e constante comprometimento da mucosa jejunal, representada por infiltrado inflamatório rico em macrófagos densamente parasitados, plasmócitos e linfócitos, bem como edema e alargamento das vilosidades, sem alteração da arquitetura da mucosa e dilatação dos linfáticos. A função intestinal de absorção de pentoses encontra-se preservada, em investigação pela prova de d-xilose.

1.7 Diagnóstico diferencial

- **Parasitárias:**

- Esquistossomose hepatoesplênica;
- Síndrome de esplenomegalia reativa à malária
- Toxoplasmose
- Toxocaríase
- Doença de Chagas aguda.

- **Bacterianas:**

- Endocardite infecciosa subaguda;
- Febre tifóide;
- Tuberculose miliar;
- Brucelose;
- Abscesso hepático;
- Enterobacteriose septicêmica prolongada.

- **Fúngicas:**

- Histoplasmose disseminada.

- **Virais:**

- Infecção aguda pelo vírus da imunodeficiência humana;
- Citomegalovirose;
- Mononucleose infecciosa;

- Hepatite crônica com cirrose hepática e hiperesplenismo.

- **Neoplasias hematológicas mieloproliferativas:**

- Leucemia mielóide crônica;
- Metaplasia mielóide agnogênica(mielofibrose idiopática.

- **Neoplasias hematológicas linfoproliferativas:**

- Leucemia de células pilosas;
- Leucemia linfocítica crônica
- Leucemia linfocítica aguda
- Linfomas;
- Mieloma múltiplo;
- Macroglobulinemia de Waldenström.

- **Miscelânea:**

- Anemia hemolítica;
- Talassemia major;
- Doença de Gaucher;
- Doença de Still.

- **Malária**

É uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*.

Plasmodium vivax (50,3% dos casos), *Plasmodium falciparum* (48,8%) (BRASIL, 1980-1990). Ao final da primeira semana, com o desenvolvimento da resposta imune, a esquizogonia torna-se sincrônica e a febre tende a ser intermitente alta (40°C), geralmente de

início súbito, precedida de calafrios. Os paroxismos febris duram entre 2 a 6 horas, seguidos de sudorese profusa. Com a evolução da doença, o indivíduo torna-se progressivamente anêmico. Ocorre seqüestro de hemácias, parasitadas ou não, pelo sistema reticuloendotelial e, ao final da primeira semana, o fígado e o baço geralmente podem ser palpados, ambos dolorosos. Ocorre em alguns casos ruptura esplênica espontânea ou decorrente de palpação grosseira. A icterícia surge como conseqüência de hemólise intravascular rápida, que ultrapassa a capacidade excretora do fígado. Os sinais e sintomas da malária crônica constituem em fraqueza, surtos intermitentes de febre, anemia intensa e hepatoesplenomegalia. Não há desenvolvimento nesta condição de cirrose ou fibrose hepática apreciável, mesmo nas formas de longa duração. A confirmação do diagnóstico é feita pela demonstração do parasito em lâmina de sangue periférico (esfregaço ou gota espessa), coradas por um derivado do Romanowsky (Giemsa ou May-Grünwald-Giemsa).

- **Síndrome da mononucleose infecciosa**

Doença causada pelo herpesvírus Epstein-Barr (EBV) em mais de 90% dos casos, porém, outros agentes infecciosos causam a doença denominada mononucleose-símile ou “like” entre os quais; o citomegalovírus, adenovírus, vírus da hepatite, Virus da imunodeficiência humana, vírus da rubéola, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Listeria monocytogenes*.

O período de incubação é de 30 a 50 dias. Em 10 a 20% das pessoas saudáveis soropositivas excretam o vírus EBV.

O EBV tem sido associado ao linfoma de Burkitt na África, ao carcinoma nasofaríngeo, à doença de Hodgkin, linfoma de células B em pacientes transplantados e em portadores de imunodeficiência, incluindo AIDS, leucoplasia oral pilosa e pneumonia intersticial linfóide.

Caracterizada por linfadenomegalia generalizada, com gânglios pouco dolorosos, móveis, sem sinais flogísticos, não aderentes. As amígdalas são freqüentemente hipertrofiadas e hiperemiadas e cobertas por um exsudato pseudomembranoso simulando angina diftérica. Há exantema maculopapular em 10% dos casos, febre, sinal de Hoagland (edema palpebral). Esplenomegalia está presente em 50%, hepatomegalia em 15%, e alterações de enzimas hepáticas são detectadas em 80% dos pacientes. O hemograma é bem característico, sendo

evidenciável, em mais de 90% dos casos, leucocitose com 10.000 a 20.000 células/ml, dos quais 2/3 são linfócitos. Os linfócitos atípicos correspondem a 20-40% do total. Plaquetopenia (50.000-100.000) é freqüente.

O diagnóstico clínico é presuntivo, com linfomonocitose e linfócitos atípicos no hemograma, porém a confirmação etiológica só é dada por testes sorológicos específicos para pesquisa de anticorpos: 1) Reação de Paul-Bunnell-Davidson: detecção de anticorpos heterófilos. Tem valor significativo em títulos iguais ou superiores a 1:56, sugere o diagnóstico de mononucleose infecciosa.

- **Síndrome da imunodeficiência adquirida**

O protozoário leishmania pode comportar-se com oportunista em pacientes com SIDA prolongada, elevada carga viral e nível de linfócitos $CD_4^+ < 400$ células/mm³, recidivante por vários fatores dentre os quais, imunodepressão induzida por droga, transplante, doenças neoplásicas etc. estimando-se mais de 900 casos de co-infecção leishmaniose/HIV notificados na literatura. A ocorrência de linfadenomegalia (\geq a 0,5cm) de evolução crônica em lactentes e crianças, com gânglios localizados em vários sítios, indolores, móveis, sem sinais flogísticos e freqüentemente associados à hepatoesplenomegalia. A concomitância desses sinais clínicos com infecções bacterianas de repetição, pneumonia intersticial, aumento de parótidas, candidíase oral de repetição, diarreia crônica, desnutrição e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor reforça ainda mais a probabilidade de SIDA. Como não existe sinal patognomônico, é importante um alto grau de suspeição, lembrando-se que a ausência de evidências epidemiológicas de grupo de risco materno ou paterno não exclui a possibilidade de infecção pelo HIV.

- **Doença de chagas aguda**

Em cerca de 50% dos casos pode haver o sinal de Romaña (edema localizado em um dos olhos com sinais inflamatórios, conjuntivite e dacrioadenite). Há infartamento ganglionar regional. Na fase aguda pode cursar com febre, linfadenomegalias generalizadas, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningoencefalite e queda do estado geral. O hemograma apresenta alterações semelhantes às da síndrome de mononucleose e o diagnóstico pode ser feito por xenodiagnóstico, demonstração do parasito em gota espessa de sangue periférico e reações sorológicas.

Pode apresentar-se em crianças após transfusão de sangue e hemoderivados ou ocasionalmente em áreas endêmicas (principalmente regiões sudeste, centro-oeste e sul).

- **Linfomas e leucoses**

Infiltrações ganglionares malignas podem surgir em qualquer época da vida e devem ser diferenciadas das causas infecciosas. Ocorre acometimento de cadeias ganglionares, hepatoesplenomegalia e sinais sistêmicos freqüentes como febre, astenia, anorexia e palidez. Sangramentos e petéquias são particularmente freqüentes nas leucoses. O hemograma nas leucoses e a biópsia ganglionar e/ou de medula óssea nos linfomas podem esclarecer o diagnóstico. Ambos cursam com VHS muito elevada. Leucemia linfocítica aguda é a apresentação mais freqüente em crianças e leucemia mielóide crônica no adulto.

- **Esquistossomose mansônica**

A forma aguda traduz a hipersensibilidade do hospedeiro a antígenos do parasito, manifestando-se por sintomas e sinais inespecíficos: febre, anorexia, dor abdominal, acompanhados ou não de hepatoesplenomegalia. As manifestações da doença crônica podem evoluir durante muito tempo assintomáticas ou oligossintomáticas. Outros revelam dor abdominal, diarréia com raias de sangue, fígado aumentado de volume, inapetência e perda de peso. A forma hepatoesplênica ocorre em 2 a 10% dos indivíduos, predominando em crianças e adultos jovens. Há presença de aumento de volume abdominal e hemorragias digestivas, causadas por ruptura de varizes esofágicas, conseqüentes à hipertensão porta. É a forma mais grave da doença, e a ascite é o sinal mais freqüente de descompensação. A forma hepatointestinal ou intestinal representa 90% dos casos. Presença de diarréia alternando com obstipação. Pode ser assintomática, havendo apenas discreta hepatomegalia ao exame físico.

Os achados laboratoriais da doença na fase aguda consistem em leucocitose com eosinofilia, enquanto que na fase crônica, há leucopenia, plaquetopenia e anemia, na forma hepatoesplênica. A eletroforese de proteínas plasmáticas mostra hipergamaglobulinemia acentuada. A confirmação diagnóstica da esquistossomose é feita com a presença de ovos do parasito nas fezes. Exame parasitológico pelos métodos de sedimentação espontânea de Hoffman, Pons e Janer ou pelo Kato-Katz, permitem avaliação qualitativa da carga parasitária. A biópsia retal permite coletar fragmentos da mucosa intestinal e identificar a presença de ovos, e seu estado de viabilidade (SOLI, 1998).

- **Febre tifóide**

Doença febril, aguda, sistêmica, de transmissão fecal-oral causada por bactérias do gênero *Salmonella*, parasitos de crescimento intracelular, predominante no sistema fagocítico mononuclear, determinando hepatoesplenomegalia (50-60% dos pacientes), febre alta (39-40°C) no final da primeira semana, permanecendo nas semanas subseqüentes de forma contínua.

Diagnóstico laboratorial: isolamento bacteriano através de hemoculturas, coproculturas, mielocultura, urinocultura, cultura de fragmentos de roséola tifóidica, cultura de bile ou aspirado duodenal, fragmentos de gânglios, pleura, pericárdio, vesícula, líquido pleural, peritoneal ou de abscessos, líquido, etc. Diagnóstico sorológico: reação de Widal – quantificação de dois tipos de aglutininas, anti-O (antígeno somático) e anti-H (antígeno flagelar). O hemograma evidencia: anemia, leucopenia, neutropenia, linfomonocitose relativa e plaquetopenia. A VHS está normal ou baixa. O proteinograma está normal e a sorologia para LVA é negativa.

- **Endocardite infecciosa subaguda (EI)**

A EI é incomum na primeira década de vida, mais freqüente no sexo masculino, aguda ou subaguda. A síndrome começa usualmente duas semanas após o evento precipitante com sintomatologia constitucional como astenia, fadigabilidade, perda de apetite, emagrecimento, sudorese noturna e dores generalizadas. A febre é universal, exceto em pacientes debilitados, idosos e com uremia. Normalmente é de baixa intensidade (menos de 39°C), podendo nos casos agudos ser muito alta, acompanhada de calafrios, tosse e dor torácica de caráter pleurítico e progressão rápida para sepse. Os sopros cardíacos estão presentes na grande maioria dos pacientes. Um sopro novo ou mudança das características de um já existente ocorre em 30-50%, esplenomegalia é detectada em 30% dos casos.

O diagnóstico laboratorial inclui: hemograma com anemia normocrômica e normocítica (70%), leucocitose com desvio à esquerda, aumento de VHS na maioria dos pacientes, sumário de urina com hematúria microscópica, proteinúria e leucocitúria; proteinograma com hipergamaglobulinemia na EI subaguda. Diagnóstico imagenológico: a sensibilidade da ecocardiografia transesofágica é de 90-100% e pode detectar vegetações de

até 2mm de tamanho. A ecocardiografia transtorácica tem sensibilidade de 40 a 63% e o tamanho mínimo da vegetação detectável é de 5mm.

Os critérios utilizados para o diagnóstico são os da Duke University (CARVALHO, SILVA; ABUJAMRA, 1999; SOHSTEN e KAYE, 2002). Critérios maiores ou principais: 1) hemocultura positiva; 2) evidência de envolvimento cardíaco ao exame físico. Critérios menores ou secundários: 1) predisposição como uso de drogas endovenosas ou lesão cardíaca predisponente; 2) síndrome febril sem causas óbvias; 3) fenômenos vasculares – embolismo, infartos pulmonares, lesões de Janeway, manchas de Roth, hemorragias conjuntivais, aneurisma micótico, sangramento intracraniano; 4) fenômenos imunológicos – nódulos de Osler, glomerulonefrite, presença de fator reumatóide ou VDRL falsamente positivo; 5) evidência microbiológica e ecocardiograma consistente com EI, mas que não satisfaz ou preenche os critérios maiores. O diagnóstico definitivo: 1) critérios patológicos – microorganismo demonstrado por cultura ou por análise histológica em vegetação, êmbolo séptico ou abscesso cardíaco; 2) critérios clínicos – dois critérios maiores ou um critério maior e três secundários ou cinco critérios secundários.

- **Enterobacteriose septicêmica prolongada**

Em áreas endêmicas onde salmonelas e esquistossomos coexistem, pode acontecer uma interação sinérgica entre bactérias e parasitos acarretando quadros clínicos arrastados com “sintomas atípicos de febre tifóide”. As bactérias, através dos *pili* bacterianos, aderem-se a receptores específicos do intestino e tegumento do parasito, permanecendo até a morte destes.

Principais manifestações clínicas: febre irregular de longa duração acompanhada de calafrios, sudorese, cefaléia, hepatoesplenomegalia pronunciada, sendo a consistência do fígado firme e o mesmo levemente doloroso à palpação. O baço frequentemente ultrapassa a cicatriz umbilical. Há ainda emagrecimento e palidez cutâneo-mucosa. Diarréia e dor abdominal repetem-se em todos os casos. Adenomegalia, edema de membros inferiores, petéquias, sangue e muco nas fezes e icterícia podem fazer parte do quadro.

Proteínas plasmáticas: inversão da relação albumina/globulina. Eletroforese de proteínas realça elevação acentuada da fração gama, alfa 1 e alfa 2. O mielograma revela aumento de eosinófilos, hiperplasia da série granulocítica, plasmocitose e ausência de

bloqueios de maturação. O leucograma revela leucocitose moderada, eosinofilia, neutrofilia moderada. Eritrograma: redução dos eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Anemia hipocrômica e normocítica. Isolamento de enterobactérias através de hemoculturas, mielograma, urina, bile e fezes. Reação de Widal positiva quando *S. typhi* e *S. paratyphi* são os agentes responsáveis pela infecção. Sorologias para calazar negativas. O lobo esquerdo do fígado está mais aumentado devido à esquistossomose (BADARÓ; DUARTE, 2002).

- **Mieloma múltiplo**

Doença maligna de plasmócitos caracterizada pela presença de imunoglobulina monoclonal ou cadeias leves no soro e na urina e destruição óssea causada por tumores focais de plasmócitos sendo o exame radiográfico inicial normal ou com rarefação óssea, embora lesões líticas difusas, em “saca-bocado” sejam típicas. Acomete indivíduos com idade superior a 50 anos, queixando-se de dor óssea e palidez leve. A velocidade de hemossedimentação eleva-se. Síndromes clínicas freqüentes do mieloma múltiplo: 1) devidas ao envolvimento da medula óssea por plasmócitos: anemia, hipercalcemia, osteoporose e lesões osteolíticas, osteoesclerose (síndrome POEMS – polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia monoclonal e alterações cutâneas, plasmócitos extra-ósseos; 2) devidos à proteína anormal: hiperviscosidade, amiloidose, hipergamaglobulinemia (por hipercatabolismo); 3) devidas à excreção da proteína de Bence-Jones: insuficiência renal (hipercalcemia e amiloidose) O mielograma, obtido através do aspirado de medula óssea, evidencia 10-20% de plasmócitos, com morfologia bizarra apresentando células binucleadas e multinucleadas ou de aspecto normal. O padrão de normalidade dos plasmócitos perfaz menos de 5% das células da medula óssea.

- **Macroglobulinemia de waldenström**

É uma entidade clínica caracterizada por alteração clonal de linfócitos plasmocitóides secretores de IgM monoclonal elevada, responsável pela síndrome de hiperviscosidade: epistaxe, hemorragias retinianas, confusão mental e insuficiência cardíaca congestiva. Acomete idosos e apresenta evolução crônica, evidenciando-se ao exame físico como palidez cutâneo-mucosa, esplenomegalia e linfadenopatia. Algumas moléculas de IgM precipitam-se no frio, causando o quadro clínico de crioglobulinemia.

- **Histoplasmose**

É uma infecção causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* isolado de solo enriquecido com fezes de galinha, pombos, morcegos. É uma micose sistêmica com porta de entrada inalatória, não havendo contágio inter-humano. Nos indivíduos imunocompetentes a doença é assintomática, podendo determinar doença pulmonar autolimitada. Nos indivíduos imunocomprometidos, com SIDA, a infecção pode ocorrer por reativação endógena ou primária, causando doença progressiva disseminada. Sintomas inespecíficos: febre alta, calafrios, emagrecimento, náuseas, vômitos e diarreia, linfadenopatia (40%), esplenomegalia (30%), hepatomegalia, tosse e dispnéia, pneumonite com infiltrado retículo-nodular difuso, lesões de pele maculosas ou papulosas na face, tronco e extremidades. Os achados laboratoriais são pancitopenia, principalmente trombocitopenia, elevação de transaminases hepáticas e fosfatase alcalina. O exame direto consiste na pesquisa do parasito no creme leucocitário e aspirado de medula óssea, corados pelo Giemsa (LIMA, 1995).

1.8 Complicações do calazar

- **Sinais de alerta:**

- crianças com idade entre 6 meses e 1 ano;
- adultos com idade entre 50 e 65 anos;
- suspeita de infecção bacteriana;
- recidiva ou reativação de LVA;
- presença de diarreia ou vômitos;
- edema localizado;
- febre há mais de 60 dias.

- **Sinais de gravidade:**

- idade inferior a seis meses e superior a 65 anos;
- presença de icterícia;
- fenômenos hemorrágicos;
- edema generalizado;
- sinais de toxemia (alteração do estado de consciência, hipoventilação ou hiperventilação, bradicardia ou taquicardia, instabilidade hemodinâmica com hipotensão arterial e alteração da perfusão de órgãos, má perfusão periférica, oligúria e evidência de coagulopatia);
- desnutrição grave;
- presença de qualquer co-morbidade, inclusive infecção bacteriana.

Segundo Mattos (1998), hemorragias graves, como hematêmese, hematoquesia ou hematúria maciça necessitam de abordagem imediata. Se vultuosas ou com evidência de sinais de choque hipovolêmico, indica-se obtenção de acesso venoso profundo para reposição rápida de volume com controle da pressão venosa central. Punção de veia subclávia ou jugular é contra indicada, se houve trombocitopenia. A reposição deve ser feita com transfusão de concentrado de hemácias, inclusive nos casos de anemia com níveis de hemoglobina menores ou iguais a 6 g%, e plasma fresco. Evitar o uso de salicilatos, pois antiagregantes plaquetários precipitam hemorragias. Anasarca: repor o déficit de albumina e corrigir a má distribuição de líquidos, melhorar o estado nutricional do doente oferecendo-lhe uma dieta hiperprotéica e hipercalórica.

