

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

ANDRÉIA INSABRALDE DE QUEIROZ CARDOSO

**DENSIDADE PARASITÁRIA EM MEDULA ÓSSEA DE CRIANÇAS COM
LEISHMANIOSE VISCERAL E SUA RELAÇÃO COM OS ASPECTOS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS E DO TRATAMENTO**

**CAMPO GRANDE
2010**

ANDRÉIA INSABRALDE DE QUEIROZ CARDOSO

**DENSIDADE PARASITÁRIA EM MEDULA ÓSSEA DE CRIANÇAS COM
LEISHMANIOSE VISCERAL E SUA RELAÇÃO COM OS ASPECTOS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS E DO TRATAMENTO**

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

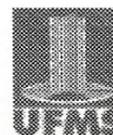
Orientadora: Prof^a Dr^a. Yvone M. Brustoloni

**CAMPO GRANDE
2010**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

**Programa de Pós Graduação em
Doenças Infecciosas e Parasitárias**



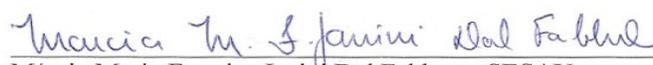
TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação intitulada DENSIDADE PARASITÁRIA EM MEDULA ÓSSEA DE CRIANÇAS COM LEISHMANIOSE VISCERAL E SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DO TRATAMENTO, apresentada à banca examinadora por ANDRÉIA INSABRALDE DE QUEIROZ CARDOSO, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obteve aprovação.

BANCA EXAMINADORA:



Yvone Maia Brustoloni – UFMS



Márcia Maria Ferrairo Janini Dal Fabbro – SESAU



Ana Lucía Lyrio de Oliveira – UFMS

Campo Grande, 30 de julho de 2010.

A Deus por esta oportunidade
maravilhosa de aprender e evoluir.

Aos meus familiares:

Pais: Pedro e Edenir, irmão Anderson
e amado Teófilo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos amigos fraternos que contribuíram para a minha formação como ser humano e profissional;

Aos meus queridos pais Pedro e Edenir, pelo carinho, amor, simplicidade e esforços para minha evolução;

Ao meu irmão Anderson e sobrinho Pedro Henrique, que torcem por todas as minhas realizações;

Ao meu querido e amado marido Msc. Teófilo, “Téo”, companheiro de todas as horas, o qual soube estar ao meu lado, apoiar-me e entendeu as minhas ausências;

À minha família catarinense Sr^o Mário, Sr^a Ivanir, Caroline, Denise, Leonardo e sobrinha Maria Luíza “Malu”, que embora distantes dos olhos, me fazem sentir apoio e compreensão;

À minha orientadora Dr^a Yvone Maia Brustoloni, acima de tudo querida professora, por ter aceitado ser minha orientadora e ter me guiado com sabedoria e serenidade em todos os momentos desta jornada;

À Dr^a Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval, Msc. Elisa Oshiro, Geucira, Zélia e Jucelei, equipe do Laboratório de Parasitologia, que me receberam muito bem durante toda esta pesquisa;

Aos professores do programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias por todo conhecimento e carinho, em especial Dr^a Elenir Cury Pontes e Dr^a Ana Lúcia Lyrio;

Às enfermeiras e amigas Msc. Sandra Leone, Msc. Angelita Druzian e Dr^a Maria de Fátima Chead por me auxiliarem durante esta caminhada.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se,

Fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.

Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”

(Martin Luther King)

RESUMO

Introdução: A quantificação da densidade parasitária é importante para o melhor entendimento dos parâmetros imunológicos, clínicos e terapêuticos em um processo infeccioso. Apesar de a leishmaniose visceral (LV) ser comum na faixa etária pediátrica, existe escassez de informações sobre a magnitude da infestação parasitária em crianças com LV. **Objetivo:** analisar a densidade parasitária da medula óssea de crianças com LV, relacionando-a com aspectos clínicos, laboratoriais e de tratamento. **Material e métodos:** realizou-se uma releitura de lâminas de aspirado medular obtidas por ocasião da internação de crianças com LV em um hospital universitário de referência, classificando-se a densidade parasitária em graus variando de 1+ a 6+ e relacionando-se esta aos dados obtidos dos prontuários. **Resultados:** 109 crianças tiveram suas lâminas de esfregaço delgado de aspirado medular analisadas. A maioria (62,4%) apresentou densidade parasitária classificada em graus 1+ e 2+. A densidade parasitária foi maior naquelas com risco nutricional ou peso baixo/ desnutrição, com baço maior que 10 cm, nas que receberam anfotericina B como primeira escolha e nas que necessitaram uso prolongado (>28 dias) de antimoniato de N-metilglucamina. Detectou-se a presença de 7,3% de crianças altamente parasitadas (grau 5+). **Discussão:** A maioria das crianças com LV exibiram grau de parasitismo medular não muito elevado, o que poderia constituir um dos fatores que explicam a boa resposta ao tratamento com antimoniato de N-metilglucamina (94,1%). Nos pacientes com carga parasitária elevada (5+), tratamento mais prolongado (até 40 dias, para aqueles utilizando antimoniato de N-metilglucamina) pode ser necessário para a obtenção da cura clínica. **Conclusão:** a determinação da carga parasitária em crianças antes do início do tratamento permite a identificação do grau de parasitismo podendo auxiliar na decisão do tempo adequado de tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, densidade parasitária e criança.

ABSTRACT

Introduction: The quantification of parasite density is important for better comprehension of immunological, clinical and therapeutic parameters in infectious process. In spite of visceral leishmaniasis (VL) to be common in pediatric age groups, there is a lack of information about the magnitude of parasite infestation in children with VL. **Objective:** to analyze parasite density of bone marrow in children with LV, relating it to clinical, laboratory and treatment aspects. **Material and methods:** slides of aspirated bone marrow gotten by admission of children with LV to an important university hospital were reanalyzed, and parasite density were classified in degrees varying from 1+ to 6+ and related to data gotten from medical notes. **Results:** 109 children had their thin smear slides of aspirated bone marrow analyzed. The majority (62.4%) presented parasite density classified in degrees 1+ and 2+. The parasite density was higher in children with nutritional risk of underweight/malnutrition, in those with spleen bigger than 10 cm, in patients who had received amphotericin B as first choice and in them who had needed prolonged use (>28 days) of N-methylglucamine antimoniate. It was detected presence of 7.3% of highly parasitaded children (degree 5+). **Discussion:** The majority of children with VL had shown a not very high marrow parasitism degree, which could be one of the factors that explain the good reply to the treatment with N-methylglucamine antimoniate (94.1%). In patients with high parasite load (5+), it can be necessary prolonged treatment (up to 40 days, for patients using N-methylglucamine antimoniate) for clinical cure. **Conclusion:** the determination of parasite load in children before the beginning of treatment allows the identification of parasitism degree what could help on the decision about the appropriate time of treatment.

Keyword: Visceral leishmaniasis, Parasite density, Child.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Forma amastigota de *Leishmania* em esfregaço delgado de aspirado medular em criança com LV, correspondente ao grau 1+ da classificação de Chulay e Bryceson (1983). Coloração Giemsa, aumento 1000x..... 32
- Figura 2 - Forma amastigota de *Leishmania* em esfregaço delgado de aspirado medular em criança com LV, correspondente ao grau 4+ da classificação de Chulay e Bryceson (1983). Coloração Giemsa, aumento 1000x..... 32
- Figura 3 - Forma amastigota de *Leishmania* em esfregaço delgado de aspirado medular em criança com LV, correspondente ao grau 5+ da classificação de Chulay e Bryceson (1983). Coloração Giemsa, aumento 1000x..... 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número e porcentagem de crianças com leishmaniose visceral segundo a densidade parasitária em aspirado medular, NHU-UFMS, 2000 a 2008	33
Tabela 2 -	Estatística descritiva dos valores da densidade parasitária segundo características clínicas de crianças com leishmaniose visceral, NHU- UFMS, 2000 a 2008 (n = 109).....	35
Tabela 3 -	Estatística descritiva dos valores da densidade parasitária segundo curva de desenvolvimento nutricional de crianças com leishmaniose visceral, abaixo de 5 anos de idade, NHU- UFMS, 2000 a 2008 (n = 78).....	36
Tabela 4 -	Estatística descritiva dos valores da densidade parasitária segundo características laboratoriais de crianças com leishmaniose visceral, NHU- UFMS, 2000 a 2008.....	37
Tabela 5 -	Estatística descritiva dos valores da densidade parasitária segundo características do tratamento medicamentoso de crianças com leishmaniose visceral, NHU-UFMS 2000 a 2008.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

LV	Leishmaniose Visceral
MS	Mato Grosso do Sul
<i>L. chagasi</i> : <i>L (L) chagasi</i>	<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>
<i>L. (L) infantum</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
<i>L. (L) donovani</i>	<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>
<i>L. longipalpis</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
<i>L. cruzi</i>	<i>Lutzomyia cruzi</i>
µm	Micrômetro
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana ou <i>Human Immunodeficiency virus</i>
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida ou <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
SMF	Sistema fagocítico mononuclear
IL	Interleucinas
Th	Célula T auxiliar
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
NNN	Novy, MacNeal e Nicole (meio de cultivo)
LIT	<i>Liver infusion Tryptose</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático ou <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
rk39	Proteína recombinante k39, sequência de 39 aminoácidos
DAT	Teste de aglutinação direta
PCR	Reação em cadeia da polimerase ou <i>Polymerase chain reaction</i>
RT-PCR	<i>Real time-polymerase chain reaction</i>
LDU	Unidade Leishman Donovaní ou <i>Leishman Donovaní Units</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	13
2.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral.....	13
2.2 Patogenia.....	16
2.3 Manifestações clínicas.....	17
2.4 Diagnóstico laboratorial.....	19
2.5 Tratamento medicamentoso.....	22
2.6 Prevenção da leishmaniose.....	23
2.7 Densidade Parasitária.....	24
3 OBJETIVOS.....	26
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	27
4.1 Classificação da pesquisa.....	27
4.2 Fonte de dados.....	27
4.3 Coleta de dados.....	28
4.4 Técnica de análise dos dados.....	29
4.5 Aspectos éticos da pesquisa.....	30
5 RESULTADOS.....	31
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÃO.....	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma infecção sistêmica que ameaça a vida e torna-se fatal quando não tratada adequadamente. Inicialmente uma doença de zona rural, a LV vem sofrendo um processo constante de urbanização, constituindo agora um importante problema de saúde pública na maioria das regiões brasileiras.

Na América do Sul a doença acomete mais crianças pequenas do que adultos. Alguns fatores de risco como desnutrição, imunossupressão, transplantes, mudanças ou viagens para áreas endêmicas podem facilitar a evolução da infecção.

Para o diagnóstico laboratorial da LV o método mais utilizado é o parasitológico, cuja visualização de amastigotas por meio da microscopia direta é considerada “padrão ouro” em locais com estrutura e profissionais qualificados para a sua realização. Podem também ser empregados os métodos de cultura de tecidos, métodos sorológicos e o diagnóstico molecular.

O método parasitológico é importante, pois além de permitir o diagnóstico, possibilita a determinação da carga parasitária nos doentes que serão submetidos a tratamento. Quantificar a carga parasitária pode ser uma boa maneira de acompanhar a evolução de uma infecção e também verificar o efeito de um determinado esquema terapêutico.

Poucos são os estudos feitos em humanos para a análise da densidade parasitária, embora existam métodos validados para tal. Há mais de 20 anos, Chulay e Bryceson (1983) desenvolveram uma técnica de quantificação de amastigotas em aspirado esplênico. Nessa época, os autores demonstraram que a graduação da densidade parasitária mostrava-se útil na avaliação da resposta ao tratamento e na distinção entre respondedores lentos e não respondedores, sendo especialmente importante no manejo de pacientes com resistência ao tratamento.