Infecções bacterianas são freqüentes em pacientes com calazar, chegando a atingir 50% ou mais do contingente internado, sendo mais vulneráveis os neutropênicos graves. Os germes envolvidos dependem de alguns fatores como a procedência do indivíduo, se domiciliar ou nosocomial, da faixa etária e do foco infeccioso inicial. Pele, aparelho respiratório e ouvido médio são os locais mais comuns. Após a coleta do hemograma e hemocultura com antibiograma, etc., iniciar terapêutica antibiótica empírica de largo espectro de ação nos neutropênicos graves.

Infecção respiratória na vigência de febre, tosse, taquidispnéia, dor torácica ventilatório-dependente e/ou abdominal, rastrear quadro pneumônico e traqueobronquite e tuberculose pulmonar. Solicitar hemograma, hemocultura, raio-x simples do tórax em incidência pósterio-anterior e perfil e pesquisa de BAAR no escarro.

Diarréia pode ocorrer como complicação da própria doença ou por infecção bacteriana secundária. Investigar a etiologia da doença, realizando exames (coprocultura, hemocultura, pH fecal, pesquisa de substâncias redutoras e eosinófilos nas fezes). Nos pacientes com risco de desidratação e desequilíbrio hidroeletrólítico, conduzir o caso repondo líquidos e eletrólitos. Eventualmente pode ser necessário o uso de antibióticos.

Hipertensão arterial desencadeada por lesões renais pelo próprio calazar ou pelo uso do antimônio pentavalente, tipo glomerulonefrite proliferativa mesangial difusa, segmentar ou focal. Uvéites: podem ocorrer como complicações tardias da doença e o tratamento deve ser feito sob orientação do oftalmologista.

Situações especiais como gravidez e lactação existem relatos de transmissão congênita desta entidade nosológica. Sabe-se pouco sobre as conseqüências fetais do antimônio pentavalente. Teme-se pela sua cardiotoxicidade, pois atravessa a barreira placentária. Durante a lactação recomenda-se amamentar o bebê 5 horas após a administração da injeção, quando os níveis de antimônio são desprezíveis. A anfotericina B atravessa a barreira placentária e atingem, no feto, cerca de 1/3 dos níveis maternos, porém sem evidências de anormalidades congênitas ou toxicidade fetal.

Entretanto, insuficiência renal, hipopotassemia, febre alta sem calafrios, torna o uso na gestante bastante cauteloso. A Insuficiência renal geralmente ocorre como conseqüência de sepse. A maioria dos efeitos colaterais do antimônio é dose e tempo-dependente, preconizando-se acompanhamento rigoroso da função renal, se necessário otimizar o ajuste terapêutico.

1.9 Profilaxia

A OMS recomenda que, para adequada profilaxia da LVA, devem ser adotadas medidas de detecção ativa e passiva de casos suspeitos da doença, e que os profissionais de saúde envolvidos no nível primário de atendimento estejam devidamente treinados na detecção dos sinais clínicos e epidemiológicos sugestivos da infecção, de modo a confirmar laboratorialmente o diagnóstico o mais precocemente possível e encaminhar o paciente para unidades secundárias especializadas, onde deve ser feita a demonstração do parasito em aspirados de baço ou medula. Capacitar a população para o reconhecimento de pacientes com a doença, bem como do vetor e de possíveis animais reservatórios. Conscientização acerca dos fatores de risco para a doença, estruturar centros regionais no sentido de atender aos pacientes, fornecer-lhes medicação e proceder à supervisão e o seguimento dos casos diagnosticados. Detecção e a eliminação dos reservatórios infectados.

Em 1953, o Ministério da Saúde do Brasil implantou a “Campanha contra a Leishmaniose Visceral”, que se baseava na identificação e eliminação dos cães portadores de LVA (DEANE; DEANE, 1955; CUNHA, ALENCAR e ANDRADE, 1963). No período compreendido entre 1953 e 1958, o diagnóstico de LVA canina era feito através da demonstração em órgãos linfóides de formas amastigotas do parasito em cortes histológicos de pele, fígado e baço (CUNHA; ALENCAR; ANDRADE, 1963). Em 1959, o teste sorológico com eluato de sangue através da reação de fixação do complemento (Cunha et al, 1963), teve grande impacto na realização de inquérito soroepidemiológico canino para detectar os cães doentes, em áreas endêmicas. O teste consistiu em realizar corte de fragmento da orelha do cão para coleta de sangue que é embebido em papel de filtro e depois é eluído em PBS processando-se a seguir a reação de imunofluorescência indireta – RIFI – (BRASIL, 1994). Existe reações cruzadas com Doença de Chagas, que também pode acometer este animal.

Segundo Genaro et al., (2000), a estratégia de combate ao vetor, através de borrifação de inseticidas organoclorados diclorodifeniltricloroetano (DDT) e hexacloroclohexano (BHC), organofosforados (Malathion e Sumithion) e piretróides sintéticos, 1,5 g/m² de parede (Neves, 1963), por dentro e por fora dos domicílios, até a altura de 3 metros, além do peridomicílio e dos anexos que abrigam animais domésticos, consegue reduzir a densidade

populacional de *L. longipalpis*. Medidas complementares tem surtido efeitos na redução dos flebotomíneos, durante as campanhas de combate ao Dengue, Malária e Doença de Chagas através de inseticidas aspergidos por ultrabaixo volume principalmente em áreas urbanas, onde a borrifação domiciliar é difícil.

O uso de repelentes individuais pode ser adequado por poucas horas, e não é acessível à população de baixo poder aquisitivo. Deve-se ainda proceder a manutenção rigorosa do controle de cães vadios, através de ações realizadas por centros de zoonoses, propiciando redução da população de cães errantes e possíveis fontes de infecção, tendo como base da campanha o diagnóstico clínico e eliminação sumária dos cães doentes, descoberta e eliminação de raposas infectadas e luta contra o vetor flebotomíneo

1.10 Tratamento

Na década de 40, foram introduzidos os antimoniais pentavalentes (Sb^V), considerados até os dias atuais como primeira escolha no tratamento dessa protozoose. O **antimônio de N-metilglucamina** é a única formulação disponível no Brasil, distribuído pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5 ml contendo 405 mg do Sb^V ou 1,5 g do sal (1 ml=81 mg do Sb^V). O mecanismo de ação dos antimoniais é pouco conhecido, porém admite-se que atue com ação leishmanicida dentro de macrófagos contra formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos no metabolismo da *leishmânia* (BERMAN et al., 1992). Atingem concentrações plasmáticas de 10 $\mu\text{g/ml}$ em 1 a 2 horas, sendo que 80% dos sais de antimônio são excretados rapidamente pelos rins em 6 horas, com meia-vida de 2 horas, e níveis plasmáticos de 1 a 2 μg permanecem após 8 a 12 horas depois da administração (REES et al, 1980; CHULAY; SPENCER; SMITH, 1988; BRYCESON et al, 1985; BADARÓ; DUARTE, 2002). Devido à rápida eliminação renal de maior parte da droga, alguns autores sugerem o uso por mais de uma dose diária, e o antimônio residual que se concentra nos tecidos sofre eliminação lenta com meia-vida de até 76 horas (BERMAN et al., 1992). Os níveis teciduais atingem o pico máximo no 12º dia, sendo o principal efeito colateral a toxicidade sobre o aparelho cardiovascular (Grimaldi e Tesh, 1993; Brasil, 1996), que se traduz por distúrbios de repolarização (achatamento ou

inversão da onda T, aumento do espaço QT e alterações do ritmo cardíaco) (CHULAY, SPENCER e MUGAMBI, 1985).

No Brasil, a dose recomendada do antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) é de 20 mg/kg/dia do Sb^V (=0,23 ml/kg), via IM ou EV, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias consecutivos (Brasil, 1998). No entanto, há alguns relatos de falência e refratariedade ao tratamento. A OMS e o Centro de Controle de Doenças (CDC) dos EUA têm recomendado doses progressivamente maiores em países como Sudão, Quênia e Índia, devido ao surgimento de resistência primária do parasito. Dose máxima diária recomendada de 850 mg de Sb^V tende a ser abandonada. Em casos de recidivas da doença um segundo tratamento com a mesma dose por tempo mais prolongado (40 dias ou mais) deve ser viabilizado, antes de rotular-se o caso como refratário primário ao tratamento com antimoniais. A resistência primária (1 a 2%) dos indivíduos previamente expostos aos antimoniais pentavalentes deve-se a tratamentos inadequados com baixas doses (BERMAN et al., 1986; HERWALDT; BERMAN, 1992; BRYCESON et al., 1979). Estudos “in vitro” revelam a existência de uma glicoproteína P em parasitos resistentes aos antimoniais isolados de pacientes previamente tratados com Sb^V e que recidivaram (GALVÃO-CASTRO et al, 1984).

Em casos de co-infecção HIV e Leishmaniose Visceral o tratamento inicialmente deve ser feito com antimonial nas doses usuais durante 40 dias consecutivos, e quimioprofilaxia com dose quinzenal de 20 mg/kg por período indeterminado ou tratamento de manutenção com Anfotericina B, 1 mg/kg/dia EV (dose máxima por aplicação de 50 mg), 2 vezes por semana *ad eternum*. Pacientes com miocardiopatia chagásica ou arritmias sinusais devem ser tratados com drogas alternativas ou doses de 10 mg/kg/dia por 20 a 30 dias com antimoniais, com repetições sucessivas de intervalos de 15 dias até cura do paciente (BADARÓ; DUARTE, 2002).

Toxicidade dos antimoniais pentavalentes por serem substâncias de depósito, a maior parte das reações adversas aparecem ao longo do tratamento, principalmente após a segunda semana. Mialgia e artralgia são queixas relatadas em 85% dos pacientes; cefaléia, anorexia, vômitos, plenitude gástrica e pirose em 30% dos indivíduos. Ocorre pancreatite acompanhada de dor abdominal em 90% dos pacientes, às vezes sem tradução clínica. Porém o tratamento deverá ser interrompido se ocorrer um aumento em relação aos níveis normais, superior a 4 vezes para amilase e 15 vezes para lipase (BRASIL, 1996). As enzimas hepáticas elevam-se

em 3 a 5 vezes em relação aos seus valores normais. Manifestações mais graves de intoxicação cardiovascular, às vezes sem repercussão hemodinâmica importante (Franle, Wignall, Cruz et al, 1990) traduzem-se por distúrbios da repolarização com achatamento ou inversão da onda T, aumento do espaço QT e arritmias após 20 dias de tratamento com doses convencionais de 20 mg/kg/dia. Arritmias ventriculares são verificadas após o trigésimo dia (CHULAY; SPENCER; MUGAMBI; 1985). Arritmias severas, independente de doença cardiovascular subjacente no curso da terapêutica com os antimoniais pentavalentes podem causar a Síndrome de Morte Súbita (HERWALDT; BERMAN, 1992; BRYCESON et al., 1985). Geralmente com a supressão do tratamento todos os efeitos colaterais desaparecem. Queda de cabelo, alterações da coloração da pele e mudanças do paladar acontecem tardiamente. Contra indicações aos antimoniais pentavalentes: gestantes; portadores de cardiopatias, nefropatias e hepatopatias; doença de Chagas e tuberculose pulmonar (BRASIL, 1998).

- **Drogas alternativas para o tratamento do calazar**

A **anfotericina B desoxicolato sódico** é um antibiótico poliênico heptano obtido a partir de culturas do *Streptomyces nodosus*, provoca efeito fungistático, fungicida e potente ação imunoestimulante tanto sobre a imunidade humoral quanto a celular. Seu mecanismo de ação ocorre através da ligação preferencial da droga com ésteres, interferindo no episterol, precursor do ergosterol presente na membrana plasmática da *leishmânia* (BERMAN, HANSON et al, 1986; BRASIL, 1996). Devido ao risco de agregação das partículas coloidais e floculação, a anfotericina B não deve ser misturada a outros medicamentos, soluções cristalóides ou contendo eletrólitos, e por ser fotossensível, deve ser infundida ao abrigo da luz. A droga é administrada exclusivamente por via endovenosa, em infusão lenta (4 a 6 horas), na dose de 0,5 a 1,0 mg/kg, não ultrapassando o limite máximo por dose de 50 mg/dia. É cumulativa nos tecidos, podendo ser usada em dias alternados e em casos de resistência aos antimoniais deve ser usada na dose total de 15 a 25 mg, podendo em alguns casos chegar a 50 mg, não ultrapassando um total de 3g ao término do tratamento, a qual geralmente é atingida entre 40 e 60 dias do início do mesmo (DAVIDSON e CROFT, 1991).

Os efeitos colaterais da Anfotericina B incluem cardio e nefrotoxicidade. É altamente tóxica para células do endotélio vascular, sendo a flebite química um para-efeito comum. Hipopotassemia, hipomagnesemia, distúrbios do comportamento, dentre outros efeitos:

cefaléia, febre, calafrios, astenia, anemia, trombocitopenia, mialgias e artralguas, vômitos, hipotensão, convulsões e reações anafiláticas (DAVIDSON e CROFT, 1991; BRYCESON, 1985). Substâncias antiinflamatórias não esteroidais, inibidoras da cicloxigenase, como o diclofenaco, 1 hora antes do início do tratamento ou uso sistêmico de succinato sódico de hidrocortisona minimiza os para-efeitos.

A nefrotoxicidade é a mais importante complicação da Anfotericina B. A filtração glomerular diminui em aproximadamente 40% na maioria dos doentes, devido à vasoconstrição renal com conseqüente isquemia cortical e diminuição da filtração glomerular. Ao longo do tratamento pode ocorrer hipopotassemia devido à perda aumentada deste eletrólito no túbulo contorcido distal, que pode agravar-se pela presença de acidose tubular renal. A continuidade do tratamento leva à insuficiência renal aguda. Critérios para administração de anfotericina B nos pacientes com leishmaniose visceral incluem monitorização dos níveis séricos de creatinina 3 vezes por semana. ECG semanalmente. Iniciar o tratamento com 1/10 da dose diária, aumentando progressivamente até a dose máxima diária tolerada pelo paciente, respeitando a dose por kg/peso e o máximo de 50 mg/dia. Infundir previamente solução salina isotônica em fase rápida ½ hora antes diminui consideravelmente a nefrotoxicidade. O desoxicolato de anfotericina B está indicado como primeira escolha para pacientes com sinais de gravidade (idade inferior a 6 meses e superior a 65 anos, icterícia, fenômenos hemorrágicos, edema generalizado, sinais de toxemia, desnutrição grave, co-morbidades, infecção bacteriana), recidivantes, falha terapêutica e gestantes. na dose de 1mg/kg/dia em dose única diária por 14 a 20 dias consecutivos. A **anfotericina B lipossomal** está formalmente indicada para transplataados renais, com insuficiência renal instalada previamente ao tratamento ou refratários ao desoxicolato de anfotericina B, na dose de 3mg/kg/dia durante sete dias ou 4mg/kg/dia durante cinco dias, em dose única diária. Os efeitos colaterais com esta droga são mínimos, podendo surgir febre, cefaléia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar. Infundir a medicação durante 30 a 60 minutos, sempre monitorando função renal e potássio sérico. Na disfunção renal com níveis de creatinina acima de duas vezes o maior valor de referência, interromper o tratamento por 2 a 5 dias, reiniciando em dias alternados, quando houver melhora do clearance de creatinina, utilizando a equação de Cochrift para adultos ($140 - \text{peso em kg} \times \text{idade em anos} / 72 \times \text{creatinina sérica}$). Se mulher multiplica-se por 0,85. Para o clearance de creatinina em crianças, a equação de Schwartz = $0,55 \times \text{altura em centímetro}$. A **pentamidina**

é uma diamidina aromática apresentada sob a forma de dois sais, o Isetionato e o mesilato, este mais pancreatotóxico. Foi usada a princípio no tratamento da pneumocistose pelo fungo *Pneumocystis jiroveci* e, no final da década de 30, foi administrada pela primeira vez no tratamento da leishmaniose. Seu mecanismo de ação é pobremente conhecido, mas parece estar relacionado à inibição da RNA polimerase, função ribossomal e síntese de proteínas e de fosfolípidos. O efeito leishmanicida deve-se à ligação seletiva no complexo mitocondrial do DNA cinetoplasto da *leishmânia*, causando edema e perda de função (BRASIL, 1996; BRYCESON, 1985). A dose recomendada no tratamento do calazar é de 4 mg/kg, EV, do sal de Isetionato de Pentamidina três vezes por semana durante 5 semanas. A concentração sanguínea de pentamidina varia de 0,2 a 1,4 mcg/ml em 1 hora. Níveis sanguíneos tissulares máximos são atingidos em 5 a 8 dias após o início da terapêutica. Meia-vida sérica de 4 a 12 dias. Em torno de 50% da droga é excretada em 5 dias pelo fígado e rins. Em indivíduos com insuficiência renal não há necessidade de realizar ajustes de dose. A droga não é dialisável por diálise peritoneal ou hemodiálise (TAVARES, 1996; MISHRA, BISWAS, JHA, KHAN, 1992).

Sua toxicidade é bem conhecida e pode causar anorexia, astenia, náuseas, vômitos, diarréia, adinamia, exantemas, neutropenia, trombocitopenia, hipocalcemia, neurite periférica, convulsões, hipotensão, hipoglicemia prolongada por lesão de células β pancreáticas, que pode resultar na seqüela de Diabetes Mellitus em cerca de 10 a 15% dos casos. A nefrotoxicidade pode surgir em 25% dos casos. Habitualmente ocorre pancreatite. Há formação de abscessos frios (estéreis) e dolorosos quando administrada por via intramuscular (TAVARES, 1996). Quimioprofilaxia com 4 mg/kg de pentamidina, uma vez por mês, tem sido recomendada para pacientes com co-infecção HIV/leishmaniose. Atualmente não fazemos indicação ao tratamento com esta droga.

O **alopurinol**, um ribosídeo análogo da hipoxantina hidrolisada, interfere na síntese protéica do parasito, ao ser incorporado no ácido ribonucléico da *leishmânia* em vez do ATP (Bryceson, 1985). Mostrou ser um potente inibidor competitivo da síntese das purinas por protozoários do gênero *Leishmania*, e utilizado na dose de 21 mg/kg/dia durante 21 a 28 dias. O alopurinol tem sido utilizado em associação ao antimomial pentavalente, sem que os resultados sejam conclusivos (KAGER et al, 1981).

O uso de **imunomoduladores como interferon gama** (IFN- γ) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) como coadjuvantes no tratamento da LVA, resulta em produção diminuída de IL-2 e INF- γ , dentre outras citocinas, responsáveis pela persistência do parasito e progressão da doença (Brasil, 1996). Segundo Murray; Granger; Mohanty (1991), o INF- γ é o mais importante ativador da capacidade microbicida de macrófagos, sobretudo para casos de resistência a quimioterapia convencional confirmada na Índia por LOTHORLARY; NECHALI; CHRISTIAENS (1990). A dose recomendada é de 50-100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de superfície corpórea ($4 \times \text{peso em kg} + 7 \div \text{peso em kg} + 90$) durante 10 a 15 dias. Os principais efeitos colaterais relacionados ao uso de interferon foram febre moderada, sensação de “formigamento” no local da aplicação, adinamia, mialgia e cefaléia.

O **GM-CSF** promove a liberação medular de granulócitos e células mononucleares granulocitopênicas. A pancitopenia periférica com contagem de neutrófilos inferiores a 1500 células/ mm^3 é fator de risco para aquisição de infecção bacteriana em pacientes com calazar. (ANDRADE, CARVALHO, ROCHA, 1990; NICODEMO, 1991). O uso de rH-GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos recombinante humano) no tratamento de disfunções hematológicas em portadores de LVA neutropênicos graves (< 1500 neutrófilos/ mm^3) reduz sensivelmente o número de infecções bacterianas ou virais, além de rápida involução dos sinais e sintomas (Badaró; Johnson 1993), elevando significativamente o número de leucócitos; utilizada na dose de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, por via SC, durante 5 a 10 dias. Recomenda-se monitorização do leucograma, devendo-se suspender a droga quando o número de leucócitos ultrapassar 10000 células/ mm^3 . As reações adversas são: febre, leucocitose, sensação de calafrios e desmaios.

Indicações de internação: Pacientes graves e/ou com sinais de alerta e pacientes com as seguintes alterações laboratoriais:

- leucócitos $< 1000/\text{mm}^3$ ou neutrófilos $\leq 500/\text{mm}^3$;
- plaquetas menor que $50.000/\text{mm}^3$;
- hemoglobina $\leq 7 \text{ g/dl}$;
- creatinina sérica acima de duas vezes o maior valor de referência;

- atividade de protrombina < 70 %;
- bilirrubina acima do maior valor de referência;
- enzimas hepáticas acima de cinco vezes o maior valor de referência;
- albumina < 2,5 g/dl.

- **Indicações de uso de antibióticos:**

Antibioticoprofilaxia: está indicada para pacientes com idade inferior a 2 meses e para os que apresentam neutrófilos < 500 células/mm³. Sugere-se a associação de ceftriaxone 75 a 100mg/kg/dia em uma a duas aplicações endovenosas, mais oxacilina 100 a 200mg/kg/dia de 6/6horas. Este esquema deverá ser mantido por três a cinco dias nos neutropênicos graves desde que as culturas tenham sido negativas e na ausência de piora clínica, com aumento do número de neutrófilos. Já para lactentes menores de 2 meses de idade, prolongar o uso de antibióticos por sete dias.

Antibioticoterapia: indica-se para pacientes com quadro infeccioso definido como impetigo, celulite, otite, infecção do trato urinário e para os que apresentam sinais de toxemia, mesmo sem o encontro do foco de infecção. Na presença de toxemia indica-se oxacilina + ceftriaxone nas mesmas doses acima, ou cefepime 50mg/kg/dose 2 a 3 vezes dia, com um máximo de 2 gramas dia para crianças até 40kg. Para adultos 1 a 2g/dose x 2 (x 3 para Pseudomonas e neutropênicos). Este esquema deverá ser mantido por 10 dias ou de acordo com gravidade do caso e sítio de infecção poderá ser reajustado. Não existe consenso na literatura, do uso de antimicrobianos nos casos onde o hemograma revela aumento de bastões com desvio à esquerda na ausência de outros sinais de infecção. Antes de iniciar o uso de antibióticos, solicitar hemocultura, urinocultura, bacterioscopia e cultura de secreções suspeitas de infecção e radiografia simples do tórax em pósterio-anterior e perfil.

- **Suporte hemoterápico:**

- Concentrado de hemácias:

- Hemoglobina < 7g/dl ou hematócrito < 21%;
- Repercussões hemodinâmicas associadas à anemia;

- Dose: 300ml/transfusão ou 10ml/kg/transfusão para crianças com peso até 30kg.
- • Concentrado de plaquetas:
 - Plaquetas $< 20.000/\text{mm}^3$ ou sangramentos associados a plaquetopenia moderada.
 - Dose: uma unidade para cada 7 a 10kg de peso corporal.
- • Plasma fresco congelado:
 - Sangramentos graves não controlados após transfusão de plaquetas.
 - Dose: 10 a 20 ml/kg/transfusão de 8/8h ou de 12/12h.
- Vitamina K: indicada para pacientes com icterícia quando o tempo de atividade de protrombina (TAP) estiver menor que 70%, e mantida somente caso observe-se elevação da atividade protrombínica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Verificar a sensibilidade de um teste rápido imunoenzimático para diagnóstico de leishmaniose visceral americana utilizando o antígeno recombinante rK39 em soro de pacientes com calazar confirmados parasitologicamente.

2.2 Específicos

- ✓ Definir a sensibilidade do teste rápido rK39;
- ✓ Identificar reações cruzadas com outras doenças prevalentes em nossa região;
- ✓ Observar a evolução do rK39 nos pacientes com calazar tratados, durante seis meses de seguimento ambulatorial;
- ✓ Comparar a sensibilidade do rK39 com os testes de detecção de anticorpos anti-leishmania visceral por ELISA, imunofluorescência indireta e pesquisa direta do parasito em aspirado medular;
- ✓ Verificar a existência de anticorpos séricos através do rK39 versus doença em fase ativa.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal.

3.2 Lócus da pesquisa

O estudo foi realizado no período de julho de 2001 a julho de 2003, em três unidades hospitalares de referência terciária de saúde de Fortaleza-CE, compreendendo o complexo do Hospital Universitário Walter Cantídio da UFC, Hospital São José de Doenças Infecciosas e Hospital Infantil Albert Sabin, vinculados ao ensino, pesquisa e extensão e conveniados ao Sistema Único de Saúde (SUS).

3.3 População alvo/amostra

O estudo no soro foi realizado em 173 pacientes, sendo que 123 pacientes apresentaram exame parasitológico positivo para *Leishmania chagasi*; 50 pacientes apresentavam manifestações clínicas, laboratoriais e epidemiológicas sugestivas de calazar com aspirado de medula óssea negativo.

- **Caso-contrôles**

- Compreenderam 70 soros de pacientes portadores de doenças de Chagas (estocados em freezer a -20°C), positivos nas reações de imunofluorescência indireta, ELISA e hemaglutinação para *T. cruzi*;

- 12 pacientes com leishmaniose tegumentar americana confirmados clínica e sorologicamente através de imunofluorescência indireta e ELISA;
- 20 pacientes com clínica sugestiva de dengue e com pesquisa de anticorpo IgM positivo;
- 2 pacientes com hemocultura positiva para salmonelose;
- 2 com tuberculose pulmonar;
- 2 com lupus eritematoso sistêmico;
- 1 paciente com doença de Wilson;
- 1 portador de paracoccidiodomicose brasileira e
- 5 casos de doença linfoproliferativa.

3.4 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de *Leishmania chagasi*, através do padrão ouro da visualização parasitária em aspirado medular, de todas as faixas-etárias, ambos os sexos, características étnicas variadas, indiferente estado geral de saúde, classe econômica, procedência e profissão, sendo em seguida realizados os testes do antígeno rK39, imunofluorescência indireta e ELISA.

Todos os pacientes encontravam-se internados. Os indivíduos foram submetidos à realização de exames complementares: hemograma, velocidade de hemossedimentação, hemoculturas, proteinograma, prova de função hepática.

3.5 Critérios de exclusão/descontinuação da pesquisa

Quando o resultado do mielograma foi negativo para presença de leishmania ou tendo outro desfecho diagnóstico ou quando por livre e espontânea vontade o paciente ou seu responsável decidiu não participar do protocolo.

3.6 Coleta de dados

Os dados de cada paciente foram coletados através de um questionário sob investigação direta com o paciente e através de revisão dos prontuários. Foram anotados sinais, sintomas, exames laboratoriais, tratamento e complicações infecciosas concomitantes.

3.7 Análise dos dados

Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados em um questionário estruturado contendo dados pessoais, exame físico, diagnóstico laboratorial, tratamento anti-leishmânia utilizado e desfecho na alta. Os dados foram digitados no programa de dados EPI-INFO 6.04. Após verificação da consistência dos dados, estes foram analisados. Do ponto de vista descritivo, as frequências, intervalos de confiança de 95%, médias e desvios-padrões foram calculados para as variáveis quantitativas (idade, tempo de doença, dados laboratoriais etc) e proporções e intervalos de confiança para as variáveis qualitativas (sexo, queixas, sinais e sintomas, diagnóstico parasitológico, sorologias, tratamento). Foram realizadas associações entre as variáveis qualitativas ou contínuas categorizadas em intervalos categóricos. Utilizou-se o teste t de Student para comparação de médias e proporções. Em todos os casos foi considerado para significância um erro tipo alfa menor que 5%.

3.8 Questões éticas da pesquisa

A pesquisa foi executada conforme os aspectos éticos definidos na Resolução 196/196 do Conselho Nacional de Saúde/MS, sendo respeitados o sigilo das informações e os dados colhidos na pesquisa somente utilizados para fins da investigação diagnóstica, pós-consentimento livre e esclarecido ou mediante anuência do representante legal dos menores de idade ou de adultos impossibilitados de responder de per si, orientados sobre os eventuais riscos e benefícios dos procedimentos a serem realizados. O protocolo do estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HIAS e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE.

3.9 Provas diagnósticas

- **Pesquisa do parasito no mielograma**

A punção aspirativa da medula óssea foi realizada na crista ilíaca em crianças e adultos e ocasionalmente no manúbrio esternal em adultos. Após aplicação de anestésico local, intriduziu-se a agulha com mandril no local da punção. Uma vez atravessado o periósteo (perda de resistência) com movimentos circulares, verificava-se a fixação da agulha na esponjosa. O mandril era então retirado, e algumas gotas de material medular era aspirado com seringa estéril de 20 ml e realizados os esfregaços em lâminas de vidro. Após secagem, o material era fixado em álcool metílico puro (metanol a 100%) durante um minuto e depois corado pelos derivados do Romanowsky (Giemsa ou May-Grünwald Giemsa). Para o exame dos esfregaços utilizou-se microscópio com objetiva de imersão em óleo vegetal (aumento de 100x). apesar do aspirado esplênico e hepático serem mais concentrados em leishmania e possibilitar melhor sensibilidade diagnóstica, não se constitui como método de rotina em nosso serviço, pelos ricos de sangramento inerentes ao procedimento.

- **Antígeno recombinante K39 como teste rápido para detecção de leishmaniose visceral humana, princípios do método diagnóstico:**

O antígeno recombinante rK39 é uma seqüência de 298 aminoácidos com peso molecular de 39 kilodaltons (kDA), isolados do ácido desoxirribonucléico encontrado no cinetoplasto da leishmania e reproduzido pelo laboratório InBios international, Inc. Seattle, WA, Estados Unidos(www.inbios.com). É um método diagnóstico de imunoenensaio qualitativo imunocromatográfico impregnado em membrana de nitrocelulose que detecta anticorpos anti leishmania em espécimes humano em soro ou plasma conforme recomendações do fabricante. A fita para teste rápido possui duas linhas ou bandas sendo uma delas o controle que é pré-coberta com anticorpo de frango rico em antiproteína A, e a linha do teste contendo o antígeno recombinante rK39 de leishmania do complexo L. donovani. Durante o teste o soro reage com a antiproteína A conjugada com ouro coloidal que é o corante que foi pré-coberto na linha do teste. Por capilaridade a mistura migra na membrana para reagir com o antígeno rK39 e produzir uma linha vermelha, que indica resultado positivo, enquanto sua ausência indica resultado negativo. A linha vermelha sempre aparecerá no controle, garantindo portanto, volume suficiente e fluxo adequado da amostra e o controle de qualidade do material, inclusive da solução tampão que acompanha o kit.

Como precauções universais, manipular a amostra e reagentes do teste como potencialmente contagiosos, mantendo medidas padrões de biossegurança durante todos procedimentos, bem como o correto descarte do soro e testes usados. Estas medidas incluem o uso de roupas protetoras, óculos, máscaras e luvas descartáveis, evitando o contato com as mãos, olhos, mucosas e pele, durante a realização do exame. Recomenda-se também não comer, beber ou fumar no ambiente onde o soro e testes estão sendo realizados. A solução tampão contém um conservante que pode desencadear reações alérgicas em pessoas predispostas. Como reforço aos cuidados pelo profissional no manuseio do material todas as amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas. O teste rápido rK39 exclusivamente para diagnóstico IN VITRO.

A fita imunocromatográfica é acondicionada em envelope aluminizado individualmente, contendo uma almofada de sílica em seu interior para evitar umidade. Recomenda-se juntamente com o frasco da solução tampão armazenar o produto em temperatura ambiente entre 12°C - 28°C. Depois de aberto, o frasco da solução tamponante

deverá ser mantido sob refrigeração entre 2°C - 8°C, para preservação de suas propriedades químicas. Exposições superiores a 30°C pode prejudicar a performance do teste. As fitas não devem ser congeladas e após sua remoção do kitt lacrado utiliza-las no prazo de 1 hora prevenindo-a de umidade, segundo normas técnicas do fabricante.

Os cuidados com as amostras incluem a centrifugação do sangue e separar o soro do coágulo das células vermelhas para evitar hemólise. O plasma também poderá ser utilizado no teste mantendo o mesmo perfil de confiança que a testagem com o soro. Para garantir rigor e controle de qualidade das amostras de soro ou plasma não mantê-los por períodos prolongados a temperatura ambiente, e uma vez mantido sob refrigeração entre 2°C - 8°C utilizá-lo até 3 dias. Caso o soro seja congelado a temperaturas inferiores a 20°C sua validade permanecerá por prolongado período de tempo, servindo para retestagens futuras. Descongelar completamente o soro antes do teste e o mesmo não poderá ser congelado e descongelado repetidas vezes pelo risco inerente ao desgaste de suas propriedades físicoquímicas.

Para realização dos procedimentos sorológicos foram coletados 3,5 ml de sangue venoso em frascos com ou sem anticoagulante, centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos, separando-se em seguida o soro e/ou plasma para realização da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* através do teste com rK39, estando todo material a ser utilizado, inclusive a solução tampão em temperatura ambiente no momento da realização dos experimentos, utilizando 20µ do soro ou plasma na esponja encontrada na extremidade da fita e adicionando 2 a 3 gotas da solução tamponante. A migração por capilaridade acontece rapidamente e a leitura do resultado não deve exceder a 10 minutos, pois resultados interpretados após esse intervalo torna-se questionável.

A interpretação de um resultado positivo se dá quando aparecem na fita as duas bandas vermelhas, mesmo que uma tênue e pálida linha apareça, confirmando que naquela amostra existe anticorpos para leishmania do complexo donovani. O resultado do teste é negativo quando aparece apenas a linha rubra na banda do controle e inexistência de anticorpos para calazar.

Um resultado deverá ser considerado inválido por provável má qualidade técnica da fita, quando não se visualizar nenhuma linha tanto na banda do controle quanto na do teste.

Igualmente interpreta-lo como resultado inválido caso não apareça a linha na banda do controle e evidencie-se na linha do teste, devendo portanto indicar-se uma nova retestagem utilizando fitas bem armazenadas e até mesmo soro ou plasma fresco.

A alta sensibilidade do antígeno rK39 depende do número de epítomos contra os quais formam-se anticorpos séricos. Já a alta especificidade é dependente da existência exclusiva dos epítomos de *L. chagasi* nos soros. É possível que haja passagem de IgG na urina de pacientes portadores de calazar e que anticorpos anti-leishmania do complexo donovani para a detecção diagnóstica pelo rK39 possa ser confirmada em ensaios clínicos, apesar da indicação formal pelo laboratório fabricante para uso exclusivo na investigação de calazar humano usando soro ou plasma.

A técnica de imunofluorescência indireta consistiu na reação de antígenos e anticorpos, fixados em lâminas de microscópio para imunofluorescência. Numa etapa seguinte utilizou-se um conjugado fluorescente o isotiocianato de fluoresceína ligado a um anticorpo monoclonal anti-IgG humana. A leitura foi realizada em microscópio de luz ultravioleta. Os soros controles estavam presentes em todas as lâminas para comparação no momento da leitura, a seguir eram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. A seguir eram lavadas em solução de PBS durante 5 minutos. Lavagem rápida em água destilada e secadas durante 10 minutos a 37° graus. Montadas as lâminas com glicerina tamponadas e levadas ao microscópio de fluorescência e com focalização do orifício do soro controle negativo para observar a fluorescência, com observação do “background” do teste, sendo considerados reativos aqueles que apresentaram fluorescência mais intensa que o “background” do soro controle negativo. Foram considerados não reativos os controles que apresentaram fluorescência semelhante ao do controle negativo. Foram considerados reativos todos os soros que apresentam positividade a partir da diluição de 1:40, porém o Ministério da Saúde do Brasil autoriza a confirmação diagnóstica e tratamento em caso de positividade da reação com títulos acima de 1:80, uma vez afastada outras possibilidades diagnósticas.

▪ **Imunofluorescência indireta**

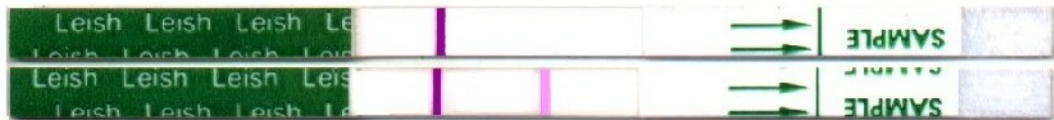
Conforme descrita por Pessoa (1956), a técnica utiliza como antígenos promastigotas de *Leishmania donovani* cultivados em meio semi-sólido e fixados em lâminas de microscopia. O azul de Evans é usado como corante-contraste, tornando a leitura de lâmina fluorescente verde-amarelada específica.

▪ **Reação de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Antony et al (1980) adaptaram esta técnica inicialmente para estudar a leishmaniose tegumentar americana. Em 1985, Mohamed et al utilizaram promastigotas intactos de *Leishmania donovani* como antígeno. A reação de ELISA é um método imunológico que decorre da ativação de uma enzima de tipo *flip-flop* (geralmente uma peroxidase) pela ligação do antígeno de *Leishmania chagasi* com seu anticorpo específico (o plasma do paciente). A ativação pelo complexo antígeno-anticorpo desta enzima provoca a reação na qual um substrato incolor é transformado em um composto colorido, cuja intensidade é diretamente proporcional à quantidade de complexos Ag-Ac (que é determinada pela quantidade de Ac circulante no sangue do paciente). A titulação do anticorpo é realizada por um fotolorímetro na banda de luz própria do metabólito produzido pela reação enzimática.