Frente à ausência de relatos que elucidem a densidade parasitária em aspirado medular de crianças com LV, desde sua magnitude até sua relação com as manifestações clínicas, laboratoriais e do tratamento, houve a motivação para a realização desta pesquisa.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

2.1.1 Histórico

A leishmaniose visceral era conhecida pelos indus como calazar (kalazar: indú kala = negro e do persa azar = doença) ou febre negra. As primeiras descrições foram feitas em 1898 por Borovsky e posteriormente em 1903 por Leishman, confirmada por Donovan e o parasita denominado posteriormente por Ross como *Leishmania donovani*. No ano de 1912, Gaspar Vianna descobriu a cura da patologia com a utilização de tártaro emético, alterando desta forma o tratamento no mundo. A letalidade estimada para a época oscilava entre 75 a 95% (COURA, 2008; REY, 2008).

Historicamente conhecida no Brasil como uma doença de área rural, a partir da década de 80 passou a ser registrado um processo de urbanização que vem ocorrendo em grande parte do país (BRASIL, 2006a). A primeira grande epidemia urbana ocorreu em Teresina no Piauí e posteriormente em Natal e São Luís, com a disseminação para várias outras regiões e Estados. Apenas a região Sul brasileira era descrita como não atingida, mas recentemente foi detectado o primeiro caso autóctone no Rio Grande do Sul (WERNECK, 2010).

2.1.2 Agente etiológico

Os agentes etiológicos da LV são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania*, os quais possuem apenas duas formas durante o seu ciclo vital: amastigotas e promastigotas. Dentre as espécies de *Leishmania* que causam lesões viscerais encontram-se a *Leishmania Leishmania infantum* na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia, China e Norte da África, *Leishmania Leishmania donovani* na Índia, Sudão, Bangladesh, China e Nepal e a *Leishmania Leishmania chagasi* na América Latina (GONTIJO; MELO, 2004; COURA, 2008).

As formas amastigotas ocorrem quando o parasito é intracelular em hospedeiros vertebrados. São estruturas ovóides de 2 a 6 μm , sem flagelo e com a presença de blefaroplasto, mitocôndria, núcleo, aparelho de Golgi e cinetoplasto. Ao serem coradas pelos métodos derivados de Romanovsky, mostram poucas estruturas internas. A multiplicação ocorre por divisão binária, aproximadamente 35 horas após a invasão da célula hospedeira. No tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, as amastigotas transformam-se em promastigotas e passam a ter cerca de 12 a 20 μm de comprimento, corpo flexível com um comprido flagelo (REY, 2008).

2.1.3 Hospedeiro Invertebrado

A transmissão da doença ocorre através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo, e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Esses insetos são conhecidos genericamente como flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004).

Nas Américas, apesar de extensa área, o principal vetor é *Lutzomyia longipalpis* e mais especificamente no Estado do Mato Grosso do Sul (MS), na região de Corumbá, foi descrito *L. cruzi* como vetor da LV (GALATI et al., 1997). Em Campo Grande, estudos destacam a presença de *L. longipalpis* desde 2000, sendo que entre os anos de 2003 e 2005, 92,9% dos flebotomíneos capturados eram *L. longipalpis* (OLIVEIRA, A. G. et al., 2006; SILVA et al., 2008).

A exposição da população humana aparece como o primeiro fator de risco para o aparecimento da doença (QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004).

O flebotomíneo infecta-se quando suga sangue contendo amastigotas de *Leishmania* durante o repasto sanguíneo em um reservatório infectado. Os parasitas multiplicam-se no tubo digestivo do inseto, com a diferenciação da amastigota em promastigota metaciclística. Ao final do ciclo ocorre a movimentação para a parte anterior do tubo digestivo, o que dificulta a alimentação e faminto o inseto inicia a busca por alimento picando os vertebrados. Quando uma nova vítima é picada, ocorre regurgitação das formas promastigotas que infectam o indivíduo sadio (DESJEUX, 2004; MELO, 2004).

2.1.4 Ciclo Biológico

A LV é uma zoonose transmitida entre animais e homens. Dentre os reservatórios silvestres destacam-se a raposa (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*), que devido aos hábitos sinantrópicos podem fazer a ligação entre o ciclo silvestre e doméstico. Esses animais constituem uma das maiores fontes de infecção para os cães (*Canis familiaris*), os quais são indicados como os maiores reservatórios domésticos (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2005).

A relação do cão como principal reservatório da doença é questionada e os argumentos são a baixa correlação entre coabitação com cães e aquisição da doença, e a eliminação de cães não parece reduzir a incidência da infecção humana (DIETZE et al., 1997).

2.1.5 Endemicidade

A LV é uma doença endêmica em 62 países de regiões tropicais e subtropicais, com uma população exposta chegando até 2 milhões de pessoas e uma incidência de 500 mil casos novos por ano, com uma estimativa de 50.000 mortes. Ocorre especialmente em crianças e indivíduos imunossuprimidos (DESJEUX, 2004; MEDEIROS et al., 2007).

Cerca de 90% dos casos ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil. A letalidade situa-se entre 10 e 15% e dados demonstram o aumento no coeficiente de mortalidade em países em desenvolvimento de 0,04/100.000 em 1980 para 0,09/100.000 em 1990 (LUZ; SUCCI; TORRES, 2001; MELO, 2004).

Novos fatores de risco relacionados com o aumento da incidência de LV são descritos como coletivos (imigração e resistência primária ou secundária do parasita aos fármacos) e individuais (coinfecção HIV e/ou tuberculose) (SUNDAR; RAI, 2002; DESJEUX, 2004).

Na Europa a LV é considerada uma doença emergente, onde 25 a 70% dos adultos com a doença têm AIDS, existindo propostas para que seja incluída como uma doença definidora da AIDS (CHAPPUIS et al., 2007).

Na América Latina 90% dos casos estão no Brasil e nos últimos anos a mesma vem ocorrendo de forma epidêmica em periferias de capitais brasileiras. Acomete todas as idades, sendo que 80% dos casos registrados incidem em indivíduos menores de 10 anos, principalmente em menores de 5 anos e do sexo masculino (BRASIL, 2006a; GONTIJO; MELO, 2004;).

O panorama epidemiológico indica a gravidade da expansão geográfica da doença no Brasil; entre os anos de 2006 e 2008 a transmissão autóctone da LV foi registrada em mais de 1.200 municípios em 21 estados do país (WERNECK, 2010).

2.1.6 Urbanização da leishmaniose

A migração dos flebotomíneos ocorre devido ao desmatamento, que faz com que estes procurem fontes alimentares como homens e cães nas áreas urbanas e periurbanas. Outro agravante é o processo migratório dos homens residentes nas áreas rurais para urbanas, principalmente devido a problemas relacionados com inadequada infraestrutura sanitária e habitacional, criando um ambiente favorável para o estabelecimento e desenvolvimento da doença (BEVILACQUA et al., 2001; MARZOCHI et al., 1985; ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996).

As características favoráveis para a procriação dos flebotomíneos são a presença de animais na zona urbana como cavalo, galinha e cães, assim como grandes áreas verdes com árvores frutíferas e deposição de matéria orgânica no solo (OLIVEIRA, A. L. L. et al., 2006).

Nos últimos anos a LV no Estado do MS tem se tornado um problema de saúde pública, especialmente na capital, Campo Grande, onde é caracterizada como uma endemia, apresentando uma taxa de transmissão considerada alta (SILVA et al., 2008).

2.2 Patogenia

Existe um tropismo visceral do complexo *L. donovani*, e as formas amastigotas desenvolvem-se no interior dos vacúolos das células do sistema fagocitário mononuclear (SMF), causando visceralização, sendo os órgãos mais afetados o baço, fígado, linfonodos e medula óssea, pois são os mais ricos em células do SMF (MURRAY, 2001; MELO, 2004).

A resposta imune do homem à infecção é complexa e a evolução da infecção é determinada pela natureza e magnitude das respostas de células T e citocinas. O desenvolvimento de doença é associado com anergia celular, que pode ser explicada por apresentação inapropriada de antígeno e indução de interleucinas IL-10 e 4, supressoras da resposta imune (resposta Th2); de outra forma, a IL-12 e interferon-gamma induzem a resposta Th1 e parecem ser importantes para uma evolução favorável após a infecção pela *Leishmania* (MURRAY, 2001; MURRAY et al., 2005).

A resposta imune do hospedeiro sofre alterações em decorrência de propriedades farmacológicas e bioquímicas da saliva dos flebotomíneos e estes mecanismos podem influenciar diretamente a evolução da doença (ROHOUSOVÁ; VOLF, 2006). Estudos vêm sendo realizados com o intuito de se isolar partículas salivares para criação de vacinas, relatos indicam que a exposição ao agente pode conferir imunidade, diminuindo o risco de transmissão em áreas endêmicas (ANDRADE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

A desnutrição infantil é citada como um dos problemas relacionados à resposta imunológica ineficaz ao parasita e o desenvolvimento da doença; outros estudos indicam a LV como fator desencadeante da desnutrição infantil (LUZ; SUCCI; TORRES, 2001; QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004).

2.3 Manifestações Clínicas

A LV é uma parasitose que apresenta como características clínicas febre prolongada, anemia, hepatoesplenomegalia, apatia e emagrecimento; se não tratada, pode evoluir para caquexia, pancitopenia, insuficiência hepática e infecções secundárias, o que geralmente é fatal (TOTAN; ALBAYRAK, 2001; PASTORINO; JACOB; OSELKA, 2002; RIGO; RIGO; HONER, 2009)

A LV pode ter um período de incubação variável entre 2 semanas a 8 meses, mas geralmente ocorre entre 2 a 6 meses. Geralmente apresenta-se gradualmente ou de forma abrupta, sendo descrita com várias formas clínicas: forma assintomática, subclínica também chamada de oligossintomática ou forma clássica (REY et al., 2005; PRATA; SILVA, 2005).

Nos casos assintomáticos não há evidências de manifestações clínicas; ocorrem em pacientes provenientes de áreas endêmicas, os quais apresentam

reação sorológica e teste intradérmico positivos e a não progressão da doença para a visceralização (MURRAY, 2000).

A forma subclínica ou oligossintomática é descrita em até 85% dos indivíduos de área endêmica, geralmente crianças, com quadro clínico discreto de curta duração (15 dias) que evolui para cura espontânea e pode ser facilmente confundida com processos infecciosos benignos. Acredita-se que desnutrição é um fator que predispõe a criança à evolução da doença, devido à alteração na resposta imune (REY et al., 2005; PRATA; SILVA, 2005).

A forma clássica se manifesta em três fases: o período inicial, o período de estado e o estágio final. No início ocorre febre recorrente (39 - 40 °C) ou insidiosa, às vezes com calafrios, mal estar e pode variar de paciente para paciente. Progressivamente instala-se hepatoesplenomegalia, diarreia, desconforto e cansaço. No período de estado ocorre febre irregular, anemia, aumento da hepatoesplenomegalia, leucopenia, pancitopenia e quadro clínico com mais de dois meses de evolução. Pode evoluir para o estágio final com caquexia, hemorragia, ascite, icterícia, queda de cabelo e desnutrição (COURA, 2008).

Se não tratada adequadamente a LV é sempre fatal e o óbito geralmente ocorre por infecções bacterianas ou hemorragias; a mortalidade nos casos não tratados pode alcançar 70 a 90%. Apesar do conhecimento das principais causas de óbito relacionadas à LV, as mesmas ainda ocorrem. Isto indica a necessidade de profissionais capacitados, monitoramento clínico e laboratorial, agilidade nos diagnósticos e novos medicamentos com baixa toxicidade (DESJEUX, 2004; OLIVEIRA et al., 2010).

São considerados sinais de gravidade na LV: idade abaixo de 6 meses ou superior a 65 anos, presença de desnutrição grave, comorbidades ou manifestações clínicas como icterícia, hemorragias, edema generalizado e sinais de toxemia (BRASIL, 2006b).

2.4 Diagnóstico Laboratorial

2.4.1 Diagnóstico parasitológico

Em pacientes sintomáticos, as amastigotas intracelulares são mais facilmente identificadas em macrófagos da medula óssea, fígado, baço e linfonodos que são órgãos alvo da infecção (MURRAY, 2000).

A coleta de material de medula óssea pode ser feita por punção do esterno em adultos, obesos e com imobilidade; a punção de crista ilíaca posterior é indicada para crianças, inclusive pequenas, e também para adultos obesos ou com imobilidade, sendo que em alguns casos raros pode ser realizada a punção tibial em crianças. A punção esplênica é sujeita a complicações hemorrágicas e rupturas, sendo contra indicada em casos de anemia severa, gestação e tendência a sangramento (BAIN, 2001; DESJEUX, 2004; BRASIL, 2006b).

A visualização direta de amastigotas por exame microscópio é o “padrão ouro” para o diagnóstico da LV. A sensibilidade pode variar, dependendo do material analisado. No baço, descreve-se uma sensibilidade em torno de 93 a 99%; em aspirados de medula óssea, de 53 a 86%; em aspirado de linfonodos, de 53 a 65% (GONTIJO; MELO, 2004). Um estudo feito em crianças com LV detectou 81,2% de sensibilidade em material obtido por punção medular (PEDROSA; ROCHA, 2004).

A sensibilidade da microscopia decorre de fatores como: qualidade dos reagentes utilizados, acurácia e habilidade do examinador, técnicas laboratoriais e de coleta do material a ser analisado (CHAPPUIS et al., 2007).

A maneira de confecção das lâminas com o material coletado também é um fator que influencia a sensibilidade do método. Após a coleta de material por meio da aspiração da medula óssea, um esfregaço delgado deve ser feito em lâminas previamente limpas e desengorduradas, colocando-se uma gota de aspirado a aproximadamente 1 cm do final da lâmina. O material deve ser firmemente dispersado, sendo satisfatório o esfregaço fino, homogêneo e mais estreito que a lâmina, para facilitar a leitura e que tenha de 3 a 5 cm de comprimento (KNOWLES; HOFFBRANDE, 1980; BAIN, 2001).

O método de coloração usual é o de Giemsa, no qual uma solução corante pode evidenciar diferentes estruturas celulares (DI CARLI; TASCA, 2007).

A leitura deve ser feita através da microscopia com objetiva de 100x em óleo de imersão. Existe maior sensibilidade quando as lâminas são analisadas cuidadosamente e por um período de tempo adequado. Em 2006, o Ministério da Saúde recomendou a leitura de 200 campos antes de se indicar um esfregaço como negativo (BRASIL, 2006a); no mesmo ano, publicou normas técnicas para o manejo de pacientes graves, indicando o exame de 1200 campos (20 minutos) antes de se determinar uma amostra como negativa. Recomenda-se mais tempo para o exame de lâminas dos pacientes com alta probabilidade de LV (DA SILVA, STEWART, COSTA, 2005; BRASIL, 2006 b).

As amastigotas aparecem como corpos redondos ou ovais de 2 a 3 μm e são encontradas no meio intracelular e extracelular, em monócitos e macrófagos. O citoplasma aparece corado em azul pálido, com um núcleo relativamente grande corado de vermelho e no mesmo plano em um vermelho profundo ou violeta aparece o cinetoplasto (SUNDAR; RAÍ, 2002).

A cultura de tecidos é outro método parasitológico utilizado para o diagnóstico, mas a mesma é demorada e não adequada para tomada de conduta rápida, pois o resultado pode demorar de dias a semanas para ser obtido. A cultura é feita em meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e meio de LIT (Liver Infusion Tripstose) ou de Schneider (DIETZE, 2006).

Novas técnicas de microcultura e isolamento de parasitas em sangue periférico estão sendo testadas e devem ser consideradas como diagnóstico complementar (HIDE et al., 2007).

Inoculação *in vivo* em animais susceptíveis como *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) também pode ser realizada, no entanto 1 a 3 meses podem ser necessários para obter-se um resultado positivo (DIETZE, 2006)

2.4.2 Diagnóstico sorológico

No Brasil, os principais métodos sorológicos empregados são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e o teste de aglutinação direta (DAT) (GONTIJO; MELO, 2004).

Os títulos são baixos em infecções inaparentes e podem permanecer positivos após tratamento, sendo que os pacientes com cura clínica de LV ou com

leishmaniose cutânea podem ser reativos nos exames sorológicos. Na ausência de manifestações clínicas, um teste reagente não indica início de tratamento (BRASIL, 2005; 2006a).

Atualmente no Brasil tem-se utilizado o antígeno rk39 (Teste Rápido) para o diagnóstico da LV. Alguns autores sugerem que ainda são necessárias mais pesquisas para melhorar o formato deste teste, pois houve vários resultados falsos, o que indica a necessidade de um rigoroso padrão de qualidade para o diagnóstico (CHAPPUIS et al., 2007; ASSIS et al., 2008; XAVIER-GOMES et al., 2009).

2.4.3 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular possibilita a detecção do DNA do parasita mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*); representa uma excelente opção de diagnóstico, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade; seu uso tem grande utilidade em casos de diagnóstico difícil por microscopia (DIRCH et al., 2003; HIDE et al., 2007).

Atualmente estão sendo testadas várias técnicas inovadoras para o diagnóstico da LV, com PCR e suas variantes: reação de transcriptase reversa seguida da PCR (RT-PCR); ampliação de uma sequência interna de fragmento previamente amplificado por uma PCR (nested-PCR), PCR multiplex e PCR quantitativa (MARY et al., 2004; FAYZY et al., 2008).

Para a realização da PCR já foram utilizadas com sucesso diversos tipos de amostras biológicas, como sangue periférico, creme leucocitário, aspirado de medula óssea, aspirado esplênicos e de linfonodos, material conservado em parafina, lâminas de esfregaço delgado corado e outros (DIRCH et al., 2003; TAFURI et al., 2004; BRUSTOLONI et al., 2007; FAYZY et al., 2008).

Recentemente foi relatado que a PCR em sangue periférico de crianças com LV é tão sensível para o diagnóstico quanto a técnica de PCR realizada em aspirado medular e mais sensível que os tradicionais métodos invasivos, sugerindo-se que há vantagem na aplicação desse método em crianças, por ser a coleta de material menos invasiva (FRAGA et al., 2010).

2.5 Tratamento Medicamentoso

A escolha do medicamento para o tratamento depende de vários fatores que envolvem as características clínicas da doença, segurança apresentada pelo fármaco, eficácia e o custo (GRADONI; GRAMICCIA; SCALONE, 2003)

Por mais de sessenta anos os antimoniais pentavalentes - antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentosan®) - são empregados no tratamento da LV. No Brasil o fármaco de primeira escolha é o antimoniato de N-metilglucamina e na ocorrência de resistência, efeitos colaterais ou pacientes com sinal de gravidade, utiliza-se a anfotericina B (PASTORINO et al., 2002; BRASIL, 2006b).

Existem várias outras medicações para o tratamento da LV, com um progresso crescente nos últimos anos. As novas terapias associam fármacos e tendem a diminuir os efeitos colaterais, sendo até mesmo utilizado o tratamento por via oral com miltefosina, fármaco que foi desenvolvido inicialmente como agente antitumoral, e apresenta 95% de cura da LV na Índia, medicamento este não liberado no Brasil (MURRAY, 2000).

Os critérios de cura e indicativos de uma terapêutica bem sucedida são essencialmente clínicos. A maioria dos pacientes apresenta melhora clínica após 7 a 10 dias de tratamento: a febre geralmente desaparece em torno do 5º dia, os parâmetros hematológicos melhoram a partir da segunda semana, e ao final o tamanho do baço apresenta redução de 40% ou mais (BRASIL, 2006a).

Cerca de 95% ou mais dos pacientes apresentam cura aparente, 5 a 10% não respondem ou morrem durante a terapia e 5 a 10% daqueles aparentemente curados apresentam recidiva, a maioria das vezes dentro de 6 meses após o final do tratamento (MURRAY et al., 2005).

2.5.1 Antimoniais pentavalentes

O antimoniato pentavalente de N-metilglucamina (Glucantime®) é utilizado no Brasil desde a década de 50 e permanece como tratamento inicial de escolha, sendo descrito 10% de resistência da doença para esta medicação no Brasil. Relatos indicam que na Índia e em outros países daquela região são registrados até 60% de resistência (PASTORINO et al., 2002; MELO, 2004).

A dose de antimoniato recomendada é de 20mg/kg/dia, via endovenosa (EV) ou intramuscular (IM), uma vez ao dia, por no mínimo 20 dias. Nos casos mais avançados, onde a resposta terapêutica não é evidente, o tempo deve ser estendido para 30 dias, ou no máximo 40 dias. O medicamento deve ser diluído em soro glicosado a 5% e a administração EV deve ser de no mínimo de 5 minutos (BRASIL, 2005; 2006a).

Pode causar reações graves e levar à morte se as reações adversas não forem identificadas e tratadas prontamente. As principais reações adversas graves descritas são: insuficiência renal, pancreatite, insuficiência hepática ou hepatite (OLIVEIRA et al., 2009).

2.5.2 Anfotericina B (desoxicolato sódico)

A anfotericina B é um antibiótico poliênico cujo uso para tratamento da leishmaniose é bioquimicamente racional; a droga altera a permeabilidade da membrana celular, causando poros que provocam extravasamento dos componentes intracelulares, alterando seu balanço iônico, o que resulta em morte celular (CROFT; COOMBS, 2003).

Atualmente estão disponíveis pelo Ministério da Saúde no Brasil duas apresentações: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal. A formulação desoxicolato é considerada o fármaco de primeira escolha no Brasil para tratamento de gestantes e pacientes graves (BRASIL, 2006b).

Na forma lipossomal são empregadas as formulações da anfotericina B incorporadas a partículas lipídicas artificiais ou lipossomos, que tornam os tratamentos mais curtos, sendo consideradas como drogas mais seguras. Permitem o uso diário de doses mais elevadas e são comprovadamente eficazes, com resultados de cura entre 90-95% (MURRAY, 2000; PASTORINO et al., 2002).

2.6 Prevenção da Leishmaniose Visceral

A LV é uma endemia de difícil controle no Brasil, não existindo medidas simples e eficazes de proteção. As medidas existentes visam aos diferentes elos do ciclo de transmissão, que são: o vetor, o reservatório e o homem (BRASIL, 2005).

Em certas localidades urbanas os flebotomíneos são encontrados dentro das residências nas quais muitas vezes existem cães soropositivos, sugerindo a transmissão intradomiciliar (OLIVEIRA A. G. et al., 2006; SILVA et al., 2008).

A profilaxia deve ser feita através do controle do reservatório canino, controle vetorial e detecção precoce de casos humanos. É de suma importância que os profissionais de saúde sejam capacitados para atuarem no reconhecimento e tratamento precoce da doença (QUEIROZ et al., 2004; REY et al., 2005).

2.7 Densidade parasitária

A determinação da densidade de parasitas através da microscopia, pela contagem de amastigotas, é um meio confiável e barato para avaliação da evolução da doença. Mesmo assim, existem poucos relatos de estudos de densidade parasitária durante o curso da LV em animais (GIUNCHETTI et al., 2006; GUERRA et al., 2009) ou em humanos (CHULAY; BRYCESON, 1983; MUELLER et al., 2007; SINGH et al.; 2010).