4 RESULTADOS

Foram estudados 288 espécimes sorológicos de pacientes através do TRALd (teste rápido anti-leishmania do complexo donovani) rK39 (Figura 1), estabelecendo-se os seguintes desfechos diagnósticos: 123 pacientes apresentaram mielograma positivo para *Leishmania chagasi*. Em 50 aspirados de medula óssea não visualizou-se presença de parasitos, apesar de evidências clínico-epidemiológicas e exames laboratoriais complementares terem sugerido fortemente a hipótese de leishmaniose visceral americana. Dos 115 pacientes incluídos como controles negativos, distribuí-se da seguinte maneira: 70 soros de pacientes com doença de Chagas, 20 com dengue, 12 com leishmaniose tegumentar americana, 5 com doença linfoproliferativa, 2 com salmonelose septicêmica, 2 com tuberculose pulmonar, 2 com lupus eritematoso sistêmico, 1 paciente com doença de Wilson, e 1 portador de paracoccidiodomicose brasileira.



1. Teste rK39 negativo. 2. Teste rK39 positivo.
Fonte: Pesquisa do autor

Figura 1: Resultados do dipstick rK39 (TRALd)

Dos 123 pacientes com mielograma positivo para leishmânias, 122 (99,2%) foram positivos pelo TRALd através do rK39. Dos 115 (100%) pacientes com aspirado medular e sorológico comprovadamente negativos, todos foram não reagentes pelo TRALd. Isto nos dá uma sensibilidade do teste de 99,2% (Intervalo de confiança de 95%:96.0-99.9%).

Tabela 1 - Sensibilidade de técnicas sorológicas para diagnóstico da LVA, usando como padrão ouro, 88, 87 e 123 pacientes com quadro clínico sugestivo da doença e presença de *Leishmania sp* na medula óssea, respectivamente:

TÉCNICA	PACIENTES REAGENTES	SENSIBILIDADE (%)	
		PONTUAL	I.C. 95
ELISA com antígeno bruto	70	79,5	69,6 – 87,4
Imunofluorescência indireta	71	81,6	71,86 – 89,1
ELISA com antígeno rK39	122	99,2	96,0 - 99,9

Teste do Qui-quadrado, 2 graus de liberdade e $p < 0,001$

Fonte: Pesquisa do autor

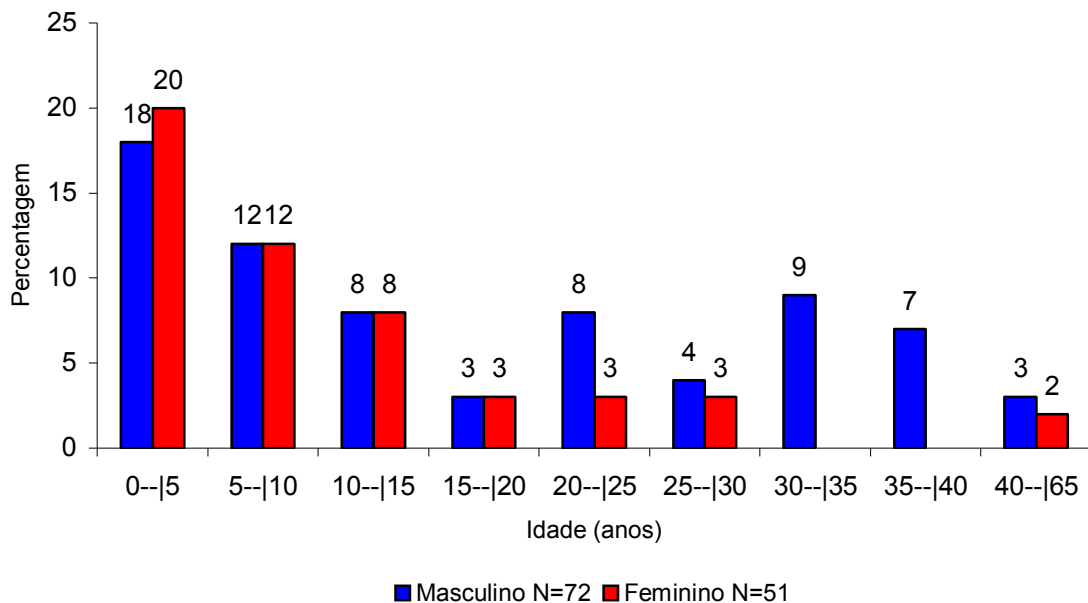
- **Comparação entre teste rápido rK39 no soro, imunofluorescência indireta e ELISA, estabelecendo como padrão-ouro a presença de amastigotas no aspirado de medula óssea, e casos controles portadores de outras doenças.**

Obtivemos um resultado isolado falso-negativo para calazar através do antígeno recombinante rK39. De 88 aspirados medular com visualização de leishmania e testados sorologicamente por ELISA, 70 foram positivos (sensibilidade de 80%). Quanto a imunofluorescência indireta para calazar realizada em 87 soros, 71 positivaram-se a partir das diluições de 1:40 (sensibilidade de 82%). Dos 115 controles não-calazar, 100% foram para TRALd-negativos e IFI-negativos (especificidade de 100% para ambos). De 50 controles não-calazar, todos foram negativos pelo ELISA em pesquisa de anticorpo anti- *Leishmania donovani* (especificidade de 100%).

- **Idade e sexo**

O Figura 6 mostra a distribuição etária dos participantes com calazar confirmado pela visualização direta de leishmania ao exame microscópico. A maior distribuição por faixa etária foi de 0 a 5 anos de idade. A média etária foi dos 14 ± 13 meses. Houve predominância nas faixas etárias compreendidas entre 0 e 10 anos de idade, totalizando 62 crianças (50,4%).

Dos 123 indivíduos, 72 (59,5%) eram do sexo masculino (relação masculino/feminino = 1,4). A proporção de indivíduos do sexo masculino adultos jovens, aumentou de maneira diretamente proporcional à idade.



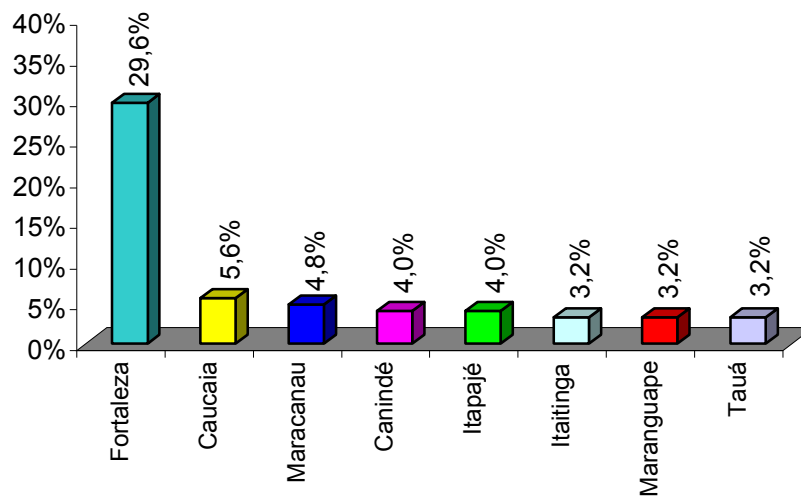
Fonte: Pesquisa do autor

Figura 2 - Distribuição por faixa etária e por sexo, de 123 pacientes com LVA confirmada no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.

▪ Local de recrutamento e procedência

Quarenta e cinco pacientes (36,6%) foram diagnosticados do Hospital Infantil Albert Sabin; 39 (31,7%) do Hospital Universitário Walter Cantídio e 39 (31,7%) do Hospital São José de Doenças Infecciosas.

Verificamos que 57 (46,4%) pacientes eram provenientes de Fortaleza e região metropolitana, enquanto 66 (53,6%) residiam no interior do Estado, evidenciando sua ampla distribuição geográfica e o crescente processo de urbanização do calazar



Fonte: Pesquisa do autor

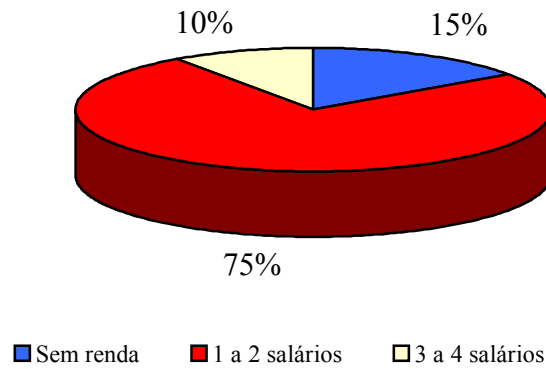
Figura 3 - Procedência de 123 pacientes com LVA, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.

Os municípios de Fortaleza e Região Metropolitana (Caucaia, Itaitinga, Maracanaú e Maranguape) perfazem um total de 46,3% dos sujeitos estudados, enquanto que os demais municípios do interior do estado do Ceará somam 53,7%.

▪ Aspectos sócioeconômicos e tipo de moradia

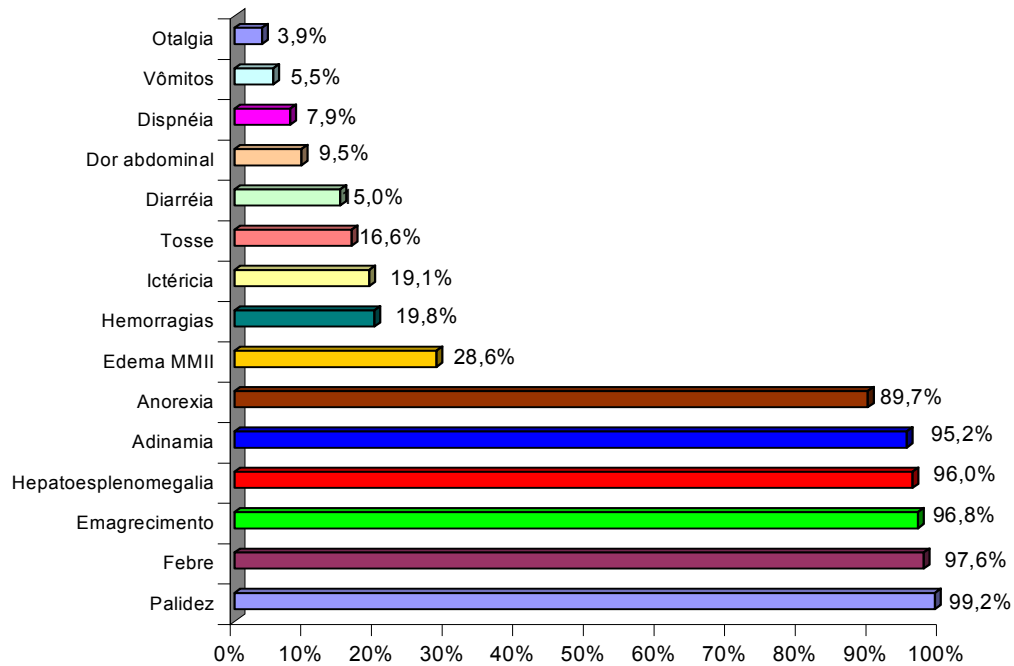
De 123 (100%) famílias dos pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial confirmados, 93 (75%) tiveram renda entre 1 a 2 salários mínimos, 12 (10%) entre 3 a 4 salários e 18 (15%) sem renda familiar.

Com relação à moradia, 35 (28,4%) moravam em casa de taipa e 88 (71,6%) em casa de alvenaria. O fator moradia mesmo em condições hidro-sanitárias satisfatórias não impede que as pessoas sejam infectadas por *Leishmania chagasi*, quando procedentes de zona endêmica e micro áreas de risco.



Fonte: Pesquisa do autor

Figura 4 - Distribuição quanto à renda familiar de 123 famílias com casos de LVA no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.

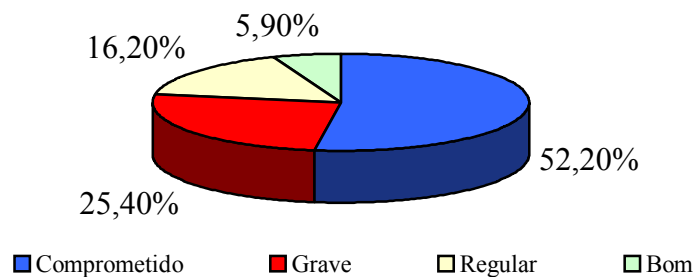


Fonte: Pesquisa do autor

Figura 5 - Distribuição dos 123 pacientes quanto aos sintomas apresentados, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.

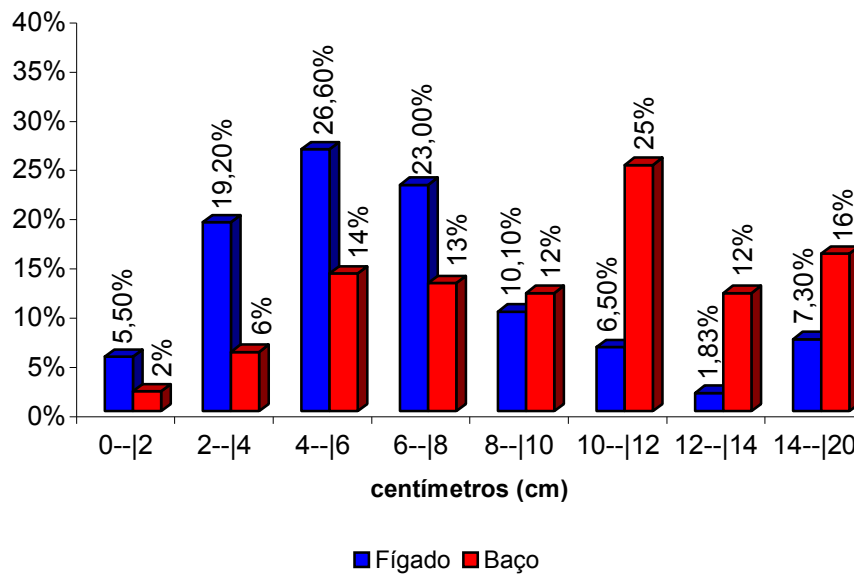
▪ Aspectos Clínicos

Na curva térmica a média de temperatura encontrada foi de 38,3°C mostrando-se pouco elevada e de longa duração presente em 97,6% da nossa casuística. Na avaliação do exame físico e estado geral do paciente os critérios de gravidade é observador dependente, de acordo com a experiência individualizada do examinador. Consideramos como critério de gravidade e risco eminente de morte, aqueles indivíduos com anasarca, hemorragia, icterícia e síndrome de resposta inflamatória sistêmica, que totalizou 25,4% dos pacientes. A maioria (52,2%) deles apresentavam-se debilitados, com picos febris diariamente, volumosa visceromegalia, fácies de sofrimento, adinâmicos, anoréxicos, com estado geral comprometido. Estado geral regular foi verificado em 16,2% da amostra estudada, caracterizando-se por manter-se ativos, cooperativos, sem infecções associadas. 5,9% apresentavam um estado geral, deambulando e aceitando dieta por via oral.



Fonte: Pesquisa do autor

Figura 6 - Frequência relativa ao estado geral em 123 pacientes na admissão, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.



Fonte: Pesquisa do autor

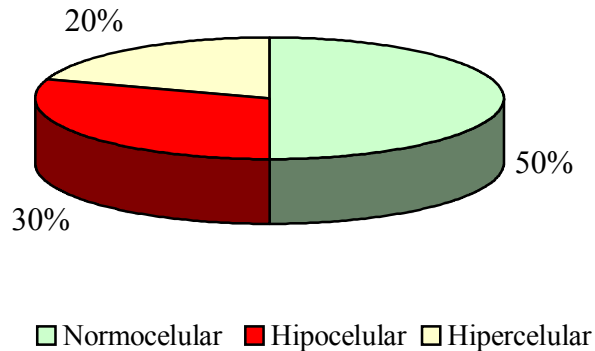
Figura 7 - Distribuição do tamanho do fígado e do baço em centímetro (cm) em 123 pacientes estudados, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.

Na admissão, 98,17% dos pacientes apresentavam, em média, o tamanho do baço com $9,2 \pm 3,9$ cm e a mediana de 10,0 cm. O tamanho mínimo palpável foi de 2 cm enquanto o tamanho máximo foi de 20 cm abaixo do rebordo costal esquerdo atingindo a fossa ilíaca esquerda ipsilateral, enquanto 1,83% apresentavam-se com baço impalpável, porém com o espaço de Traube ocupado.

Em relação ao tamanho do fígado observamos aumento simultâneo dos lobos direito e esquerdo com média encontrada de $5,9 \pm 3,7$ cm e mediana de 5,0 cm. O tamanho máximo foi de 18 cm abaixo do rebordo costal direito e houve 03 (2,75%) pacientes com fígado não palpável. Em nenhum paciente foi detectado baço e fígado impalpável simultaneamente.

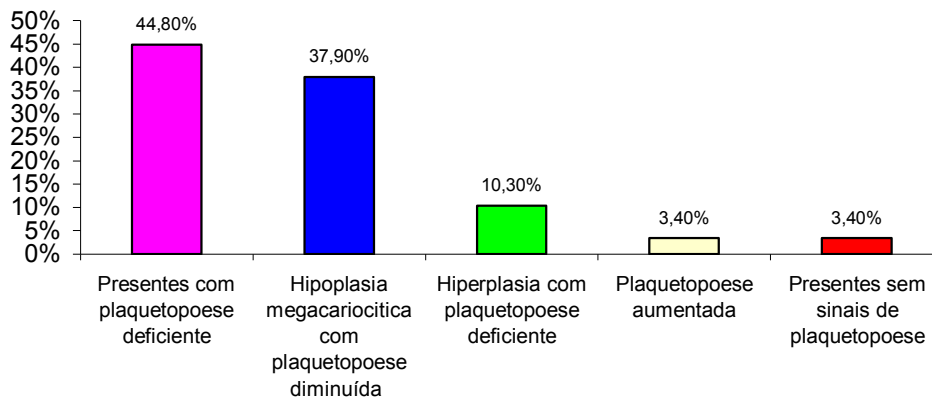
O único paciente que apresentou negatividade sorológica para o rK39 e positividade tanto para IFI (Título de 1:320) quanto ELISA, tinha 2 anos de idade, procedente de Caucaia, com 4 semanas de doença e queixas de palidez, emagrecimento, adinamia, febre, anorexia e aumento do volume abdominal. Ao exame se encontrava com estado geral comprometido, FC de 120 bpm e FR de 40 irpm. Baço palpável a 4 cm do RCE e fígado palpável à 05 cm do RCD. Exames laboratoriais: Hemácias 2,3 milhões, hematócrito 19,2%, hemoglobina de 5,6,

leucócitos de 3.270, 12% neutrófilos, linfócitos de 78% e plaquetas de 68.000; proteínas séricas totais de 7,8 (albumina de 2,6 e globulina de 5,2), TGO de 107 U/L e TGP de 60 U/L. Foi tratado com antimonial pentavalente. Fez uso de antibióticos por pneumonia e sepse e conduzido em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica.