Alguns estudos em animais, principalmente em cães, têm avaliado a densidade parasitária em tecidos infectados, como pele, medula óssea, baço, e linfonodos. As pesquisas realizadas demonstram que esta tem fundamental importância em muitos aspectos, como na identificação de falhas da resposta do sistema imune à doença, na estimativa da infectividade da pele de animais, na correlação de características clínicas com a progressão da doença (LIMA et al., 2004; REIS et al., 2006a; GIUNCHETTI et al., 2008).

Um dos métodos que avalia a densidade parasitária em animais foi utilizado por Stauber em 1955. Nessa técnica, a densidade parasitária tem seu resultado expresso em LDU (Leshman Donovan Units/ Unidade de Leishmania Donovan). A LDU é determinada pela contagem microscópica de amastigotas de *Leishmania*, dividido por 1.000 núcleos de células, sendo o resultado multiplicado pelo peso do órgão (STAUBER, 1955; apud LIMA et al., 2004).

Esse método foi adaptado por Reis e colaboradores (2006a), que utilizaram apenas a contagem de amastigotas por 1.000 células nucleadas (REIS et al., 2006a; 2006b).

Chulay e Bryceson (1983) desenvolveram um método para análise quantitativa de amastigotas utilizando aspirados esplênicos em seres humanos.

Esses autores analisaram aspirados esplênicos de 89 pacientes com leishmaniose visceral em Nairóbi, no Kenya. A identificação da densidade parasitária foi realizada por meio de um logaritmo, descrevendo-se níveis de densidade variando de 0 a 6+.

O referido método foi empregado para o acompanhamento da resposta ao tratamento medicamentoso, através da verificação do decréscimo dos parasitas no decorrer deste, podendo indicar sua interrupção. Através desta técnica, os autores conseguiram demonstrar que quando a carga parasitária é elevada, a resposta ao tratamento é lenta ou pode ocorrer falha terapêutica.

Uma pesquisa feita no Sudão com a classificação desenvolvida por Chulay e Bryceson utilizou aspirados de linfonodos de pacientes com LV e também identificou o aumento da densidade parasitária relacionada a má resposta ao tratamento e possível resistência ao fármaco utilizado, sendo necessário o aumento da dose ou a troca do medicamento (MUELLER et al., 2007).

Recentemente, Singh et al. (2010) realizaram um estudo utilizando a densidade parasitária na medula óssea de crianças com LV como indicativo de cura da doença. A densidade parasitária foi realizada em três momentos distintos: ao término do tratamento, 1 mês e 6 meses após a medicação e desta forma, detectou-se a ocorrência de possíveis recidivas.

O método de quantificação da densidade parasitária descrito por Kumar et al. (2007) para ser utilizado em seres humanos é calculado de forma arbitrária, pela contagem dos parasitas por 10 campos consecutivos e utiliza a seguinte classificação: muitos parasitas: de 50 a 100 em 10 campos ou 2 a 3 macrófagos totalmente carregados; parasitas frequentes: 10 a 50 em 10 campos; poucos parasitas: 5 a 10 parasitas por 10 campos; raros parasitas: 1 a 2 parasitas em 10 campos.

Atualmente, métodos de biologia molecular, como a técnica de PCR quantitativo em tempo-real (real time PCR), uma variante da reação de PCR convencional, estão sendo testados para a determinação da carga parasitária em diferentes tecidos como sangue, pele, linfonodos, baço e medula óssea, com resultados significativos (CARVALHO, 2007; PEREIRA et al., 2008). A técnica é considerada uma ferramenta muito promissora para a detecção e quantificação de parasitas e representa um grande avanço no diagnóstico da LV (WENDY et al., 2007; QUARESMA et al., 2009). No entanto, esse método é sofisticado e não disponível em laboratórios clínicos convencionais.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo geral:

Analisar a densidade parasitária na medula óssea de crianças com leishmaniose visceral, relacionando-a com aspectos clínicos, laboratoriais e do tratamento.

3.2 Para alcance do objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) graduar a carga parasitária em lâminas de aspirado medular conforme a técnica de Chulay e Bryceson (1983);
- b) comparar a densidade parasitária com as características clínicas e laboratoriais registradas nos prontuários;
- c) relacionar a densidade parasitária à resposta ao tratamento medicamentoso.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Classificação da Pesquisa

Estudo quantitativo, descritivo, de caráter retrospectivo e documental em lâminas de aspirado medular de crianças com até 13 anos, portadoras de Leishmaniose Visceral, com coleta de dados secundários de prontuários clínicos.

4.2 Fonte de dados

No estudo foram analisados os dados secundários de crianças com até 13 anos de idade com diagnóstico confirmado de LV por exame de microscopia direta positiva em esfregaço delgado, atendidas no Serviço de Pediatria do Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU-UFMS), no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008.

A obtenção de dados clínicos e laboratoriais foi realizada nos prontuários dos pacientes participantes.

Para a quantificação da carga parasitária, procedeu-se à releitura das lâminas de esfregaço delgado de aspirado de medula óssea, confeccionadas por ocasião da admissão hospitalar das crianças; as mesmas foram analisadas no laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da UFMS.

Foram excluídos do estudo os seguintes casos: pacientes com lâminas de aspirado medular negativas à microscopia direta; pacientes que apresentavam microscopia direta positiva, porém, na leitura de 1000 campos, não apresentaram formas amastigotas detectadas e classificados como grau 0 (6); pacientes cujas lâminas de aspirado medular apresentavam problemas referentes à baixa qualidade dos esfregaços como coloração alterada, conservação inadequada, esfregaço muito grosso, áreas pigmentadas que impediam a realização da contagem de amastigotas e ausência de espículas (10); pacientes com prontuários que possuíam dados incompletos com relação à clínica, aos exames laboratoriais e ao tratamento medicamentoso (4); pacientes cujas lâminas de aspirado medular não estavam disponíveis (3). Co-morbidades não estavam presentes nos casos analisados pelo estudo.

4.3 Coleta de dados

4.3.1 Dados de Prontuários

Para a coleta de dados clínicos, laboratoriais e referentes ao tratamento foi elaborado um formulário especialmente desenvolvido para o estudo (Apêndice A).

Os dados clínicos analisados foram: sexo, idade, peso, tempo de evolução da doença desde o início dos primeiros sintomas até o diagnóstico; tamanho do baço e fígado à admissão; presença de edema e sangramento.

Os dados de desenvolvimento nutricional de crianças até 5 anos foram analisados através do gráfico de peso/idade do cartão da criança do Ministério da Saúde, que considera a seguinte classificação: entre os percentis 97 a 10, normalidade nutricional; entre os percentis 10 a 3: risco nutricional; abaixo do percentil 3: peso baixo com déficit do crescimento/desnutrição (BRASIL, 2002; 2007).

Os dados laboratoriais coletados foram: hemoglobina; leucócitos; plaquetas; albumina.

Os dados referentes ao tratamento abrangeram: o tratamento inicial, o tempo de tratamento com antimoniato ou a dose total de anfotericina B utilizada; a presença de recidiva. A análise da resposta ao tratamento com antimoniato foi baseada nos parâmetros praticados no Serviço de Pediatria: a) cura clínica inicial: aquela obtida pelos pacientes quando ao final da terapia estiveram sem febre, com diminuição da esplenomegalia de pelo menos 40% do valor inicial, melhora do estado geral e das provas laboratoriais; b) recidiva: quando houve reaparecimento de sintomas sugestivos e esplenomegalia e detecção de amastigotas em aspirado medular após a cura clínica inicial; c) cura clínica final: quando não houve retorno dos sinais e sintomas por um período de até 1 ano após o paciente ter sido considerado curado clinicamente.

4.3.2 Lâminas de esfregaço medular para a quantificação parasitária

As lâminas foram confeccionadas com material obtido por punção esternal, e mais raramente de crista ilíaca posterior, por ocasião da admissão dos pacientes.

Foram coradas pelo método de Giemsa, conforme protocolo do setor de Parasitologia do Departamento de Patologia da UFMS e analisadas por microscopia óptica em objetiva de 100x com óleo de imersão.

A releitura das mesmas foi realizada por um único profissional com experiência no assunto.

No Laboratório de Parasitologia da UFMS são rotineiramente confeccionadas 4 lâminas de esfregaço delgado por paciente. Essas lâminas foram analisadas para a escolha de apenas uma, a empregada no estudo. Os critérios utilizados para a seleção da lâmina a ser analisada foram: presença de espícula, boa coloração, esfregaço fino e homogêneo.

Para o registro dos dados foi utilizado um formulário desenvolvido especialmente para a quantificação da carga parasitária, com 1.000 campos a serem preenchidos com o total de amastigotas encontradas durante a leitura (Apêndice B).

A densidade parasitária foi classificada de acordo com o método de Chulay e Bryceson (1983): grau 6+, > 100 parasitas por campo; grau 5+, 10 a 100 parasitas por campo; grau 4+, 1 a 10 parasitas por campo; grau 3+, 1 a 10 parasitas por 10 campos; grau 2+, 1 a 10 parasitas por 100 campos e grau 1+, 1 a 10 parasitas por 1.000 campos.

Pesquisou-se também o número de campos analisados até que a primeira forma amastigota fosse encontrada.

4.4 Técnica de Análise dos dados

Após a coleta de dados os mesmos foram organizados e analisados utilizando-se os programas *Microsoft Office Excel* (2003), *Epi Info* versão 3.4.3 (CDC, 2007) e *Bioestat* 5.0 (AYRES et al., 2007).

Foram utilizados os testes de análise de variância: teste não paramétrico de Kruskal Wallis, a posteriori teste de Student-Newman-Keuls para comparar três ou mais amostras independentes e o Teste de Mann Whitney para comparar duas amostras independentes. A significância estatística foi definida como 5% ($p = 0,05$).

4.5 Aspectos Éticos da pesquisa

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e foi aprovado com o protocolo nº 1350 (Anexo B).

5 RESULTADOS

Participaram do estudo 109 crianças. Destas 59 (54,1%) eram do sexo masculino e 50 (45,9%) do sexo feminino. A idade variou de 4 meses a 13 anos, sendo que a média (m) da faixa etária situou-se em torno de 3,5 anos. Setenta e oito crianças tinham até 5 anos de idade (71,5%). O tempo de evolução da doença variou de 2 a 240 dias (m= 28,5 dias).

À admissão, as crianças apresentavam baço palpável de 2 cm até 18 cm (m= 7,0 cm) e fígado variando de não palpável a 9 cm (m= 4,0 cm).

Treze apresentaram edema e 5 apresentaram sangramento.

Quanto aos exames laboratoriais, a dosagem de hemoglobina variou de 4,6 g/dL a 10,8 g/dL (m= 7,0 g/dL); a contagem de leucócitos, de 1.200 céls/mm³ a 12.500 céls/mm³ (m= 4.000 céls/mm³); as plaquetas variaram de 12.000 céls/mm³ a 320.000 céls/mm³ (m= 83.000 céls/mm³) e a dosagem de albumina variou de 1,3 g/dL a 4,1 g/dL (m= 2,7 g/dL).

Cento e dois (93,5%) foram inicialmente tratados com antimoniato de N-metilglucamina. O tempo de tratamento com antimoniato variou de 20 a 40 dias. Dos 102 pacientes que utilizaram inicialmente antimoniato, a cura clínica inicial foi obtida em todos os casos (100%). Seis crianças (5,8%) apresentaram recidivas até 1 ano após o tratamento, obtendo-se uma cura final de 94,1%.

Sete (6,4%) pacientes receberam anfotericina B inicialmente, por apresentarem sinais de gravidade à admissão ou recidiva de quadro tratado anteriormente: menores de 6 meses (4) todos apresentavam desnutrição; edema generalizado (1); sangramento (1); recidiva (1). A dose total de anfotericina B utilizada foi de 20 mg/kg, conforme protocolo do Ministério da Saúde.

As figuras a seguir mostram formas amastigotas em aspirado medular de crianças com LV, em diferentes graus de parasitismo.