Fonte: Pesquisa do autor

Figura 8 - Distribuição da celularidade dos mielogramas em 30 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.



Fonte: Pesquisa do autor

Figura 9 - Distribuição da plaquetopoese megacariocítica em 30 mielogramas, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.

Na celularidade de 30 mielogramas positivos para *Leishmania chagasi*, encontramos medula óssea normocelular em (50%), hipocelular em (30%) e hipercelularidade (20%). Em 26,6% houve inversão da relação entre as séries mielóide/eritróide (inferior a 3:1); linfócitos em média de $18,76 \pm 9,40\%$, sendo que a porcentagem mínima encontrada foi de 1,8% e

máxima de 33,0%, que em parâmetros de normalidade assumem níveis inferiores a 10%; plasmócitos em média $4,31 \pm 6,02\%$, sendo que a porcentagem mínima encontrada foi de 0% e máxima de 31%, e que geralmente mantêm-se abaixo de 2% em medula normoplasíada; blastos em média de $1,76 \pm 1,71\%$, sendo que a porcentagem mínima encontrada foi de 0% e máxima de 6%; em mielograma normal, na série megacariocítica os megacariócitos normalmente estão presente, normoplasíada, com plaquetopose evidente, e ausência de parasitos/células tumorais.

A celularidade da linhagem megacariocítica através de aspirado de medula óssea não é um bom padrão para avaliar as modificações existentes em seu contexto, sendo a biópsia óssea indicativa para investigar alterações morfológicas e funcionais.

• Média dos Valores hematimétricos

Encontramos alterações hematológicas compatíveis com pancitopenia, linfocitose relativa e fenômeno de rouleaux das hemáceas. No hematócrito a média encontrada foi de 21,53% para ambos os sexos, sendo que valores entre 25 e 30% são encontrados com frequência segundo dados da literatura (Quadro 1 em anexo). A média encontrada de hemoglobina foi de 7,035 g/dl e das hemácias 2,98 milhões/mm³.

• Média dos Valores Bioquímicos

No perfil eletroforético das proteínas encontramos hipoalbuminemia com média de 2,73 g/dL e hipergamaglobulinemia com média foi de 4,85 g/dL. Esta inversão foi evidenciada em 84,69% da população estudada.

As transaminases elevaram-se em torno de quatro vezes os valores da normalidade e o tempo de protrombina permaneceu abaixo de 70% (Quadro 2 em anexo). A icterícia foi observada em 19,1%.

- **Drogas Antiparasitárias Leishmanicida**

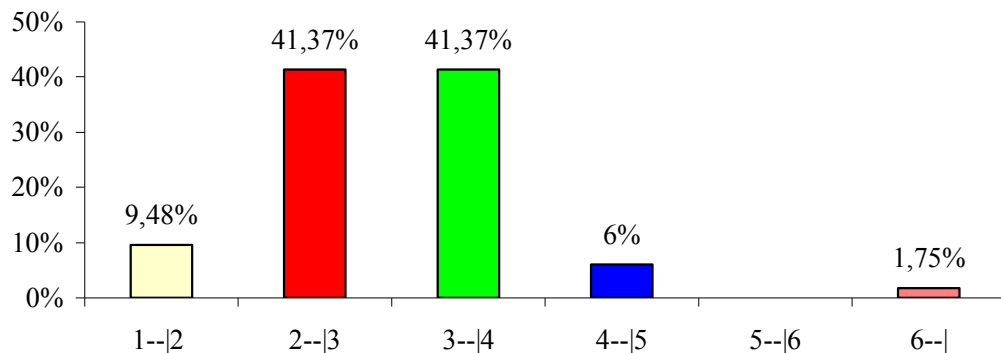
Quanto a terapêutica utilizada nos pacientes estudado para o tratamento do calazar, 121 (98,4%) pacientes fizeram uso de antimonial pentavalente endovenoso por tempo médio de $21,86 \pm 14,28$ dias e mediana de 21 dias. O tempo médio de internação foi de $23,85 \pm 13,74$ com mínimo de 5 e máximo de 115 dias.

Somente 2 (1,63%) utilizaram dispersão coloidal de anfotericina B (Amphocil) durante 10 dias, como primeira droga de escolha, por estarem fazendo parte em outro protocolo experimental. A anfotericina B foi introduzida no esquema terapêutico somente após falência secundária e/ou resistência medicamentosa da primeira opção terapêutica, tempo médio compreendido de $30,12 \pm 21,86$ e mínimo de 7 e máximo de 60 dias.

Dentre os pacientes que fizeram uso de antimonial pentavalente na dose de 20 mg/kg/dia, observamos falência terapêutica com resistência primária em 6 (5%) dos pacientes e 7 (6%) recidivaram no primeiro ano. Cardiotoxicidade foi observada em 4 pacientes através de ECG periódico caracterizado por distúrbios de repolarização com prolongamento progressivo do segmento QT na segunda semana do tratamento e destes, 1 paciente apresentou pericardite no oitavo dia de quimioterapia. Morte súbita ocorreu em um paciente que referia precordialgia durante a infusão da droga.

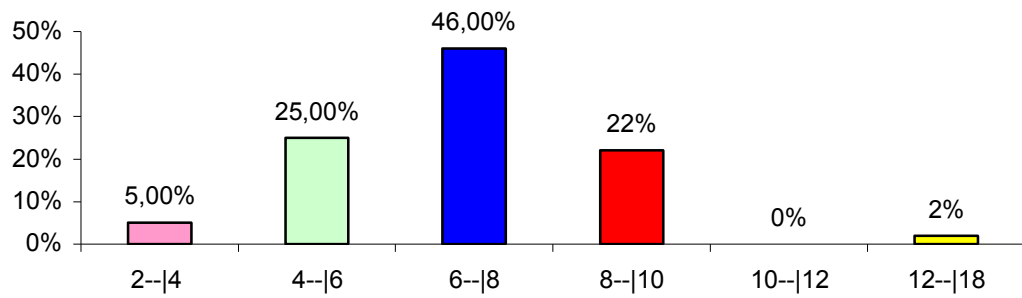
Um paciente do sexo masculino, 38 anos de idade, portador de síndrome de Wolf-Parkison-White, manifestou bradicardia sinusal no décimo dia de tratamento com antimonial pentavalente endovenoso. Foi submetido a exame ecocardiográfico que revelou dilatação moderada do ventrículo esquerdo(VE) e leve do átrio esquerdo. A função sistólica e diastólica do VE mantiveram-se preservadas. De imediato foi suspenso o antimonial pentavalente e optou-se pela pentamidina, havendo intercorrência caracterizada por tontura, poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso e hiperglicemia desencadeada por diamidina aromática compatível com cetoacidose diabética no nono dia, interrompendo-se a terapêutica. Neste ínterim fez-se uso de insulina NPH e regular subcutâneas. Dois meses após, continuou com pancitopenia e febre, e novo mielograma mostrou persistência de leishmânias viáveis. Foi prescrito anfotericina B, sendo bem tolerada e o paciente obteve melhora clínica e laboratorial.

Foi prescrito fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago na dose de 5µl/kg/dia, subcutâneo em um paciente, que evoluiu para êxito letal em 26 dias da internação. Em relação à transfusão sanguínea, 37,7% receberam concentrado de hemácias. Dois pacientes receberam albumina humana a 20%. Terapia antimicrobiana foi usada em 65 (52,8%) dos pacientes ajustada mediante resultados de hemocultura e do antibiograma, bem como do sítio infeccioso. Quando desconhecido fez-se uso de antibióticos de amplo espectro de ação dirigido para bactéria gram-negativas, *Staphylococcus aureus* e bactérias anaeróbicas. Neutropênicos febris graves (< 500 neutrófilos/µl) apresentaram alto risco de desenvolver sepse. Monoterapia com ação anti-Pseudomonas aeruginosa (cefalosporina de terceira geração, ceftazidime, carbapenem) foi administrada em 25% e associação de antibiótico beta-lactâmico mais aminoglicosídeo em 75%. A adição de vancomicina deveu-se a infecção de cateter, deterioração do quadro clínico apesar de cobertura antibiótica prévia ou quadro inicial potencialmente grave. As principais complicações infecciosas observadas foram: pneumonia 21 (33,3%); neutropenia febril grave 19 (29%); sepse 19 (29%); otite média aguda, sendo um caso colesteatomatosa 5 (7,7%) e celulite 1 (1,5%).



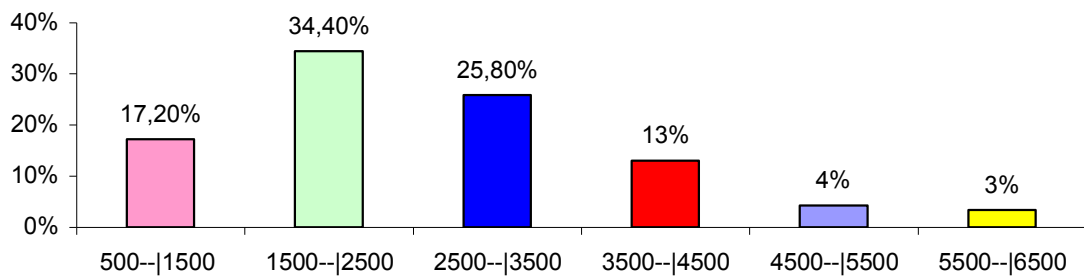
Fonte: Pesquisa do autor

Figura 9 - Distribuição do número de hemácias (em milhões/mm³) em 123 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.



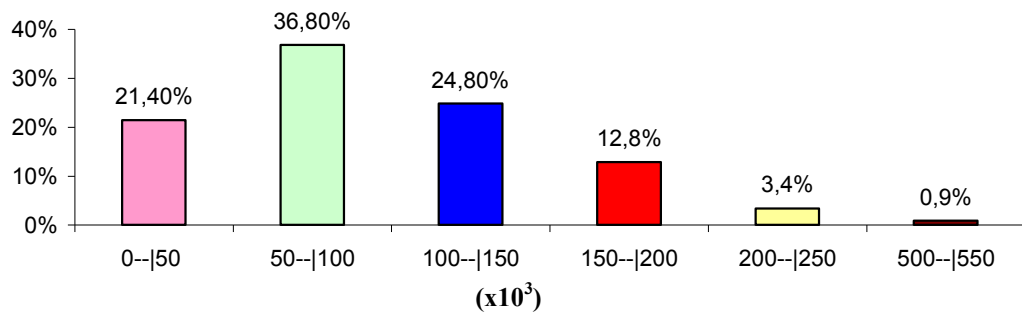
Fonte: Pesquisa do autor

Figura 10 - Distribuição da hemoglobina em g/dL em 123 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.



Fonte: Pesquisa do autor

Figura 11 - Distribuição dos valores de leucócitos em 123 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.



Fonte: Pesquisa do autor

Figura 12 - Distribuição da contagem de plaquetas em 123 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.

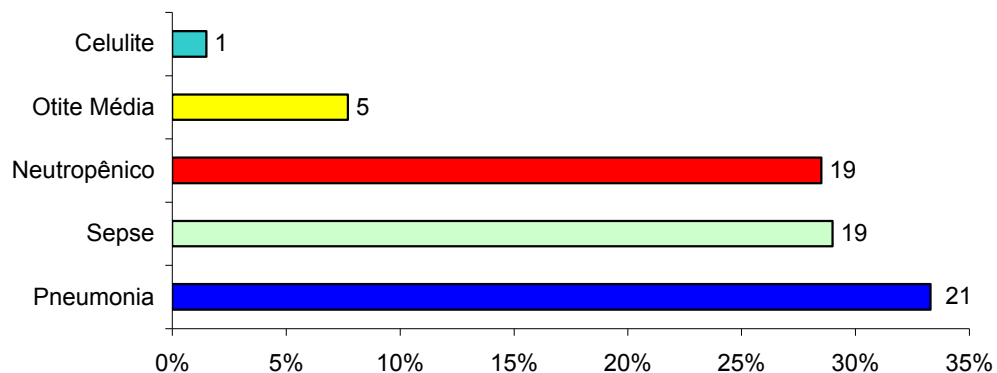
- **Calazar associado a outras doenças**

Um paciente de 33 anos de idade, masculino, acometido de doença de Hodgkin III B de mediastino tipo predominância linfocitária, diagnosticado em dezembro de 1999, foi tratado com 7 ciclos de ABVD (adriamicina, bleomicina, vincristina e dexametasona) mais radioterapia minimante, com término em outubro de 2000. Em março de 2001 foi diagnosticado calazar e tratado com antimonial pentavalente. Em março de 2002, pelos mesmos motivos foi novamente conduzido com o mesmo quimioterápico. Em junho de 2002 o aspirado de medula óssea apresentou leishmânias viáveis, sendo prescrito anfotericina B dose cumulativa de 3 g. Em dezembro de 2002, por decisão da onco-hematologia, o paciente foi esplenectomizado, para investigação de possível infiltração neoplásica do órgão. Ao exame macroscópico: baço pesando 2.190 g e medindo 26,3 x 16 x 8 cm, com aspecto pardacento, firme, irregular. Aos cortes, superfície irregular e compacta. Biópsia de fígado: Fragmento irregular, firme, pardacento, medindo 0,4 x 0,4 x 0,3 cm. Exame microscópico: Baço apresentando acentuada congestão da polpa vermelha, com indícios de colapso na trama, além de áreas de hiperplasia da polpa branca. Presença de megacariócitos além de outras células da hematopoese série eritróide e granulocítica, múltiplos acúmulos de plasmócitos e macrófagos contendo Leishmânias. Fígado com intenso parasitismo com células de Kupffer plenas de formas amastigotas, além de infiltrado portal de pequenos linfócitos sem atípicas. Conclusão: LVA.

- **Co-infecção Leishmaniose/HIV**

Encontramos 4 indivíduos com HIV/SIDA co-infectados com LVA apresentando manifestações clínicas associadas a progressão da doença representadas por pneumoci

stose, herpes simples, candidíase esofágica, tuberculose pulmonar, diarreia prolongada a mais de 1 mês e síndrome consumptiva e contagem de linfócitos TCD₄ < 400cel/mm³ sendo a contagem de TCD₄<200/mm³ definidora de AIDS.



Fonte: Pesquisa do autor

Figura 13 - Indicação de antibioticoterapia em 65 pacientes, no período de julho 2001 a julho de 2003. Fortaleza.

- **Complicações e Desfecho dos Pacientes**

Cursaram com doenças associadas 65 pacientes (53%), com os seguintes diagnósticos: pneumonia (33,3%), neutropenia febril grave (29%), sepse (29%), otite média (7,7%) sendo uma colesteatomatosa, e celulite (1,5%).

A taxa de letalidade determinada por calazar clássico grave internado em hospitais de Fortaleza foi de 9,8% que corresponde a 12 óbitos do total de 123 pacientes. Sepse, pneumonia e distúrbios hematológicos foram os determinantes principais envolvidos na morbiletalidade. Observamos que a cronicidade da doença e o retardo no diagnóstico são fatores agravantes e determinantes de reservado prognóstico dos pacientes.

Trinta e um pacientes com LVA foram escolhidos aleatoriamente e seguidos ambulatorialmente durante seis meses consecutivos, sendo pesquisados quanto aos anticorpos séricos através do dipstick com rK39. Destes, 29 (93%) persistiram positivos durante o período do estudo.

5 DISCUSSÃO

A LVA é um sério problema de saúde pública de etiologia parasitária, com elevada morbiletalidade, que compartilha manifestações clínicas comuns com outras doenças endêmicas. Como exemplo, citamos febre tifóide, malária, esquistossomose mansônica, doenças de Chagas, toxoplasmose, histoplasmose, dentre outras doenças febris agudas. Investigar sempre tuberculose, AIDS, hepatite crônica, cirrose, linfoma e leucemia.

O diagnóstico da LVA pode ser feito através de critérios clínicos, epidemiológicos (procedência, faixa etária, presença de cães doentes, conhecimento acerca do vetor), pelas provas sorológicas específicas, pelos achados sugestivos de citopenia no hemograma, eletroforese de proteínas, cultura do parasito em meios adequados ou por sua inoculação em *hamsters*. Seu diagnóstico etiológico inequívoco dá-se pelo encontro de parasitos em aspirados medulares (ósseo, hepático, esplênico e linfonodal). O parasito pode ser demonstrado em aspirado de medula óssea em mais de 70% dos pacientes (Carvalho; Prata, 1958), sendo a técnica preferida pela sua simplicidade, isenção de riscos e elevada percentagem de resultados positivos, que confirmam a hipótese diagnóstica enquanto resultados negativos não a afastam. Em aspirados com carga parasitária baixa, nem sempre é possível encontrar leishmânias. A pesquisa positiva de parasitos ocorre com frequência variável em órgãos ricos em células do SFM, onde em aspirado de medula óssea detectamos 71% de positividade para leishmânia. Para Alencar; Neves; Dietze, (1991) os seguintes parâmetros foram encontrados: baço (95 a 97%), medula óssea (90%), fígado (75%), gânglios linfáticos (64%). Leishmaniose atípica pode ser encontrada em imunossuprimido e o encontro de parasitos em pele e sangue periférico variam entre 30 e 50% respectivamente.

Em mielogramas com *leishmânia*, a negativação precoce é indicativa de resposta terapêutica específica, entretanto, durante um período de aproximadamente 1 mês ainda é possível o encontro de leishmânias remanescentes, degeneradas ou inviáveis. Os doentes deverão ser acompanhados mensalmente durante seis meses após a alta hospitalar. As recidivas geralmente ocorrem entre o 4^o e o 6^o mês após a terapêutica. A reação intradérmica a antígenos de *leishmânia* (leishmanina) positiva-se após o 1^o ano de tratamento, sendo que

após 3 anos, mais de 70% dos pacientes apresentam forte reação, indicando a completa recuperação imunológica (BADARÓ; DUARTE, 2002).

Como decorrência da diminuição da imunidade celular ocorrida durante a doença, o teste de Montenegro invariavelmente é negativo nos casos de calazar totalmente estabelecidos, sendo anergia específica revertida após a cura. A intradermoreação de Montenegro detecta resposta imune celular, composto por antígeno bruto e preservante (fenol ou mertiolate). Os principais problemas com este método seria a presença de resultado falso positivo provocado por reação alérgica ao preservante. Consiste na aplicação de 0,1 ml de um antígeno padronizado na face ventral de um dos antebraços e de fenol ou mertiolate no outro antebraço. A conversão da reação acontece tardiamente sendo a leitura realizada em 48 a 72 horas e considerado positivo quando o indurado é superior a 5 mm. É invariavelmente negativo na doença plenamente manifesta em decorrência da diminuição da imunidade celular, sendo a anergia revertida após a cura, não tendo valor como método diagnóstico. É um indicador de exposição prévia a leishmânia (MATTOS, 1998; BRASIL, 1994).