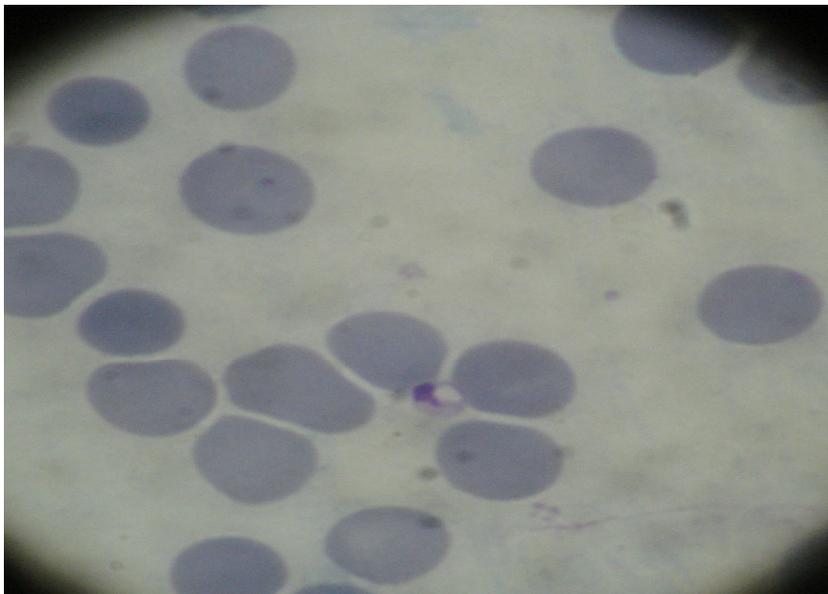


Figura 1: Forma amastigota de *Leishmania* em esfregaço delgado de aspirado medular em criança com LV, correspondente ao grau 1+ da classificação de Chulay e Bryceson (1983). Coloração Giemsa, aumento 1000x.

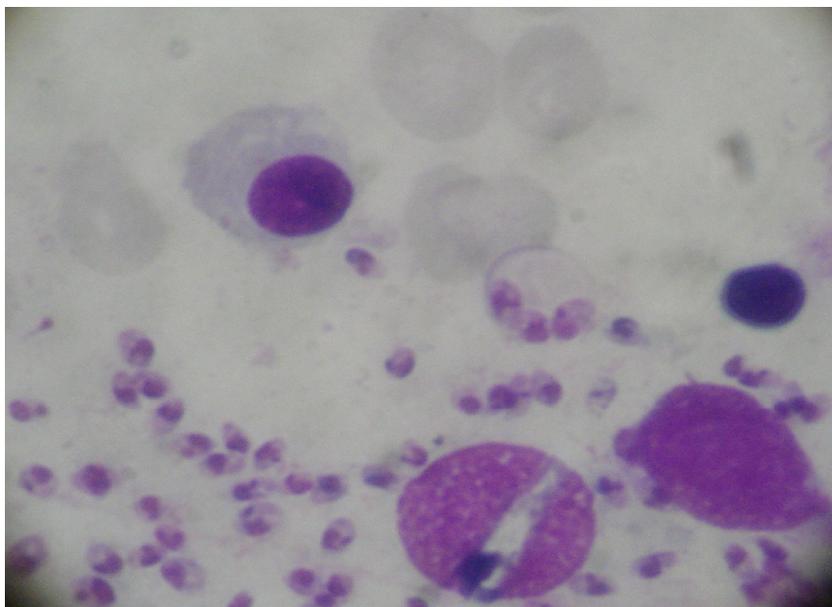


Figura 2: Forma amastigota de *Leishmania* em esfregaço delgado de aspirado medular em criança com LV, correspondente ao grau 4+ da classificação de Chulay e Bryceson (1983). Coloração Giemsa, aumento 1000x.

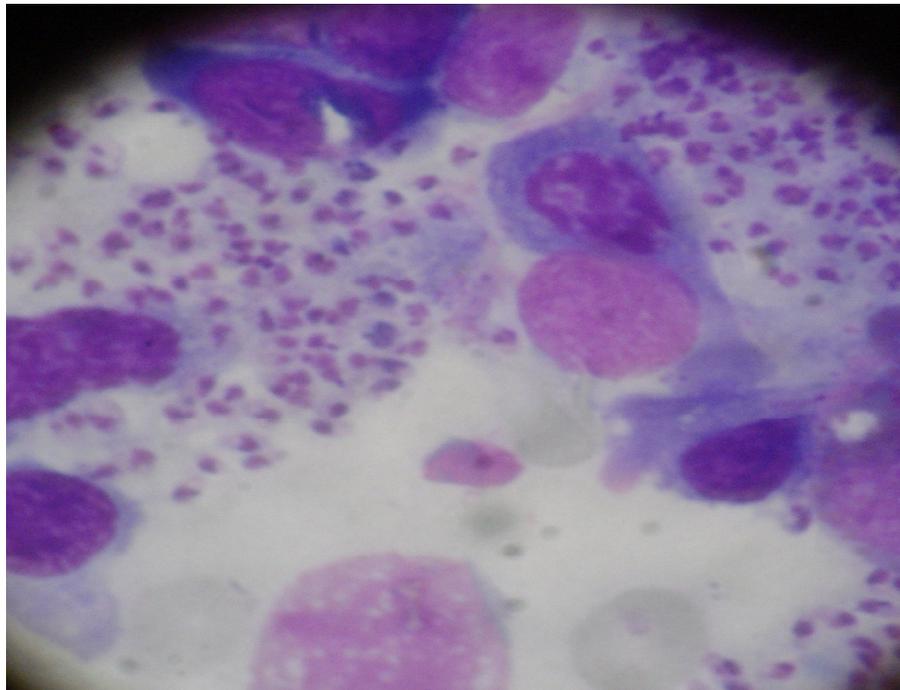


Figura 3: Forma amastigota de *Leishmania* em esfregaço delgado de aspirado medular em criança com LV, correspondente ao grau 5+ da classificação de Chulay e Bryceson (1983). Coloração Giemsa, aumento 1000x.

A Tabela 1 mostra a classificação da densidade parasitária encontrada nas crianças do estudo.

Tabela 1 – Número e porcentagem de crianças com leishmaniose visceral segundo a densidade parasitária em aspirado medular, NHU- UFMS, 2000 a 2008

Classificação	Nº	%
1+	29	26,6
2+	39	35,8
3+	21	19,3
4+	12	11,0
5+	8	7,3
Total	109	100

A maioria das crianças (62,4%) apresentou densidade parasitária classificada em graus 1+ e 2+.

Durante a análise das lâminas, para o encontro das primeiras formas amastigotas foi necessário em média a leitura de 96 campos (mínimo = 1 e máximo = 969). Em quinze casos foi necessária a análise de mais de duzentos campos para

se encontrar a primeira forma amastigota (15/109=13,8%); destes, 14 apresentaram densidade parasitária classificada em 1+ e uma lâmina apresentava densidade 2+.

Na Tabela 2 está descrita a densidade parasitária relacionada às características clínicas das crianças do estudo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a densidade parasitária e as variáveis: sexo, idade, tempo de evolução da doença, tamanho do fígado à admissão, edema e sangramento.

As crianças com baço palpável acima de 10 cm à admissão apresentaram maior densidade parasitária ($p=0,021$).

Tabela 2 – Estatística descritiva dos valores da densidade parasitária segundo características clínicas de crianças com leishmaniose visceral, NHU-UFMS, 2000 a 2008 (n = 109)

Variáveis	N (%)	Densidade Parasitária			p
		Mediana	Média	Desvio Padrão	
Sexo					
Feminino	50 (45,9)	2,0	2,4	1,2	0,501
Masculino	59 (54,1)	2,0	2,3	1,2	
Idade (anos)					
< 1	16 (14,7)	2,0	1,9	0,9	0,369
1 a 3	51 (46,8)	2,0	2,4	1,2	
4 a 6	25 (22,9)	2,0	2,7	1,4	
7 a 9	14 (12,8)	2,0	2,4	1,1	
10 a 13	3 (2,8)	2,0	2,0	1,0	
Tempo de evolução (dias)					
< 15	65 (59,6)	2,0	2,2	1,1	0,252
16 a 30	21 (19,3)	2,0	2,2	1,2	
> 30	23 (21,1)	3,0	2,7	1,2	
Fígado (cm)					
Não palpável	5 (4,6)	3,0	2,8	0,8	0,363
< 3	16 (14,7)	2,0	2,2	1,0	
3 – 6	78 (71,6)	2,0	2,3	1,3	
> 6	10 (9,2)	2,5	2,7	0,9	
Baço (cm)					
< 5 ^a	12 (11,0)	2,0	2,1	1,2	0,021
5 – 10 ^a	78 (71,6)	2,0	2,2	1,1	
> 10 ^b	19 (17,4)	3,0	3,1	1,4	
Edema					
Sim	13 (11,9)	3,0	2,5	1,2	0,494
Não	96 (88,1)	2,0	2,3	1,2	
Sangramento					
Sim	5 (4,6)	2,0	1,8	0,8	0,324
Não	104 (95,4)	2,0	2,4	1,2	

Nota: Teste Kruskal Wallis a posteriori Teste de Student-Newman-Keuls. Teste de Mann Whitney a nível de significância de 5%. Letras diferentes significam que há diferença estatisticamente significativa.

A Tabela 3 mostra a relação da densidade parasitária com o desenvolvimento nutricional de 78 crianças com idade até 5 anos.

Tabela 3 – Estatística descritiva dos valores da densidade parasitária segundo curva de desenvolvimento nutricional de crianças até 5 anos de idade com leishmaniose visceral, NHU- UFMS, 2000 a 2008 (n = 78)

Curva de desenvolvimento nutricional	N (%)	Mediana	Média	Desvio Padrão	p
Normalidade nutricional ^a	29 (34,0)	2,0	1,9	1,0	
Risco nutricional ^b	34 (50,0)	2,0	2,7	1,4	0,013
Peso baixo/desnutrição ^b	15 (16,0)	3,0	2,7	1,1	

Nota: Teste Kruskal Wallis a posteriori Teste Student-Newman-Keus. Nível de significância de 5%. Letras diferentes significam que há diferença estatisticamente significativa.

As crianças que apresentavam risco nutricional ou peso baixo/desnutrição à admissão possuíam maior densidade parasitária ($p=0,013$).

A Tabela 4 mostra a relação da densidade parasitária com os valores dos exames laboratoriais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a densidade parasitária e os valores laboratoriais de hemoglobina, leucócitos, plaquetas e albumina.

Tabela 4 - Estatística descritiva dos valores da densidade parasitária segundo características laboratoriais de crianças com leishmaniose visceral, NHU- UFMS, 2000 a 2008

Variáveis	n	N (%)	Densidade parasitária			p
			Mediana	Média	Desvio Padrão	
Hemoglobina (g/dl)	109					
< 5		4 (3,7)	2,0	2,0	0,8	0,831
5 – 10		103 (94,5)	2,0	2,4	1,2	
> 10		2 (1,8)	2,0	2,0	1,4	
Leucócitos (cél/mm ³)	109					
< 3.000		28 (25,7)	2,0	2,8	1,2	0,145
3.000 – 5.000		55 (50,5)	2,0	2,3	1,2	
> 5.000		26 (23,9)	2,0	2,2	1,1	
Plaquetas (cél/mm ³)	109					
< 50.000		17 (15,6)	2,0	2,1	1,0	0,209
50.000 – 150.000		80 (73,4)	2,0	2,5	1,2	
> 150.000		12 (11,0)	2,0	2,0	1,2	
Albumina (g/dL)	106					
1,5 a 3,5		95 (89,6)	2,0	2,4	1,2	0,541
>3,5		11 (10,4)	2,0	2,2	1,3	

Nota: Teste Kruskal Wallis a posteriori Teste de Student-Newman-Keuls. Teste de Mann Whitney a nível de significância de 5%. Letras diferentes significam que há diferença estatisticamente significativa.