Para Bern et al., (2000), a sensibilidade do aspirado linfonodal é de 50% no Sudão; já para o aspirado medular, é de 70% ou menos, enquanto que os aspirados esplênicos podem atingir valores de 90% ou mais, embora este procedimento carregue um risco potencial de hemorragias fatais.

As técnicas usadas para a imunodiagnose da leishmaniose podem ser agrupadas em três categorias: 1) detecção de anticorpo; 2) detecção de antígenos no complexos imunes circulantes e 3) detecção de reações imunes celulares. Vários antígenos da superfície do parasito como a Gp63, LPG e “Heat Shock Protein” de peso molecular de 70.72 kDa, dentre outras proteínas com alta densidade de epitopos já foram clonadas e utilizadas na detecção de anticorpos anti-leishmania donovani.. Porém reações cruzadas ocorreram com várias espécies de tripanossomatídeos ou que possuem antígenos de grupos filogeneticamente idênticos como micobactérias.

O dipstick rK39 utilizando antígeno recombinante de uma seqüência de 298 aminoácidos, sendo 39 repetitivos conjugado a uma proteína A/sais de ouro coloidal. É um teste rápido, qualitativo, imunocromatográfico, com um epítipo clonado repetitivo conservado entre *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* que é parte de uma grande proteína relacionada à cinesina expressa predominantemente por

amastigotas, tornando as reações cruzadas improváveis (Reed, 1990, Burns et al, 1993, Zijlstra, 2001), utilizado na pesquisa de anticorpos IgG circulantes anti-*Leishmania chagasi*. Segundo Badaró; Duarte (2002), os resultados da reação acontecem imediatamente em menos de 3 minutos, sendo a interpretação do resultado sob visualização direta, positivo ou negativo, de fácil aplicação e praticidade. Pode ser realizado por qualquer profissional técnico de laboratório, haja vista dispensar de incubação e lavagem de soros reagentes, bem como não há necessidade de fonte de energia elétrica, água corrente, equipamento ou material acessório, podendo tornar-se um método útil para realização de inquérito soroepidemiológico em campo. Os espécimes sorológicos podem ser conservados à temperatura ambiente com baixa umidade ou em refrigeração entre 4 - 8°C, realizando-se, em seguida, o experimento, ou estocado a uma temperatura entre 2 a 8°C durante 3 dias. Para conservar o material por período prolongado, deve-se estoca-lo a -20°C ou a -70°C. Exposição sorológica à temperaturas superiores a 30°C pode causar impacto na performance dos resultados devido alteração protéica (BERMAN, 1992).

Detectamos por este método imunoenzimático anticorpo sérico positivo em 122 pacientes sendo a sensibilidade de 99,2%. A confiabilidade no teste sorodiagnóstico em questão nos permite precocidade em esclarecer a doença de base, igualmente ao trabalho realizado em Apulia, sul da Itália. Resultados semelhantes foram encontrados no Nepal, em 14 pacientes com diagnóstico parasitológico confirmado e 113 controles sadios (BERN et al., 2000). Na Índia, o teste realizado em 127 pacientes e 119 controles, a sensibilidade foi de 100% e a especificidade de 98% (SUNDAR et al., 1998). Na Alemanha, em estudo realizado com 14 pacientes que adquiriram a doença em países asiáticos ou no Mediterrâneo e 82 controles, a sensibilidade do rK39 foi de 71,4% e especificidade de 100% (JELINEK; EICHENLAUB; LÖSCHER, 1999).

Segundo trabalho de Delgado et al. (2001), na Venezuela, o dipstick com rK39 apresentou especificidade de 100% para o todo o complexo *Leishmania donovani* (*L. chagasi*, *L. donovani*, *L. infantum*), corroborando os dados de outros países e no Brasil por Badaró et al (1996), utilizando soros de indivíduos saudáveis e pacientes portadores de outras doenças tropicais que não a LVA. O teste apresenta grande utilidade no meio rural, no âmbito da atenção primária de saúde, onde os profissionais de saúde necessitam dispor de testes mais simples, rápidos e confiáveis para o diagnóstico precoce dos pacientes suspeitos de LVA. Seu resultado positivo orienta o profissional para o início imediato do tratamento farmacológico

específico enquanto que os resultados negativos devem ser confirmados em hospitais de referência através de outras técnicas sorológicas e parasitológicas.

Segundo Delgado et al (2001), a sensibilidade do dipstick de rK39 é de 87,8%, tendo diagnosticado positivamente 36 dos 41 pacientes infectados com LVA. Este encontrou achados discordantes ao usar o teste de imunofluorescência na pesquisa de anticorpos, que foi positivo em um paciente com mononucleose e outro com pneumonia bacteriana, sendo o rK39 negativo. No Brasil, resultados positivos relacionados com doença visceral ativa e resultados negativos foram encontrados em infecções recentes ou casos com cura espontânea (Badaró; Duarte, 2002). Badaró et al (1996) refere sensibilidade de 99% para o teste com dipstick rK39. Sundar et al (1998) refere que o teste possui 100% de sensibilidade em pacientes que apresentam aspirado esplênico positivo, embora tenha achado quatro resultados positivos em pacientes com aspirado esplênico negativo (considerados como pacientes subclínicos que não evoluíram para a cura espontânea). A especificidade demonstrada em seu trabalho foi de 98%. Este mesmo autor, em novo trabalho publicado em 2002, detectou especificidade de 93% e sensibilidade de 100%, examinando tanto espécimes de sangue total e sorológico de pacientes com doença em atividade. O autor enfatiza que o teste com rK39 não deve ser aplicado em pacientes saudáveis e assintomáticos e, mesmo com resultado positivo, não devem ser considerados para o tratamento. Nestes, como há a possibilidade de reação cruzada com malária, febre tifóide e tuberculose, há recomendações de realização, em conjunto com o teste do dipstick rK39, testes sorológicos para estas doenças e raios-X simples do tórax para afastar tuberculose pulmonar. Para Zijlstra et al (2001), em estudo realizado no Sudão, a sensibilidade do teste foi de 67% (37 dos 55 pacientes com diagnóstico parasitológico confirmado). Por outro lado, resultados falso-negativos (28,6%) foram detectados entre 14 amostras por Jelinek; Eichenlaub; Löscher (1999). Estes autores afirmam que a razão para os resultados falso-negativos permanece desconhecida, de modo que eles não consideram o dipstick de rK39 como um teste conclusivo e confiável para o diagnóstico de LVA. Verificou-se perda de reatividade nos soros armazenados por mais de nove anos a -70°C , o que pode dever-se à degradação protéica decorrente dos longos períodos de estocagem das amostras.

Enquanto os testes sorológicos tradicionais não diferenciam adequadamente a LVA aguda das formas crônicas, o teste com antígeno rK39 é bastante sensível e específico para as formas agudas da doença. Além disso, os pacientes com a doença que são devidamente tratados e curados, apresentarão teste positivo para o antígeno rK39, pois as IgG contra estes

antígenos persistem por muito tempo após a cura, embora isso precise de confirmação. Segundo Zijlstra (2001) em pacientes sudaneses o teste manteve-se positivo por 24 meses. O tratamento de pacientes com dipstick rK39 positivo somente deverá ser iniciado com a confirmação diagnóstica por outros métodos e ou após ostensiva investigação para excluir outras condições clínicas, e os pacientes com resultados negativos por si só não devem deter o médico da tentativa de diagnosticar Leishmaniose visceral. A confirmação do teste através de pesquisa parasitária é recomendável bem como realização de testes sorológicos quantitativos, que permitem que anticorpos sejam monitorados durante a infecção.

Tabela 2: Comparação do resultado do dipstick rK39 e o teste de aglutinação direta (TAD) (cut-off \geq 1:1600) em pacientes sudaneses curados de LVA em vários períodos após o tratamento.

MESES	TAD \geq 1:1600	DIPSTICK rK39 +
3 meses	19/23 (83%)	10/37 (27%)
6 meses	16/20 (80%)	19/44 (43%)
9 meses	13/19 (68%)	6/24 (25%)
12 meses	4/6 (67%)	3/10 (30%)

Mudança dos resultados dos TAD ao longo do tempo: $p=0,17$;

Mudança dos resultados positivos do dipstick rK39 ao longo do tempo: $p=0,37$.

Fonte: Zijlstra et al., 2001

Diante da suspeita clínica, laboratorial e epidemiológica bem fundamentadas, resultados de testes rK39 positivos, mesmo diante de pesquisa parasitológica negativa assegura a introdução de prova terapêutica para calazar.

Para Viana (1999), no seguimento de 181 pacientes no período de 4 anos, 20,4% permaneceram com a sorologia positiva com ELISA por rK39. Em 2002, Sundar et al., afirmam que os níveis de IgG anti-K39 podem permanecer elevados por longos períodos. Assim, pacientes com história de infecção visceral prévia com suspeita clínica de recidiva, não devem receber diagnóstico exclusivo pelo dipstick rK39, necessitando confirmação pelo aspirado medular antes de reiniciar o tratamento. Segundo Badaró et al (1996), a reatividade

do teste com antígeno rK39 acompanha a doença aguda e também existe nos casos subclínicos que evoluem para LVA, precedendo inclusive os sinais e sintomas da doença.

Atualmente não se sabe se a especificidade e a sensibilidade do dipstick rK39 podem ser aplicáveis em pacientes soropositivos para o HIV. Isto é uma questão importante, uma vez que é cada vez maior o número de pacientes co-infectados. Estudos preliminares com o teste para anti-rK39 por ELISA demonstram sensibilidade de 85% nestes pacientes, sugerindo que a detecção pelo dipstick possa vir a ser mais eficaz (Sundar et al., 1998). Segundo Houghton et al (1998), os testes invasivos nos co-infectados HIV/LVA são superiores aos testes sorológicos incluindo ELISA rK39, devido aos baixos títulos de anticorpos nestes indivíduos. Em seu estudo, de 56 pacientes HIV-positivos (alguns dos quais com progressão para AIDS), com diagnóstico de LVA confirmado pela microscopia e cultura de aspirado medular, 46 (82%) foram positivos para LVA pelo ELISA rK39, enquanto que 30 (53,1%) foram positivos pela imunofluorescência.

O teste do dipstick com rK39 pode ser influenciado pela temperatura ambiente e umidade relativa do ar. Isto é particularmente importante em condições de campo: no Sudão as temperaturas ultrapassam 40°C e a umidade é inferior a 30%. Os testes estão adaptados em formato ideal para uso em inquérito soropidemiológico pela rapidez e praticidade, pois não requerem equipamentos especializados e podem ser feitos por técnicos com prática em laboratório e o tempo necessário para a interpretação dos resultados varia entre 30 segundos (Badaró et al., 1994) a 5 minutos. Segundo Zijlstra (2001), a interpretação após 5 a 10 minutos evita resultados falso positivos causados por reações inespecíficas. Entretanto, este autor avaliou os resultados com 30 minutos e 24 horas e observou elevação da sensibilidade de 67% (com leitura entre 5 e 10 minutos) para 72% e 78%, respectivamente. Em pacientes de áreas endêmicas, o dipstick rK39 é menos sensível que o teste de aglutinação direta (DAT). Quanto maior os títulos de IgG no soro do paciente maior a probabilidade de teste positivo (Zijlstra et al., 2001; Delgado et al., 2001). Além disso, Bern et al (2000) afirma que a especificidade do dipstick rK39 supera o DAT no diagnóstico de calazar agudo em regiões endêmicas. O custo de um dipstick é de US\$ 1,20, bastante inferior aos US\$ 8,00 gastos para cada DAT.

Para Sundar et al., (2002), em estudo com 143 pacientes de área endêmica na Índia, 120 pacientes tiveram resultados positivos para o dipstick rK39. Destes, 119 eram, de fato,

portadores de LVA (sensibilidade de 99,16%). O único resultado falso-positivo decorreu de um paciente infectado com malária. Dos 23 que tiveram resultado negativo, 21 eram realmente não portadores de LVA (especificidade de 91,3%). Os resultados sugerem que o teste substitui com segurança as técnicas invasivas e que outras doenças que mimetizem o calazar raramente terão resultado do teste positivo. Nos casos de pacientes sintomáticos mas com resultado negativo para o dipstick, sucessivos testes são valorosos se os sintomas persistirem e nenhum outro diagnóstico for alcançado; todos os esforços devem culminar para um desfecho diagnóstico definitivo. Afirma ainda que o teste pode ser positivo em indivíduos saudáveis procedentes de áreas endêmicas, bem como os que já tiveram leishmaniose visceral anteriormente, não sendo preconizado tratamento anti-leishmânia nestes indivíduos.

Segundo Reithinger et al., (2002), os programas atuais de controle da leishmaniose visceral no Brasil falharam em conter o aumento do número de casos humanos bem como de reservatórios caninos. Isso se deveu, em grande parte, à grande demora existente entre a coleta de amostras caninas, sua análise e a implementação das medidas de controle. Para o autor, devem ser feitos esforços no sentido de desenvolver testes de dipstick mais específicos para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina, de modo que eles possam vir a ter uma melhor relação custo-eficácia que os métodos diagnósticos atualmente usados para guiar as medidas de controle. Em estudo de campo, o dipstick foi positivo em 92 de 175 amostras (53% de sensibilidade), enquanto que o ELISA alcançou sensibilidade de 37% (65 de 175) e o PCR 27% (47 de 175). Os valores preditivos positivo e negativo para o teste de dipstick foram, respectivamente, de 58 a 77% e 75%. Em termos de especificidade, o teste não é muito eficaz para o diagnóstico canino, diferentemente do que ocorre em humanos. Uma possível explicação para isso seria a existência de reações cruzadas entre o dipstick e algum fator existente no sangue do cão. A título de comparação, a sensibilidade e a especificidade do ELISA de rK39 mostraram-se elevadas em vários estudos. A sensibilidade foi de 100% nos trabalhos de Badaró et al., (1996), em 90 cães e de Zerpa et al., (2000), na Venezuela, em 37 cães, confirmados parasitologicamente. Em estudo na Turquia, Ozensoy et al., (1998) a sensibilidade foi de 93% e a especificidade de 100%. Na Itália, Scalone et al., (2002) demonstrou sensibilidade de 97% e especificidade de 99%. No Marrocos, o ELISA foi 100% sensível, segundo RHALEM et al., (1999).

Reações cruzadas de RIFI ocorrem com leishmaniose cutâneo-mucosa, malária, esquistossomose, hanseníase, Doença de Chagas e ainda, em trabalhos realizados por Souza et

al., (1998), as RIFI-IgM no soro humano podem ser falsamente negativas na presença de elevados títulos de IgG que provavelmente competem com a IgM pelos mesmos determinantes antigênicos do parasito, ou podem ser falsamente positivas na presença de auto-anticorpos IgM anti IgG (fator reumatóide) produzidos por células B (CD_5^+) em indivíduos até mesmo considerados como normais, SOUZA et al. (1998).

Em nossa casuística, a faixa etária pediátrica de menores de 10 anos de idade foi a mais prevalente, sendo que até os 20 anos não houve diferença significativa entre os sexos. Entre a população adulta houve maior distribuição de casos entre o sexo masculino.

O grande número de pacientes provenientes da capital pode ser devido ao processo migratório da população da zona rural para a periferia dos grandes centros urbanos, em crescente processo de favelização, favorecendo a urbanização desta antropozoonose, com ciclos epidêmicos freqüentes, onde inúmeras condições sócio-econômicas competem para o alastramento desta endemia. Não observamos casos autóctones em bairros de classe sócio-econômica média e alta, em nossa amostra estudada, corroborando com a visão holística de Alencar (1961) que o calazar é sócio do pauperismo e das desigualdades sociais, culminando com desnutrição energética protéica e conseqüentemente deficiência imunológica propiciadora de infecção.

Foram sugestivos casos de calazar canino pelos participantes ou responsáveis das crianças da amostra estudada, como emagrecimento, unhas crescidas, queda de pelos, apatia, ulcerações, descamação da pele, fezes sanguinolentas e conjuntivite, corroborando a clínica do calazar canino como descrito por Alencar (1959). Pode-se suspeitar que, quanto mais reservatórios afetados no domicílio e peridomicílio, maior a população de flebotomíneos infectados na área, e maior a possibilidade de infecção da população.

O tempo decorrido entre o surgimento dos primeiros sintomas até o momento da internação hospitalar, variou de 10 a 120 dias caracterizando que o calazar é uma moléstia com início insidioso podendo manifestar-se abruptamente. A infecção pode ser assintomática ou oligossintomática em 80 a 90% dos casos, reservando-se o restante para a forma clássica, caracterizada por hepatoesplenomegalia e febre irregular de longa duração, epistaxe, palidez, emagrecimento, taquicardia, tosse, diarreia e raramente síndrome icterica expressiva de prognóstico sombrio. Ainda, na fase tardia, a presença de gengivorragia, equimose e ascite

compõem o quadro clínico. As complicações são as infecções bacterianas secundárias, principalmente pleuropulmonares e seps, associadas a distúrbios hematológicos.

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil 1996), a febre modifica-se precocemente, desde o início do tratamento e desaparece por volta do 5º dia da medicação. O número de dias varia em função de diversos fatores como tempo de doença, intensidade da infecção, existência de complicações ou doenças intercorrentes e dose empregada de antimonial. Quando ocorrem elevações térmicas após remissões de alguns dias, levar em conta a persistência do parasitismo, infecções concomitantes ou por ação do próprio quimioterápico. Febre prolongada após o tratamento é suspeita de falha terapêutica, salvo se outra condição clínica explicá-la.

Ao exame físico o estado geral apresentou-se em vários estágios de evolução dependente de múltiplos fatores, como tempo de evolução da doença, estado nutricional, infecções associadas, alterações hematológicas e resposta imune do hospedeiro. Palidez cutâneo-mucosa foi verificada em 99,2% dos pacientes, adquirindo uma coloração pardacenta ou de “cera velha”, cabelos quebradiços com o clássico sinal da bandeira e os cílios alongados (sinal de Pitalluga), micropoliadenopatia não é muito freqüente em nossa região podendo estar presente em imunocomprometidos. O abdome volumoso às custas da exuberante hepatoesplenomegalia compreendeu 96% dos casos, conferindo o aspecto de útero gravídico nas mulheres e de cirróticos nos pacientes masculinos.

O baço tem consistência fibroelástica e o crescimento ocorre no sentido da cicatriz umbilical, podendo atingir a sínfise púbica ou a crista ilíaca do lado oposto. É proporcionalmente mais aumentado que o fígado, indolor à palpação e presente em praticamente 100% dos casos. Baço duro pode ser devido à concomitância de malária ou esquistossomose. O relato de dor traduz existência de perisplenite ou infarto esplênico (ALENCAR; NEVES; DIETZE, 1991).

A redução da esplenomegalia na leishmaniose faz-se rapidamente em se tratando de baços pequenos e moles. Entretanto, nos doentes portadores de baços grandes e fibróticos, regredem mais vagarosamente, podendo persistir palpáveis por muitos meses após o tratamento (NEVES, 1983). Ao final do tratamento o baço geralmente apresenta redução de 50% ou mais em relação à medida inicial (BRASIL, 1996). Padrão semelhante foi encontrado neste trabalho.

A punção esplênica é sensível em mais de 95% dos casos, sendo limitada sua indicação, haja vista o risco de hemorragias e rupturas esplênicas fatais. Os requisitos para este procedimento compreendem a presença de esplenomegalia $\geq 3\text{cm}$ do RCE, tempo de protrombina ≤ 5 segundos, atividade de protrombina $\geq 60\%$, contagem de plaquetas $\geq 40.000/\text{mm}^3$ (Badaró, 2002), aliada a experiência técnica.

Segundo Alencar (1959), geralmente a regressão do fígado faz-se paralelamente à do baço; o fígado, entretanto, regride mais lentamente, não sendo infreqüente o encontro de hepatomegalia após o quarto mês de tratamento, particularmente (Neves, 1983) em casos de associação com a esquistossomose. Em um estudo realizado por Prata (1957), após o tratamento com antimonial, as leishmânias escasseiam, mas não desaparecem totalmente do fígado. Em 11 de 13 casos estes flagelados foram encontrados, num período variável entre 1½ a 11 meses após a terapêutica antimonial. As transaminases encontram-se normais ou levemente aumentadas. O aumento de 10 vezes ou mais acima de seus valores normais fala contra o calazar, pois reflete necrose hepática, incomum da doença (MATTOS, 1998).

A punção hepática oferece resultados questionáveis, em virtude da menor expressão do parasitismo no fígado. A adenomegalia na LVA é discreta e raramente utiliza-se a aspiração ganglionar para fins diagnósticos. As formas amastigotas podem ser isoladas em sangue periférico dentro de leucócitos em até 30% dos casos (Neves, 1983; Genaro et al., 2000; Badaró; Duarte, 2002), utilizando-se a coloração básica de Romanowsky (Giemsa, Wright, Leishman ou Diff Quick).

A pancitopenia é uma característica marcante nos indivíduos com calazar e sinais de gravidades como epistaxe, gengivorragia, petéquias, equimoses e hemopneumotórax, em geral acometem os pacientes na fase tardia da doença e significam sinais de gravidade. No hemograma encontramos presença de anemia normocrômica normocítica intensa, em torno de 3 milhões de hemácias/ mm^3 .

A leucopenia é sempre significativa, com média encontrada de $2668/\text{mm}^3$ havendo oscilações entre 2000 a 4000 leucócitos/ mm^3 . Na plaquetopenia a média encontrada permaneceu abaixo de 100000 plaquetas/ mm^3 . Linfocitose relativa média de 52,37% e fenômeno de Rouleaux das hemácias de 21% corroborando com Matos, 1998. Não houve diferença significativa entre os valores distribuídos para o sexo masculino e feminino (Quadro 1 em anexo).

A recuperação das alterações hematológicas com tratamento antiparasitário leishmanicida é nítida e a melhora dos parâmetros geralmente surgem a partir da segunda semana, havendo elevação da série vermelha e recuperação da série branca que ascendem sensivelmente, desaparecendo a leucopenia, característica marcante da doença. A plaquetopenia, se presente, desaparece mais precocemente, contribuindo para a recuperação dos fenômenos hemorrágicos. Segundo Alencar (1983), o reaparecimento dos eosinófilos indicam um bom sinal prognóstico. O estado geral melhora sensivelmente e a disposição, apetite, força muscular e peso corporal aumentam nitidamente. Observa-se, ainda, desaparecimento da palidez, do edema, das alterações tegumentares (NEVES, 1983).

Dentre as alterações protéicas, há elevação da albumina e queda das globulinas, evidenciáveis pelos perfis eletroforéticos. No entanto, durante vários meses, a taxa de globulinas permanece acima do nível normal.

Sendo esta inversão um achado muito característico, que associado à anemia e leucopenia, fortalecem a hipótese diagnóstica. Disproteinemia e depósito de complexos imunes circulantes provocam alterações glomerulares que se refletem por proteinúria, hematúria, piúria e cilindrúria, que podem estar ausentes. Há aumento de CH_{50} e C_3 .

O perfil eletroforético de proteínas segundo Benhamou *apud* Pessoa (1982), fornece indicações mais precisas que os esfregaços medulares, esplênicos ou hepáticos, que às vezes mostram-se negativos após uma série de antimonial. Entretanto, a eletroforese pode indicar persistência do parasitismo, sendo uma prova mais sensível para revelar a cura ou progressão do calazar e, se persistir a febre apesar da curva eletroforética ter-se normalizado, outra causa deverá ser pesquisada. Sempre que encontraram parasitismo em seus casos, havia alterações concomitantes do perfil eletroforético.

Segundo estimativa da OMS, até o final de 1999, mais de 35 milhões de pessoas infectaram-se pelo HIV em todo o mundo, sendo que mais de 95% de todas as pessoas infectadas vivem em países em desenvolvimento, sendo crescente esta co-morbidade principalmente em estágio clínico avançado da doença. Em geral coexistem com outras entidades definidoras de AIDS.

Não há critério infalível de cura, seja de ordem clínica, parasitológica ou sorológica no calazar (NEVES, 1983). Os pacientes submetidos ao tratamento com antimonial

pentavalente apresentam evidência de resposta terapêutica logo na primeira semana, como descrito por outro autor (NEVES, 1963).

Dentre os pacientes 12 (9,8%) evoluíram para êxito letal mostrando que no calazar grave em torno de 7 a 10% apresentam prognóstico reservado, mesmo em uso de tratamento específico. Isto se deve a cronicidade da doença e retardo no diagnóstico.

A letalidade menor de 10% de nossa casuística é semelhante àquela relatada na literatura, particularmente no estado do Rio Grande do Norte e no Distrito Federal, com variações entre 7 e 10% (MATTOS, 1998; JERÔNIMO et al, 1994). Estudo em hospital pediátrico de Fortaleza (Hospital Infantil Albert Sabin) mostrou letalidade de 9% (39/444 pacientes) (REY, 2002). Este mesmo autor em estudo observacional não comparativo tipo série de casos identificou letalidade de 22% (10/52) dos pacientes menores de 1 ano de idade, no período de 1995 – 2002, e os fatores de risco para óbito observados durante a permanência hospitalar foram distúrbios hematológicos, e anasarca. As complicações infecciosas que contribuíram para o desfecho letal foram pneumonia, infecção cutânea, otite média, diarreia e síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Segundo diversos autores a letalidade está associada com a menor idade do paciente (especialmente menores de um ano de idade) e o tempo de duração da doença (demora na procura por atenção, barreiras de acesso aos serviços, atraso no diagnóstico, tratamento de complicações associadas como pneumonia sem terapêutica anti-leishmânia específica etc). A presença de sinais de calazar em fase avançada na admissão hospitalar aumenta o prognóstico letal (edema, icterícia, sangramento, neutropenia severa, infecção severa) (REY, 2002; CAMPOS JR., 1995).

6 CONCLUSÕES

- O teste rápido imunocromatográfico rK39 utilizado na pesquisa de anticorpos IgG circulantes anti-*leishmânia* visceral apresentou sensibilidade de 99,2%. Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% para todos os testes empregados, considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Isto sugere que o método empregado substitui seguramente as técnicas diagnósticas invasivas e quantitativas frequentemente utilizadas em nossa região. Reação imunoenzimática em fita contendo antígeno rK39 além de elevada sensibilidade e especificidade, permite diagnóstico imediato e início precoce do tratamento;
- No experimento estudado não houve reações cruzadas através do teste rápido anti-*Leishmania donovani chagasi* (TRALd) com outras doenças causadas por tripanossomatídeos, dengue, salmonelose, doença de Wilson, paracoccidiodomicose, tuberculose pulmonar, lupus eritematoso sistêmico e doença linfoproliferativa, demonstrando alta densidade de epítotos exclusivamente para o gênero *Leishmania*;
- Detectamos persistência de anticorpos IgG anti-rK39 em 29 (93,5%) dos 31 pacientes (escolhidos aleatoriamente) pós-tratamento leishmanicida do primeiro até o sexto mês de seguimento ambulatorial, tendo sido considerado o gold-standard a presença de *leishmania* no esfregaço de medula óssea. O rK39 por não ser marcador sorológico de doença em atividade, não parece ser um exame confiável como critério de cura. História de infecção prévia por *Leishmania chagasi* em indivíduos submetidos a terapêutica antiparasitária, ainda que procedente de região endêmica, todos os esforços devem culminar para um desfecho de diagnóstico definitivo em futuras internações;
- O teste de detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* através do rK39 quando analisado isoladamente, mostrou-se significativamente mais sensível do que os

testes de imunofluorescência indireta, ELISA e pesquisa direta de parasitos em aspirado de medula óssea ($p < 0,001$);

- Existe forte possibilidade de leishmaniose visceral americana em atividade, quando o rK39 for positivo em pacientes com manifestações clínica, laboratorial e epidemiológica sugestivas para esta doença.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 3, p. 175-186, 1961.
- _____. Expansão do calazar no Brasil. **Ceará Med.**, v. 5, n. 1-2, p. 86-102, 1983.
- _____. Leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, v. 17-18, p. 129-148, 1978.
- _____. **Calazar canino**: contribuição para o estudo epidemiológico do calazar no Brasil. 1959. Tese (Livre-Docência)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1959.
- ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 86, p. 706-717.
- ALVAR, J. Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. **Parasitol. Today**, v. 10, p. 160-163, 1994
- ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, R. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 1354-1359, 1990.
- ANDRADE, Z. A.; YAIBUKI, K. A nefropatia do calazar. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 14, p. 51, 1972.
- ANTHONY, R. L.; CHRISTENSEN, H. A.; JOHNSON, C. M. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, n. 2, p. 190-194, 1980.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D; MADUREIRA, C.; BURNS, M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. *rK39*: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.
- BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M., ORGE, M. G. O.; TEIXEIRA, R. S.; ROCHA, H. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop. São Paulo**, v. 18, p. 72-83, 1985.
- BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; QUEIROZ, A. C.; JONES, T. C. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. **Lancet**, v. 1, n. 8482, p. 647-649, 1986.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCCACIA, R. (Eds.). **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 1254-1279.

BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; ORGE, M. G.; TEIXEIRA, R. S.; ROCHA, H. Artigos imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 8, n. 2, p. 77-83, 1985.

BADARÓ, R.; JOHNSON Jr, W. D. The role of interferon in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 167, suppl. 1, p. S13-S17, 1993.

BADARÓ, R.; NAKATANI, M.; CHUN, P.; REED, S. Novo teste rápido (30'') para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, supl. 1, p. 248, 1994.

BERMAN, J. D.; HANSON, W. L.; CHARPMAN, W. K.; ALVING, C. R.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 30, p. 847-851, 1986.

BERMAN, J. D.; KSIONSKI, G.; CHAPMAN, W. L.; WAITS, V. B.; HANSON, W. L. Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p. 1978-1980, 1992.

BOGLIOLO, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência à fibrose hepática. **Hospital**, v. 1, p. 393-440, 1956.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento da Leishmaniose visceral (calazar). Normas técnicas.** Brasília, 1994. p. 103.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento da Leishmaniose visceral (calazar). Normas técnicas.** Brasília, 1996.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Guia de vigilância epidemiológica.** 4. ed. rev. ampl. Brasília, 1998, p. 287-293.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de controle da LTA.** Brasília, 1994. p. 7-41.

BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; AMATO NETO, V.; DUARTE, I. S.; PENNA, D. O. Glomerular involvement in human kala-azar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 24, n. 1, p. 9-18, 1975.

BRYCESON, A. D.; CHULAY, J. D.; MUGANBII, M.; WERE, J. B.; MUGAI, R.; CHUNGE, C.; GACHIHI, G.; MEME, J.; ANABWANI, G. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. I. Clinical and immunological studies. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 700-704, 1985. 1979.

BRYCESON, A. D. M.; CHULAY, J. D.; MUGAMBII, M.; WERE, J. B.; GACHIHI, G.; CHUNGE, C.; MUGAI, R.; BHATT, S. M.; HO, M.; SPENCER, H. C. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. II. Response to high dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 705-714, 1985.

CAMPOS Jr., D. Características clínico-epidemiológicas do calazar na criança. Estudo de 75 casos. **J. Pediatria (Rio J)**; vol. 71, p. 261-5, 1995.

CAMPOS-NETO, A.; BUNN-MORENO, M. M. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania*. **Infect. Immun.**, v. 38, p. 871-876, 1982.

CARVALHO, A. C.; SILVA, C. C.; ABUJAMRA, P. *Infecções cardíacas*: pericardites, miocardites, endocardite infecciosa. In: *Infectologia pediátrica*, 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 10, p. 70-80

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M. Immunology of human visceral leishmaniasis and perspective of the use of immunomodulation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 137-146, 1987.

CARVALHO, E. M.; D'OLIVEIRA Jr, A.; QUEIROZ, A. C. Imunopatologia do baço na leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 109, 1985.

CARVALHO, F. A. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A. P.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E. P.; RABELLO, A.; GAZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, p. 289-295, 2002.

CARVALHO, J. S.; PRATA, A. R., Mielograma no calazar. **Arq. Bras. Med. Naval.**, v. 68, p. 65-84, 1958.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo de leishmaniose visceral no Brasil. **Brazil Méd.**, v. 50, p. 221, 1936.

CHAGAS, E.; CHAGAS, A. W. Notas sobre a epidemiologia da leishmaniose visceral americana. **O Hospital**, v. 13, p. 471-480, 1938.

CHULAY, J. D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 69, 1988.

CHULAY, J. D.; SPENCER, H. C.; MUGAMBI, M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 702, 1985.

CORBETT, C. E. P.; DUARTE, M. I. S.; BUSTAMANTE, S. E. Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, n. 5, p. 616-624, 1993.

CUNHA, R. V.; ALENCAR, J. E.; ANDRADE, F. B. Uso da reação de fixação de complemento para diagnóstico do calazar canino em inquérito de massa. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 15, p. 405-410, 1963.

DAVIDSON, R. N.; CROFT, S. L.; SCOTT A. G.; et al. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. **Lancet**, v. 338, p. 1061-1062, 1991.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará. **O Hospital**, v. 45, p. 705, 1954.

_____. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. **O Hospital**, v. 48, p. 61, 1955.

DUARTE, M. I. S. **Análise subcelular qualitativa e morfométrica dos hepatócitos e da região sinusoidal na leishmaniose visceral humana**. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1987.

DUARTE, M. I. S. **Aspectos renais do calazar experimental. Contribuição da análise morfométrica da célula mesangial ao conhecimento da patogênese da amiloidose**. Tese (Doutorado)- Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1975.

DUARTE, M. I. S.; SESSO, A.; BRITO, T. Relationship between glomerular mesangial cell proliferation and amyloid deposition as seen by ultrastructural and morphometric analysis in experimental kala-azar of the hamster. **Am. J. Pathol.**, v. 92, p. 85-98, 1978.

DUTRA, M.; MARTINELLIM, R.; CARVALHO, E. M.; et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis. **Am. J. Kidney. Dis.**, v. 7, n. 1, p. 22-27, 1985.

ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface of *Leishmania* promastigotes is a protease. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 9098-9101, 1986.

EVANS, T. G.; REIS, M. F. F. E.; ALENCAR, J. E.; NAIDÚ, T. G.; JESUS, J. A.; McAULIFFE, J.; PEARSON, R. D. American visceral leishmaniasis (kala-azar). **West. J. Med.**, v. 142, p. 777-781, 1985.

GALVÃO-CASTRO, B.; SÁ FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, N. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 56, p. 58-66, 1984.

GENARO, O.; MARQUES, M. J.; REIS, A. B. et al. *Leishmaniose visceral americana*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**, 10. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. p. 56-72.

GOSWAMI, B. M. A study of cirrhosis of the liver due to chronic kala-azar. **J. Indian Med. Assoc.**, v. 54, p. 315-320, 1970.

GRIMALDI Jr, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 236-250, 1993.

GUAN, L. R. Current status of kala-azar and vector control in China. **Bull. World Health Org.**, v. 69, p. 595-601, 1991.

HANDMAN, E.; BUTTON, L. L.; McMASTER, R. W. *Leishmania major*: production of gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. **Exp. Parasitol.**, v. 70, p. 427-435, 1990.

HERWALDT, B. L.; BERMAN, J. S. Recommendation for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, p. 296-306, 1992.

KAGER, P. A.; REES, P. H.; WELLDE, B. T.; HOCKMEYER, W. T.; LYERLY, W. H. Allopurinol in the treatment of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, p. 556-559, 1981.

KING, D. L.; CHANG, Y. D.; TURCO, S. J. Cell surface lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 24, p. 47-53, 1987.

LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W., KILICK-KENDRICK, R. (Ed.) **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v.1, p. 1-120.

LAURENTI, M. D. **Aspectos patogénicos da resposta inflamatória aguda induzida experimentalmente em *Mesocricetus auratus* pela inoculação subcutânea de *Leishmania chagasi***. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, 1993.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 1252-1254, 1903.

LIMA, J. W. O. **Domestic transmission of cutaneous leishmaniasis in Brazil**. Tese de Doutorado. Harvard School of Public Health, 1995.

LOCKSLEY, R. M. Leishmaniose. In: Harrison, T. R. **Medicina Interna**. 13. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1985. v. 1, cap. 175, p. 939-942.

LOTHORLARY, O.; MECHALI, D.; CHRISTIAENS, D. et al. *Interferon associated with conventional therapy for recurrent visceral leishmaniasis in a patient with AIDS*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. 370-371, 1990.

MANSON-BAHR, P. E. C. A primary skin lesion in visceral leishmaniasis. **Nature**, v. 175, p. 433-434, 1955.

MATHERON, S., CABLE, A., PARQUIM, F.; MAYAUD, C.; ROOUX, P.; ANTOINE, M.; CHOUGNET, C.; COULAUD, J. P. Visceral leishmaniasis and HIV infection. Unusual presentation with pleuropulmonary involvement, and effect of secondary prophylaxis. **Aids**, v. 6, p. 238-240, 1992.

MATTOS, M. S. *Calazar*. In: SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 12, p. 196-200

MISHRA, M.; BISWAS, U. K.; JHA, A. M.; KHAN, A. B. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. **Lancet**, v. 340, p. 1256-1257, 1992.