Na Tabela 5 está descrita a relação da densidade parasitária com o tratamento medicamentoso utilizado nas crianças com LV.

Tabela 5 - Estatística descritiva dos valores da densidade parasitária segundo características do tratamento medicamentoso de crianças com leishmaniose visceral, NHU- UFMS, 2000 a 2008

Variáveis	N(%)	Densidade parasitária			p
		Mediana	Média	Desvio Padrão	
Tratamento inicial					
Antimoniato ^a	102/109 (93,5)	2,0	2,3	1,2	0,025
Anfotericina B ^b	7/109 (6,5)	3,0	3,3	1,0	
Tempo de tratamento com antimoniato (dias)					
Até 28 ^a	82/102 (80,4)	2,0	2,1	1,0	<0,001
29 a 40 ^b	20/102 (19,6)	3,0	3,3	1,3	
Recidiva					
Não	103 (94,5)	2,0	2,3	1,2	0,102
Sim	6 (5,5)	3,0	3,2	1,3	

Nota: Teste de Mann Whitney a nível de significância de 5%. Letras diferentes significam que há diferença estatisticamente significativa.

As crianças que receberam tratamento inicial com anfotericina B apresentaram maior densidade parasitária à admissão ($p=0,025$).

Todos as crianças que utilizaram anfotericina B receberam uma dose total de 20 mg/kg. Como o número de pacientes é pequeno (apenas 7) e não houve utilização de dose superiores a 20 mg/kg, não foi possível uma análise da adequação dessa dose no tratamento.

Aquelas que necessitaram de tratamento com antimoniato de N-metilglucamina por período acima de 28 dias, apresentaram maior carga parasitária à admissão ($p<0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a densidade parasitária e a ocorrência de recidivas.

Crianças altamente parasitadas (grau 5+) geralmente necessitaram tratamento com antimoniato por 40 dias. De 7 pacientes que utilizaram inicialmente antimoniato, 4 necessitaram receber tratamento por 40 dias. Dos 3 pacientes que foram tratados por até 28 dias, um apresentou recidiva; outra criança que apresentava densidade parasitária 5+ já havia recebido antimoniato de N-metilglucamina por 28 dias em outro serviço e também apresentou recidiva, o que indica que estas provavelmente necessitavam ser tratadas por mais tempo, já que as recidivas geralmente estão associadas a tratamentos incompletos.

No estudo, nenhuma das crianças evoluiu para o óbito.

6 DISCUSSÃO

Pesquisas com animais (GUERRA et al., 2009) e com seres humanos (CHULAY e BRYCESON, 1983; MUELLER et al., 2007; SINGH et al., 2010) ressaltam a grande importância de estudos quantitativos da carga parasitária em diferentes tecidos, pois sua avaliação pode contribuir como uma ferramenta adicional para a compreensão de parâmetros imunológicos, clínicos e terapêuticos.

A maioria das crianças do estudo apresentou um grau de parasitismo medular não muito elevado, classificado em graus 1+ e 2+; em torno de 80% delas exibiram uma densidade parasitária classificada até o grau 3+. Esses dados poderiam explicar a boa resposta ao tratamento com antimoniato de N-metilglucamina apresentada pelas crianças do estudo (94,1%), somando-se a outros fatores que têm sido relacionados à boa resposta ao antimoniato de N-metilglucamina em crianças brasileiras, como o tratamento de pacientes a maioria sem doença grave e o estabelecimento vigoroso de medidas suportivas (uso de antibióticos, correção de anemias e plaquetopenias severas e disponibilidade de serviço de terapia intensiva para o tratamento de complicações infecciosas e hemorrágicas mais graves) (BRUSTOLONI et al., 2010).

A releitura das lâminas para a classificação da densidade parasitária permitiu ressaltar um importante aspecto relativo à sensibilidade do exame parasitológico no diagnóstico da LV, no que diz respeito ao número de campos indicados para a leitura. Em 2006 o Ministério da Saúde recomendava a leitura de 200 campos antes de se indicar um esfregaço como negativo (BRASIL, 2006 a) e a leitura de 1200 campos para pacientes graves (BRASIL, 2006 b). De fato, foi necessário o exame de em média 96 campos para o encontro das primeiras formas amastigotas, no entanto, se apenas 200 campos tivessem sido analisados, o diagnóstico não teria sido realizado em 13,8% dos casos. Esses dados confirmam que muitas vezes o encontro das formas amastigotas pode ser difícil, sendo imprescindível a leitura de mais de 200 campos quando aí não se detecta parasitas.

A maior densidade parasitária encontrada correspondeu à classificação 5+ de Chulay e Bryceson (1983). Esses autores demonstraram graus de parasitismo de até 6+ em pacientes com leishmaniose visceral, no entanto, utilizaram aspirado esplênico, enquanto que no presente estudo foi avaliada a carga parasitária em

aspirado medular. De fato, o baço apresenta maior grau de parasitismo que a medula óssea ou linfonodos (ZIJLSTRA et al., 1992).

Mueller et al., (2007), empregando a mesma classificação em aspirado de linfonodos, aponta a presença de densidade 6+ apenas em pacientes coinfectados por HIV ou portadores de tuberculose pulmonar.

Crianças com baço maior que 10 cm à admissão apresentaram maior densidade parasitária que aquelas com baço menor. O baço é apontado como o principal sítio de células linfóides para a corrente sanguínea, abrigando também uma grande quantidade de antígenos circulantes. Recentes estudos em cães demonstram que o baço apresenta mais elevado parasitismo quando a LV está em curso (REIS et al., 2006b; GUERRA et al., 2009).

Crianças que apresentavam risco nutricional ou peso baixo demonstravam densidade parasitária mais elevada à admissão. Não foram encontrados outros estudos que tenham explorado essa relação. Em geral se aceita que o estado nutricional do hospedeiro está diretamente relacionado à susceptibilidade às doenças infectoparasitárias e que a desnutrição constitui um fator de risco para a leishmaniose (HIDA et al., 1999). Contudo, os mecanismos envolvidos na relação entre desnutrição e o curso da LV são múltiplos e pouco explicados (MALAFAIA, 2009). Estes dados denotam perspectivas para a realização de novas pesquisas que possam estudar melhor esse aspecto.

O estudo não revelou relação entre carga parasitária mais elevada e parâmetros clínicos mais severos ou alterações laboratoriais mais graves, o que denota que provavelmente outros fatores, como o tempo de evolução mais prolongado ou a resposta imunológica do hospedeiro, estão implicados na gravidade da doença.

Crianças inicialmente tratadas com anfotericina B exibiam densidade parasitária mais elevada do que as tratadas com antimoniato de N-metilglucamina; essa relação provavelmente ocorreu porque a maioria desses pacientes eram desnutridos e, conforme já demonstrado, aqueles com risco nutricional ou peso baixo também demonstravam densidade parasitária mais elevada. No entanto, esses dados são difíceis de serem analisados, pois o número de crianças que utilizou anfotericina B foi pequeno.

Até 2005, todas as crianças recebiam antimoniato como primeira escolha terapêutica, independente de sua condição clínica inicial. Somente a partir de 2006,

o Ministério da Saúde brasileiro lançou normas técnicas indicando o uso de anfotericina B para o tratamento de pacientes graves: idade inferior a 6 meses, desnutrição grave, comorbidades, infecções bacterianas, icterícia, hemorragia, edema generalizado e toxemia (BRASIL, 2006b). Isso justifica porque nem todas as crianças graves utilizaram anfotericina B para tratamento.

Pacientes que utilizaram antimoniato de N-metil glucamina por períodos mais prolongados de tempo (mais de 28 dias, geralmente 40 dias) apresentaram maior densidade parasitária do que os tratados por períodos menores de tempo (até 28 dias) (mediana=grau 3+). No entanto, as crianças que receberam tratamento prolongado foram aquelas que se encontravam altamente parasitadas (grau 5+). Esses dados têm valor porque a extensão do tempo de tratamento deu-se com a ausência do conhecimento da densidade parasitária à admissão; o prolongamento da terapêutica foi realizado nos casos em que ao final de 28 dias de terapêutica não se obteve a cura inicial.

Os resultados sugerem que no caso de pacientes com carga parasitária elevada (5+), o tratamento mais prolongado (até 40 dias, para pacientes utilizando antimoniato) pode ser necessário.

Desde 1983, Chulay e Bryceson já haviam relatado que a resposta lenta ao tratamento com antimonial pentavalente (estibogluconato) está ligada à densidade parasitária aumentada. Mais recentemente, Mueller et al. (2007), utilizando anfotericina B lipossomal para o tratamento de pacientes com LV complicada ou nos casos de recidiva após o uso de estibogluconato, detectaram que a persistência parasitária e falência clínica após tratamento foram associados à maior densidade parasitária à admissão, sugerindo que estes pacientes poderiam necessitar de medicação por tempo mais prolongado.

A determinação da carga parasitária em crianças com LV antes do início do tratamento pode auxiliar na decisão do período de tempo em que este deve ser realizado. Novos estudos prospectivos são necessários para complementar este relato inicial.

7 CONCLUSÕES

- O estudo da densidade parasitária em crianças com LV permitiu detectar que maioria delas exibiu grau de parasitismo medular não muito elevado. Este é mais um dado que poderia explicar a boa resposta ao tratamento com antimoniato de N-metilglucamina, somando-se a outros fatores já relatados como responsáveis pela resposta terapêutica satisfatória aos antimoniais.
- A necessidade de ser ampliado o número de campos na leitura das lâminas de esfregaço medular para o diagnóstico da LV, pois se tivessem sido analisados apenas 200 campos 13,8% dos casos, ficariam sem diagnóstico e análise da densidade parasitaria.
- Crianças menores de cinco anos com risco nutricional ou peso baixo apresentaram densidade parasitária mais elevada do que crianças sem risco nutricional à admissão. Esse aspecto necessita ser mais bem investigado em estudos posteriores.
- A quantificação da carga parasitária permitiu a melhor compreensão de importantes aspectos relacionados ao tratamento medicamentoso na LV, pois detectou-se carga parasitária mais elevada nos casos que necessitaram de tempo de tratamento mais prolongado com antimoniato de N-metilglucamina.
- A classificação da densidade parasitária nas crianças do estudo possibilitou a identificação de pacientes altamente parasitados. Os resultados sugerem que no caso de pacientes com carga parasitária elevada (5+), o tempo de tratamento pode ser mais prolongado (acima de 20 dias, para aqueles utilizando antimoniato de N-metilglucamina) para que ocorra a obtenção da cura clínica.
- A determinação da carga parasitária em crianças antes do início do tratamento permite a identificação do grau de parasitismo podendo auxiliar na decisão do tempo satisfatório de tratamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em decorrência do exposto no estudo, faz-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas envolvendo a densidade parasitária em pacientes com LV.

É necessária a melhor elucidação de outros aspectos referentes à densidade parasitária, como sua relação com diferentes fases do tratamento medicamentoso; sua implicação com a resposta imune do hospedeiro; sua relação com as alterações decorrentes do estado nutricional.

Talvez novas respostas possam trazer a elucidação de problemas relativos à leishmaniose visceral tanto nas crianças como em adultos, nas várias localidades nas quais a doença ainda faz vítimas e preocupa profissionais e autoridades de saúde.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, B. B.; OLIVEIRA, C. I.; BRADSKYN, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Role of sand fly saliva in human and experimental Leishmaniasis: current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, Bergem, v. 66, p.122-127, may. 2007.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, n. 2, p. 145-146, apr./june, 1996.

ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; COTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; PEDRAS, M. J.; SOARES, V. Y. R.; BARRAL, A. M. P.; BIÁ, M.; SIQUEIRA, I. C.; CALDAS, A. J. M.; COSTA, C. H. N.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Validation of the rapid immunochromatographic test it-leish, for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, n.2, p. 107-116, abr./jun, 2008.

AYRES, M.; AYRES JR., M. A.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. S. Bioestat – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas versão 5.0. Belém: Sociedade Civil Mamiraúá, MCT-CNPQ, 2007.

BAIN, B. J. Bone marrow aspiration. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 54, p 657-663, sep. 2001.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, fev. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da Criança: acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006 a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006 b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Básica. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Caderneta da Saúde da Criança**. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRUSTOLONI, Y. M.; LIMA, R. B.; CUNHA, R. V.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L.; PIRMEZ, C. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 497-500, may. 2007.

BRUSTOLONI, Y. M.; CUNHA, R. V.; CÔNSOLO, L. Z.; OLIVEIRA, A. L.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T. Treatment of visceral leishmaniasis in children in the Central-West Region of Brazil. **Infection**, may. 2010 [Epub ahead of print].

CARVALHO, C. C. **Determinação da carga parasitária por PCR semiquantitativa em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e sua associação com sinais clínicos da doença.** 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2007.p. 50-55.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). EPI INFO™, version 3.4.3: program for use by public health professional. Atlanta: CDC, out. 2007.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 873-882, nov. 2007.

CHULAY, J. D.; BRYCESON, A. D. M. Quantification of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 475-479, may. 1983.

COURA, J. R. In: COURA, J. R. (Org) Leishmaniose visceral. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 28-31.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 19, n. 11, p. 505-508, nov. 2003.

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

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, sep. 2004.

DI CARLI, G. A.; TASCA, T. **Métodos e técnicas para a identificação de parasitos do sangue.** In: DI CARLI, G. A. Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas, 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

DIETZE, R. **Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral**. In: Informe final de la reunión de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 2006, p. 63-65.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission on visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 25, p: 1240-1242, nov. 1997.

DIRCH, J.; MACIEL, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, n. 4, p. 391-395, july. 2003.

FAYZY, M. A. H.; FANID, L. M.; FAYZI, A. A. H.; POUR, M. A. M.; FARAJNIA, S.; NAKHALBAND, A.; Detection of *Leishmania infantum* minicircle kinetoplast DNA in bone marrow and peripheral blood samples of paediatric patients from children`s Hospital of Tabriz Medical University. **Biotechnology**, New York, v. 7, n. 2, p. 175-181, 2008.

FRAGA, T. L.; BRUSTOLONI, Y. M.; LIMA, R. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, A. L. L.; PIRMEZ, C. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n.3, p. 110-113, may. 2010.

GALATI, E. A.; NUNES, V. L.; REGO JÚNIOR F. A.; OSHIRO E. T.; CHANG M. R. Study of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 378-390, ago. 1997.

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M. MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, n. 121, p. 23-33. july. 2008.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; OLIVEIRA-CORRÊA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 135, n. 2-3, p.100-107, aug./oct. 2006

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects . **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n.3, p. 338-349, set. 2004.

GRADONI, L.; GARMICCIA, M.; SCALONE, A. Visceral leishmaniasis treatment, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 12, p. 1617-1620, dec. 2003.

GUERRA, L. L.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MARTINA FILHO, O. A.; REIS, A. B.; CORRÊA-OLIVEIRA R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, Berlin, n. 104, p. 611-622, nov. 2009.

HIDA, M.; MOUANE N.; ETTAIR S.; ERREIMI N.; MALIHY A.; AGOUMI; A.; BOUCHTA, F. Visceral leishmaniasis and malnutrition: a case report - Leishmaniose viscérale et malnutrition: à propos d'une observation. **Archives de Pédiatrie**, Paris, v.6, n. 3 p.290-292, mars.1999.

HIDE, N.; SINGH, R.; KUMAR B. B.; BAÑULS, A. L.; SUNDAR, S. A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, Basel, n. 102, p. 197-200, may. 2007.

KAFETZIS, D. A.; MALTEZOU, H.C. Visceral leishmaniasis in pediatrics. **Current Opinion Infectious Diseases**, London, v.15, n.3, p. 289-294, 2002.

KNOWLES, S.; HOFFBRAND, A. V. Bone marrow aspiration and trephine biopsy. **British Medical Journal**, London, p. 280-281, july. 1980.

KUMAR, P. V.; VASEI, M.; SADEGHIPOUR, A.; SADEGHI, E.; SOLEIMANPOUR, H.; MOUSAVI, A.; TABATABAEI, A. H.; RIZVI, M. M. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, New York, v. 29, n. 2, p. 77-80, feb. 2007.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, n.1, p 43-53, sep. 2004.

LUZ, K. G.; SUCCI, R. C. M.; TORRES, E. Vitamin A serum level in children with visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 4, p. 381-384, jul/ago. 2001.

MALAFAIA, G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n.10 p. 587-596, oct. 2009.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, nov. 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; SABROZA, P. C.; TOLEDO, L. M.; MARZOCHI, K. B. F.; TRAMONTANO, N. C.; FILHO, F. B. R. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro – Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 5-15, jan/mar, 1985.

MEDEIROS, S. F.; TAVARES-NETO, J.; OLIVEIRA JUNIOR, A. D.; PARANÁ, R. Alteraciones hepáticas en la Leishmaniasis Visceral (kalazar) em niños: revision sistemática de la literatura. **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 37, n. 3, p. 150-157, sept. 2007.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n.1, p. 31-45, jan/mar. 2004.

MICROSOFT Office Excel 2003 SP3, versão 7: Microsoft Corporation, 2003. Parte do produto Microsoft Office Professional.

MUELLER, M.; RITMEIJER, K.; BALASEGARAM, M.; KOUMMUKI, Y.; SANTANA, M. R.; DAVIDSON, R. Unresponsiveness to ambisome in some sudanese patients with kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 101, p. 19-24, jan. 2007.

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

MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. **International Journal Infectious Diseases**, Hamilton, v. 4, n. 3, p. 158-77, 2000.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, oct./nov. 2005.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G. R.; ESPINDOLA, I. A. C.; DORVAL, M. E. C., BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p.869-874, dez. 2006.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R. B.; SANCHES, M.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 5, p. 446-450, set./out. 2006.

OLIVEIRA, A. L. L.; BRUSTOLONI, Y. M.; FERNANDES, T. D.; DORVAL, M. E. C.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. **Tropical Doctor**, London, v. 39, n. 3, p 180-182, july. 2009.

OLIVEIRA, F.; LAWYER, P. G.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-leishmania immune response towards protection or exacerbation of disease. **Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 2, p. 1-9, april. 2008.

OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 2, p.188-193, mar./abr. 2010.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p.120-127, mar./abr. 2002.

PEDROSA, C. M. S.; ROCHA, E. M. M. Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 4, p. 300-304, jul-ago, 2004.

PEREIRA, S. R. F.; CARVALHO, C. C.; SILVA, M. H.; CASTELO BRANCO, P. A.; NASCIMENTO, F. R. F.; REBELO, J. M. M.; GOULART, L. R. Determinação da carga parasitária em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* por PCR quantitativa. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética. **Resumos...** Salvador: Othon Palace Hotel, 2008, p. 273.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. (Ed.) **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 713-737.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M. F.; FERREIRA, E. C.; ROCHA-LIMA, A. C. V. M.; XAVIER, A. A. P.; GONTIJO, C. M. F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RLF and quantifications of parasite DNA by real-time PCR. **Acta tropica**, Basel, n. 111, p. 29-294, may. 2009.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 2, p.141-146, mar./apr. 2004.

REIS, A. B; MARTINS FILHO, O. A.; TEIXEIRA CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MARYRINK, W.; SILVA, F.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; OLIVEIRA, R.C. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, n.1, p.68-75, nov. 2006a.

REIS, A. B; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, L.L.; GUERRA, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v.146, n.2, p. 303-311, nov. 2006b.

REY, L. C. ; MARTINS, C. V.; RIBEIRO, H. B.; LIMA, A. A. M. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 81, n.1, p. 73-78, jan. 2005.

REY, L. O complexo "*Leishmania donovani*" e a *Leishmaníase* Visceral. In: REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 29, p. 396-410.

RIGO, R. S.; RIGO, L.; HONER, M. R. Clinical and laboratory aspects in American Visceral Leishmaniasis. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 31, n.1, p. 48-54, jan. 2009.

ROHOUSOVÁ, I. VOLF, P. Sandy fly saliva: affects on host immune response and Leishmania transmission. *Folia Parasitologica*, Ceske Budejovice, v. 53, n. 3, p. 161-171, sep. 2006.

SILVA, E. A.; ANDREOTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, New York, v. 119, n.3, p. 343-348, mar. 2008.

SINGH, U. K.; PRASAD, R.; JAISWAL, B. P.; SINGH, P. K.; THAKUR, P.; Amphotericin B therapy in children with visceral leishmaniasis: daily vs. alternate day, a randomized trial. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 11, jan. 2010.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Bethesda, v. 9, n. 5, p. 951-958, sep. 2002.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 292, n.1-2, p.17-23, sep. 2004.

TOTAN, M.; ALBAYRAK, D. Childhood visceral leishmaniasis: a review of 30 cases. **Gazi Medical Journal**, Turkey, v. 12, p. 151-154, 2001.

WENDY VAN DER, M.; GUERRA, J.; SHOONE, G.; FARENHORST, M.; COELHO, L.; FABER, W.; SHCALLING, H. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania*. **Parasites, Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 73-78, oct. 2007.

WERNECK, L. G.; Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 644-645, abr. 2010.

XAVIER-GOMES, L. M.; COSTA, W. B.; PRADO, P. F.; OLIVEIRA-CAMPOS, M.; LEITE, M. T. S. Clinical and epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis in children hospitalized at a reference university hospital in the north of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 549-555, dez. 2009.

ZIJLSTRA, E. E.; ALI, M. S.; EL-HASSAN, A.M. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 86, n.5, p. 505-507, sep.1992.

**APÊNDICE A – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS EM PRONTUÁRIOS,
REFERENTE AOS ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DO
TRATAMENTO.**

**FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS EM PRONTUÁRIOS.
DADOS CLÍNICOS, EXAMES LABORATORIAIS E DO TRATAMENTO.**

I – Dados gerais:

- 1 - Nº _____ RG - NHU _____ RG: Parasitologia: _____
 2- Sexo: () M () F
 3 - Idade _____ (meses) 4 - Peso: _____
 5 - Data da internação _____
 6 - Alta: _____
 7 - Primeiro tratamento: () sim () não

II- Características clínicas:

- 8 - Tempo de evolução (em dias): _____
 9 - Edema: () MMII () Face () Generalizado () Ascite
 10 - Sangramentos: () nasal () gengival () locais de punção () outros