NEVES, J. **Tratamento da leishmaniose visceral americana pelo antimoniato de N-metilglucamina (subsídio para o conceito de cura)**. Tese. Faculdade Medicina Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1963.

NICODEMO, E. L. **Infecção secundária no curso da leishmaniose visceral**. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1991.

NICODEMO, E. L.; DUARTE, M. I. S.; NICODEMO A. C.; AMATO NETO, V. Aspectos clínico-laboratoriais da nefrite intersticial da leishmaniose visceral. **Rev. Paul. Med.**, v. 102, p. 19-22, 1984.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Lucha contra las leishmaniasis**. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Ginebra, 1990. p. 27-29. (Serie de Informes Técnicos, 793).

PESSOA, S. B.; SILVA, L. H. P.; FIGUEREDO, J. Calazar endêmico em Jacobina – Estado da Bahia. **Bol. Fund. Gonçalo Muniz**, v. , p. 1-13, 1956.

PRATA, A. **Estudo clínico do calazar**. Tese. Faculdade Medicina, Universidade Federal da Bahia. 1957. 244f.

_____. Estudo clínico e laboratorial do calazar. **Arq. Bras. Med. Naval**, v. 65, p. 57-73, 1957.

RASO, P.; SIQUEIRA, J. T. Subsídio ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral, com especial referência às lesões pulmonares e cardíacas. **Hospital**, v. 65, p. 145-163, 1964.

REY, L. **Bases de parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 6, p. 58-65.

REY, L.C. Clinical and Epidemiological aspects of American Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. In: **III International Congress Of Pediatric Infectious Diseases**, 2002, Santiago, Chile. Anals.

RIBEIRO, J. M. C.; VACHEREAU, A; MODI, G. B.; TESH, R. B. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomia longipalpis*. **Science**, v. 243, p. 212-214, 1989.

RODRIGUES DA SILVA, J.; DE PAOLA, D. O problema das fibroses hepáticas na leishmaniose visceral americana. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 4, n. 1, p. 8-21, 1958.

ROGERS, L. A peculiar intralobular cirrhosis of the liver produced by the protozoal parasite of kala-azar. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 2, p. 147-152, 1908.

_____. Cachexial fever in India associated with Cunningham Leishmanian-donovan bodies. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 644, 1904.

RUSSEL, D. G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2613-2620, 1986.

SARTORI, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COE, J.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. II: Detection and characterization of parasite antigens and antibodies eluted from kidneys of *Leishmania donovani*-infected hamsters. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 87, p. 386-392, 1991.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI Jr, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 79, p. 511, 1984.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVOA, M. M. Leishmaniasis in Brazil. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, p. 830-832, 1982.

SOHSTEN, R. V.; KAYE, D. Endocardite infecciosa. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. v. 1, cap. 50, p. 655-668.

SOLI, A. S. V. In: SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

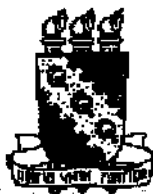
TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 387-423, 601-611, 636-644, 716-719.

TIMERMAN, A. **Comprometimento intestinal na leishmaniose visceral americana**. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

WEISINGER, J. R.; PINTO, A.; VELAZQUEZ, G. A.; BRONSTEIN, I.; DESSENE, J. J.; DUQUE, J. F.; MONTENEGRO, J.; TAPANES, F.; de ROUSSE, A. R. Clinical and histological kidney involvement in human kala-azar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 27, n. 2, p. 357-359, 1978.

APÊNDICES

APÊNDICE A



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 129/2001

Fortaleza, 03 de julho de 2001

Protocolo n° 54/01

Pesquisador responsável: José Nivon da Silva

Deptº/Serviço: Departamento de Patologia e Medicina Legal/UFC

Título do Projeto: “Estudo do Teste rápido imunoenzimático através do Antígeno Recombinante rK39 para Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Americana: Correlação Clínico Terapêutica”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n° 196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 28 de junho de 2001.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como 'Dr.ª M.ª Elisabete Amaral de Moraes'.

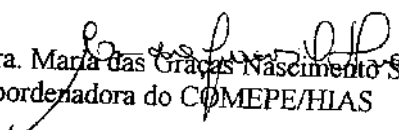
Dr.ª M.ª Elisabete Amaral de Moraes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
COMEPE/HUWG/UFC

APÊNDICE B



Ilm^a Sra. Dra. Maria das Graças Nascimento Silva
Chefe do Serviço de Arquivo Médico e Estatística – SAME/HIAS
Nesta

Levamos ao conhecimento de V.S^a, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), está ciente do Projeto de Pesquisa intitulado, “**Estudo do Teste rápido imunoenzimático através do Antígeno Recombinante rK39 para Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Americana: Correlação Clínico Terapêutica**”, a ser realizado neste Hospital em conjunto com o Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, estando portanto o pesquisador *José Nivon da Silva*, autorizado a ter acesso aos prontuários referentes ao estudo supra citado.


Dra. Maria das Graças Nascimento Silva
Coordenadora do COMEPE/HIAS

APÊNDICE C**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO PARA
PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Eu, _____ responsável pelo menor _____, declaro haver concordado que o menor acima, participe da pesquisa intitulada _____ sob a responsabilidade do Dr (a) _____. Declaro ainda haver concordado com a realização dos exames e tratamentos propostos pelo pesquisador(a), sendo também informado que a qualquer momento, por minha iniciativa, este consentimento poderá ser retirado sem prejuízos para o acompanhamento do paciente.

Fortaleza _____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável

APÊNDICE D

TERMO DE CONSENTIMENTO

O abaixo-assinado _____, _____ anos, Prontuário nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa de responsabilidade do médico Dr. Ivo Castelo Branco Coelho. Aceito participar do Projeto de Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical do Dr. José Nivon da Silva intitulado “**Estudo do Teste rápido imunoenzimático através do Antígeno Recombinante rK39 para Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Americana: Correlação Clínico Terapêutica**”, do Departamento de Patologia e Medicina Legal/Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

- I. O objetivo da pesquisa é verificar a sensibilidade e especificidade do método de diagnóstico empregando antígeno recombinante rK39 clonados de L(L) chagasi, dentre outros métodos já consagrados na literatura, bem como, investigar critérios de cura da leishmaniose visceral americana no seguimento clínico dos indivíduos.
- II. Durante o estudo, os indivíduos estarão hospitalizados em unidades hospitalares de referência da rede pública de saúde onde serão realizados todos os procedimentos e métodos de diagnóstico e tratamento, já que basicamente encontrar-se-ão com manifestações clínicas clássicas ou sintomáticas da doença. A duração do internamento e tratamento serão individualizados dependendo do quadro clínico e manifestações clínicas intercorrentes.
- III. A droga de escolha inicial é N-metil-glucamina (glucantine) 20mg/kg/dia, EV, em ambiente hospitalar. A administração de glucantine poderá causar efeitos como: cardiotoxicidade, arritmias cardíacas, dispepsia, febre, adinamia, anorexia, nefropatias dentre outros.
- IV. A participação neste estudo poderá proporcionar benefícios diretos aos indivíduos pela precocidade diagnóstica e por ser considerado um método laboratorial não invasivo.
- V. Será submetido durante o internamento aos seguintes exames laboratoriais: hemograma, mielograma, transaminases, proteínas totais e frações, uréia, creatina, ionograma, sumário de urina, protoparasitológico de fezes, eletrocardiograma, etc.
- VI. Obteve todas as informações necessárias para decidir conscientemente sobre a participação do referido ensaio clínico.
- VII. Está livre para interromper a participação no ensaio clínico a qualquer momento, a não ser que esta interrupção seja contra-indicada por motivo médico, com liberdade plena de recusar o consentimento, sem penalização.

- VIII. A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe médica.
- IX. Os resultados obtidos durante este ensaio poderão ser publicados, mas sua identidade não será revelada sem seu consentimento por escrito e o Departamento de Patologia e Medicina Legal não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
- X. Poderá contactar a secretaria da Comissão de Ética Médica para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.
- XI. Existe a possibilidade de inclusão em grupo controle.
- XII. Não haverá formas de ressarcimento ou indenização, por ser voluntário do referido projeto de pesquisa, tendo sido esclarecido antes e durante a pesquisa sobre a metodologia utilizada.

Todos os dados da minha participação serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para os monitores do estudo, autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, bem como a Comissão de Ética Médica, os quais quando necessário, terão acesso ao meu prontuário.

Como minha participação é inteiramente voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte penalidade ou perda de meus direitos onde recebo atendimento médico. Se eu tiver dúvida ou perguntas relativas a este estudo ou aos meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso compactar o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, no telefone _____.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____ Data: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Assinatura do investigador: _____

Fortaleza, _____, _____ de 2001

Assinatura do paciente ou responsável

APÊNDICE E

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Características Clínico-epidemiológicas dos Pacientes com Calazar

1. Identidade e dados hospitalares

- 1.1 Nome: _____
- 1.2 Sexo: Masculino () Femenino ()
- 1.3 Bairro: _____
- 1.4 Município: _____
- 1.5 Cata de nascimento: ____/____/____
- 1.6 Idade: _____ anos _____ meses _____
- 1.7 Hospital: 1. HIAS 2. HUWC 3. HSJ 4. Outro
- 1.8 Prontuário: _____
- 1.9 Data da admissão: ____/____/____
- 1.10 Data da alta: ____/____/____

2. Condições sócio-econômicas

- 2.1 De que material é feita sua casa?
1. Taipa () 2. Tijolo () 9. Outros ()
- 2.2 Quantas pessoas moram na casa? _____
- 2.3 Qual a renda total da família por mês? (Em salário mínimo) _____
- 2.4 Até que série a mãe passou de ano? _____ série _____ grau
- 2.5 A família cria cachorro em casa?
1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()
- 2.6 Há cachorros doentes (emagrecidos, pêlos caindo, feridas no focinho, fracos) em casa ou na vizinhança? (9 = ignorado)
1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()
- 2.7 Alguém já adoeceu de calazar na família ou na vizinhança? (9 = ignorado)
1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()

3. Antecedentes pessoais e familiares

- 3.1 Quantos filhos a senhora teve, com esta criança? _____
- 3.2 Teve algum filho que faleceu? Quantos? _____

3.3 Seu filho tem Cartão da Criança?

1. Sim () 2. Sim, mas não trouxe () 3. Não ()

3.4 Quantas dose a criança tomou destas vacinas? (Verificar no Cartão ou perguntar à mãe) (9 = não sabe)?

1. BCG () 2. Sabin () 3. Tríplice () 4. Sarampo ()

3.5 Seu filho já se internou alguma vez antes?

1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()

4. Interrogatório da doença atual

4.1 Quanto tempo faz que seu filho está doente? (anotar em semana) _____

4.2 O que ele apresentou desde que adoeceu?

Palidez () Emagrecimento () Moleza, fraqueza ()

Febre () Barriga inchada () Fastio ()

Sangramento () Inchaço de membros e/ou face () Outros ()

4.3 A criança foi vista por algum profissional de saúde antes de vir ao médico?

1. Não, foi encaminhada ()
2. Sim, foi internada e depois transferida ()
3. Não ()

5. Exame físico de admissão

5.1 Estado geral:

1. Bom () 2. Regular () 3. Comprometido () 4. Grave ()

5.2 Ectoscopia:

Palidez () Ictericia () Edema ()

Sangramento muco-cutâneo () Tiragem intercostal ()

5.3 Antropométricos:

Peso: _____ Altura: _____ (kg/ m)

5.4 Frequência respiratória: _____ (irpm)

5.5 Frequência cardíaca: _____ (bpm)

5.6 Temperatura: _____ (°C)

5.7 Tamanho do baço (em relação ao RCE): _____ (cm)

5.8 Tamanho do fígado (maior diâmetro em relação ao RCD): _____ (cm)

6. Exame laboratoriais

Hemácias: _____ ($\times 10^6/\text{mm}^3$)

Hematócrito: _____ (%)

Hemoglobina g%: _____ (g/dl)

VHS: _____ (mm)

- Leucócitos totais/mm³: _____ (/mm³)
 Polimorfonucleados neutrófilos/mm³: _____ (/mm³)
 Plaquetas/mm³: _____ (/mm³)
 6.1 Proteínas séricas totais: (mg/dl): _____ (mg/dl)
 Albumina: _____ (mg/dl)
 Globulina: _____ (mg/dl)
 6.2 Tempo de protombina (%): _____ (%)

7. Diagnóstico

7.1 Diagnóstico confirmado laboratorialmente:

1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado

7.2 Mielograma: _____

7.3 Sorologia:

A. Imunofluorescência Indireta para *Leishmania chagasi*: ()

1. Positivo () 2. Negativo: () Título: _____

B. Antígeno recombinante rK39

Positivo Soro

1. Positivo () 2. Negativo: ()

C. Elisa para *Leishmania*

1. Positivo () 2. Negativo: ()

8. Tratamento

8.1 Tipo de tramaneto (Sim = 1; Não = 2)

1. Glucatine () 2. Alopurinol () 3. Anfotericina ()
 4. Fator de estimulação de colônias () 5. Transfusão sanguínea ()

8.2 Duração do tratamento:

Glucatine (m d)

Alopurinol (m d)

Anfotericina (m d)

8.3 Antibióticos

1. Sim, uma droga ()
 2. Sim, mais de uma droga ()
 3. Não uso ()

8.4 Motivo do uso de antibiótico(s) (8 = NSA; 9 IGN)

Pneumologia () Infecção muco-cutânea ()

Septicemia () Febre indeterminada ()

Profilaxia da neutropenia () Outros ()

9. Evolução clínica – efeitos colaterais e complicações

9.1 O paciente apresentou algum tipo de complicação?

1. Sim, antes da internação () 2. Sim, depois da internação () 3. Não ()

9.2 Tempo de hospitalização (dias) até o início da intercorrência (8 = NSA)

9.3 Há relação entre a intercorrência e o tratamento? (8 = NSA; 9 = ignorado)

1. Sem relação com a droga utilizada ()

2. Certamente relacionada com alguma droga utilizada ()

9.4 Tempo de uso da droga que causou a complicação (em dias)

(Ignorado = 99/NSA = 88): _____

9.5 Droga relacionada com efeitos colaterais (9 = Ignorado; 8 = NSA)

1. Glucatine ()

2. Alopurinol ()

3. Anfotericina B ()

4. Antibióticos ()

5. Outros: _____ ()

9.6 Natureza das complicações (NSA = 8)

1. Infeciosa ()

2. Hematológica (hemorragia, leucopenia severa) ()

3. Hepática (Icterícia, hepatite) ()

4. Cardíaca (arritmia, ICC, miocardite) ()

5. Alérgica ()

6. Renal (IR) ()

7. Outras: _____ ()

10. Condições de alta e seguimento ambulatorial

10.1 Duração da internação (em dias): _____ ()

10.2 Evolução e condição de alta (1 = Sim; 2 = Não) ()

1. UTI Pediátrica ()

2. Com tratamento para casa ()

3. Sem tratamento para casa ()

4. Alta a pedido ()

5. Óbito ()

10.3 Revisão de alta e ou retorno ao ambulatório, enfermaria, etc.

1. Assintomático, clinicamente curado ()
2. Assintomático, visceromegalia presente ()
3. Não melhorou continua internação domiciliar ()
4. Não necessitou internamento hospitalar ()
5. Outras condições: _____ ()

11. Exame clínico-laboratoriais na alta

- 11.1 Tamanho do baço (em relação ao RCE): _____ (cm)
- 11.2 Tamanho do fígado (maior diâmetro em relação ao RCD): _____ (cm)
- 11.3 Hemácias: _____ ($\times 10^6/\text{mm}^3$)
- 11.4 Hematócrito: _____ (%)
- 11.5 Hemoglobina g%: _____ (g/dl)
- 11.6 VHS: _____ (mm)
- 11.7 Leucócitos totais/ mm^3 : _____ ($/\text{mm}^3$)
- 11.8 Polimorfonucleados neutrófilos/ mm^3 : _____ ($/\text{mm}^3$)
- 11.9 Plaquetas/ mm^3 : _____ ($/\text{mm}^3$)
- 11.10 Proteínas séricas totais: (mg/dl): _____ (mg/dl)
 - Albumina: _____ (mg/dl)
 - Globulina: _____ (mg/dl)
- 11.11 Tempo de protombina (%): _____ (%)

APÊNDICE F

Quadro 1: Valores hematimétricos quanto ao sexo

	Hemograma completo	Média	D.p.	I.C. 95%	Valores referência
Hemácias	Masculino (N = 72)	3,06 milhões	0,92	2,84 – 3,28	4,5 – 6,5 milhões
	Feminino (N = 51)	2,90 milhões	0,61	2,73 – 3,07	4,0 – 5,5 milhões
Hemoglobina	Masculino (N = 72)	7,15	1,97	6,68 – 7,62	13,5 – 18,0 g/dL
	Feminino (N = 51)	6,92	2,04	6,34 – 7,50	11,5 – 15,5 g/dL
Hematócrito	Masculino (N = 72)	21,74	6,13	20,29 – 23,19	40,0 – 54,0%
	Feminino (N = 51)	21,32	4,90	19,93 – 22,71	36,0 – 45,0%
Leucócitos	Masculino (N = 72)	2663,19	1619,14	2278,34 – 3048,00	4 x 10 ³ – 13 x 10 ³ (para ambos os sexos)
	Feminino (N = 51)	2673,37	1622,48	2214,37 – 3132,30	
Neutrófilos	Masculino (N = 72)	43,70	19,63	38,73 – 48,67	40% - 75% (para ambos os sexos)
	Feminino (N = 51)	35,76	13,69	31,59 – 39,93	
Linfócitos	Masculino (N = 72)	47,28	24,50	39,04 – 55,52	20% - 45% (para ambos os sexos)
	Feminino (N = 51)	57,46	18,98	50,55 – 64,37	
Plaquetas	Masculino (N = 72)	93871,42	52646,46	81538,21 – 1062,00	150.000 – 500.00 (para ambos os sexos)
	Feminino (N = 51)	105306,38	79782,95	82496,95 – 1281,10	

APÊNDICE G

Quadro 2: Valores bioquímicos

Função Hepática e Proteína	Média	D.p.	I.C. 95%	Valores referência
Proteínas Totais (N = 123)	7,57	1,67	7,24 – 7,90 g/dL	Adulto*: 6,7 – 8,7 g/dL Crianças 3 anos: 5,4 – 8,7 g/dL
Albumina (N = 123)	2,73	0,81	2,57 – 2,89 g/dL	3,5 – 5,5 g/dL
Globulina (N = 123)	4,85	1,79	4,50 – 5,20 g/dL	1,0 – 3,0 g/dL
TGO (N = 123)	197,02	42,19	118,0 – 209,6 U/L	5 – 40 UL
TGP (N = 123)	110,79	229,22	105,78 – 117,60 U/L	5 – 40 U/L
TP (N = 123)	63,68	20,28	58,89 – 68,47%	>70%