 11- Tamanho do fígado na admissão: _____
 12- Tamanho do baço na admissão: _____

III- Tratamento

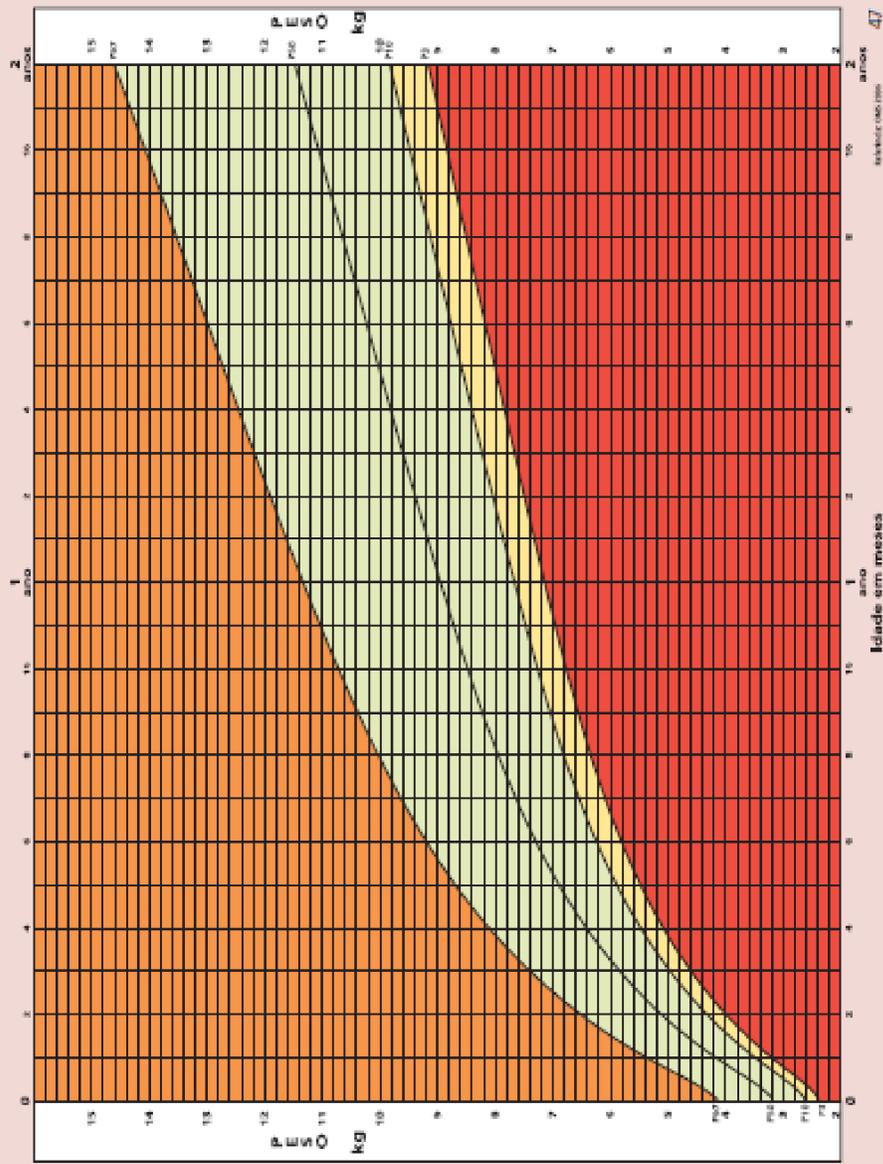
- 13 - Tratamento inicial: () glucantime () anfotericina b
 14 - Tratamento utilizado:
 14.1 - Glucantime () Tempo de tratamento (dias) _____
 14.2 - Anfotericina b () Tempo de tratamento (dose total) _____
 15- Recidiva: () sim () não
 16- Alta hospitalar:
 () curado () óbito
 17 - Exames laboratoriais na admissão:

Data/ valores			
Hg			
Leucócitos			
Plaquetas			
Albumina			

**APÊNDICE B – FORMULÁRIO PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA
PARASITÁRIA**

ANEXO A – CURVA DE CRESCIMENTO PESO/IDADE PARA ANÁLISE DE DESENVOLVIMENTO NUTRICIONAL – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006.

GRÁFICO DE PESO X IDADE - DE 0 A 2 ANOS



**ACOMPANHE
TAMBÉM A SAÚDE
DE SUA FILHA PELO
GANHO DE PESO**

- **Ótimo**
Sua filha está com o peso ideal.
- **Atenção**
Sua filha está um pouco abaixo do peso ideal.
- **Cuidado**
Sua filha está com o peso acima do ideal.
- **Cuidado**
Sua filha está com o peso muito abaixo do ideal.

**OBSERVE A LINHA
DE SUA FILHA**

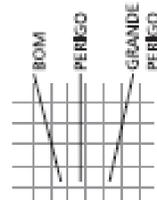


GRÁFICO DE PESO X IDADE - DE 2 A 5 ANOS

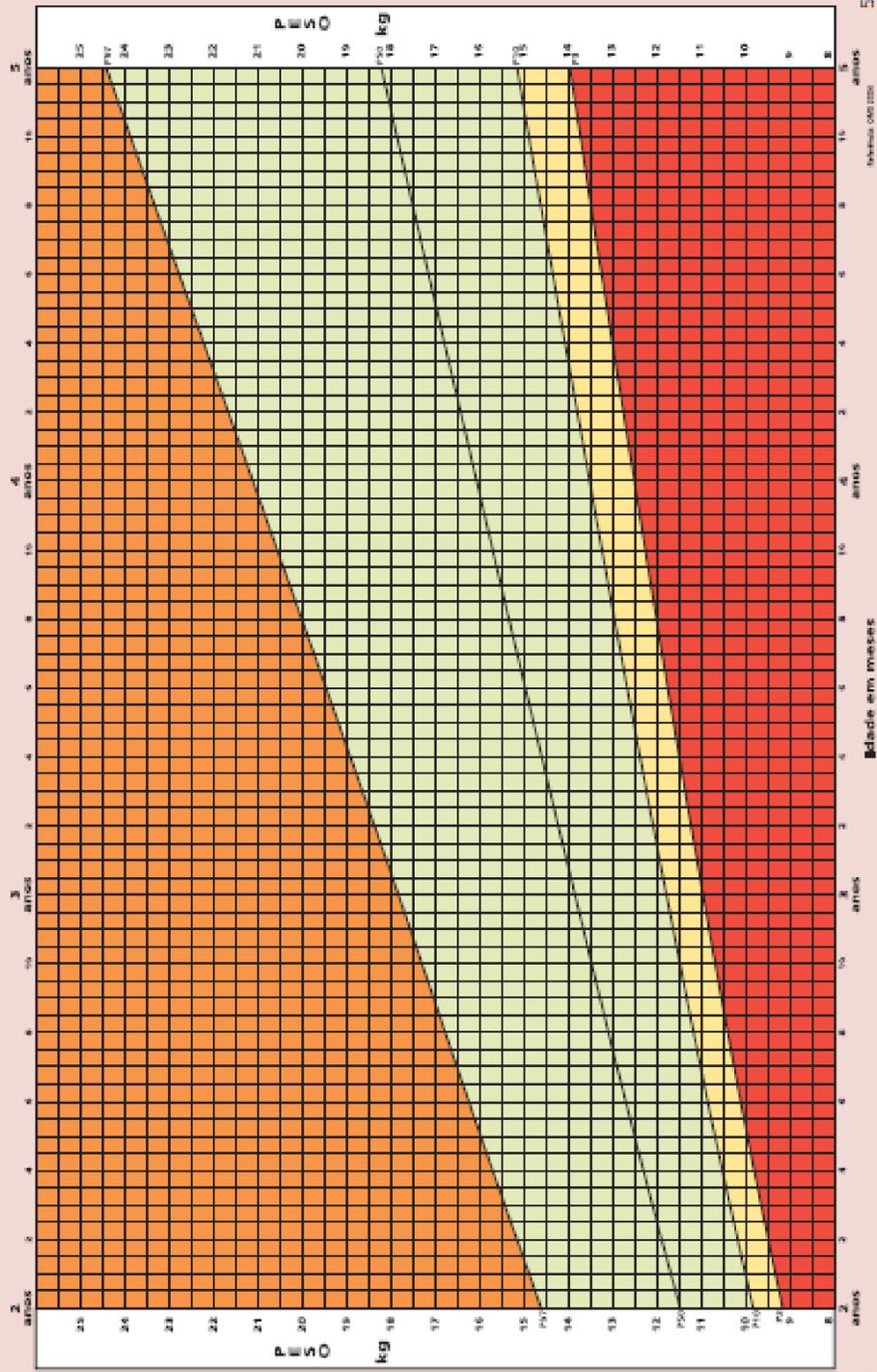


GRÁFICO DE PESO X IDADE - DE 0 A 2 ANOS

**ACOMPANHE
TAMBÉM A SAÚDE
DE SEU FILHO PELO
GANHO DE PESO**

- **Ótimo**
Seu filho está com o peso ideal.
- **Atenção**
Seu filho está um pouco abaixo do peso ideal.
- **Cuidado**
Seu filho está com o peso acima do ideal.
- **Cuidado**
Seu filho está com o peso muito abaixo do ideal.

**OBSERVE A LINHA
DE SEU FILHO**

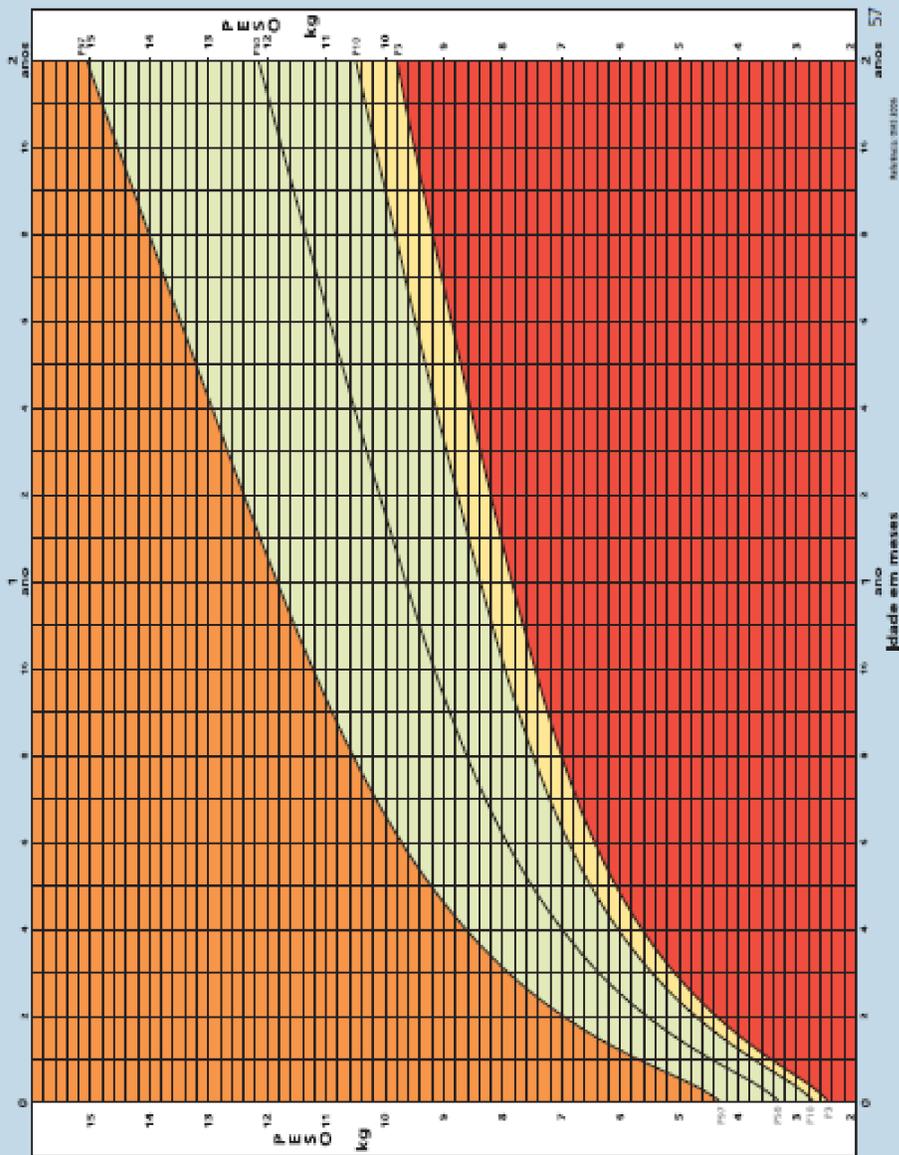
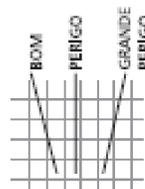
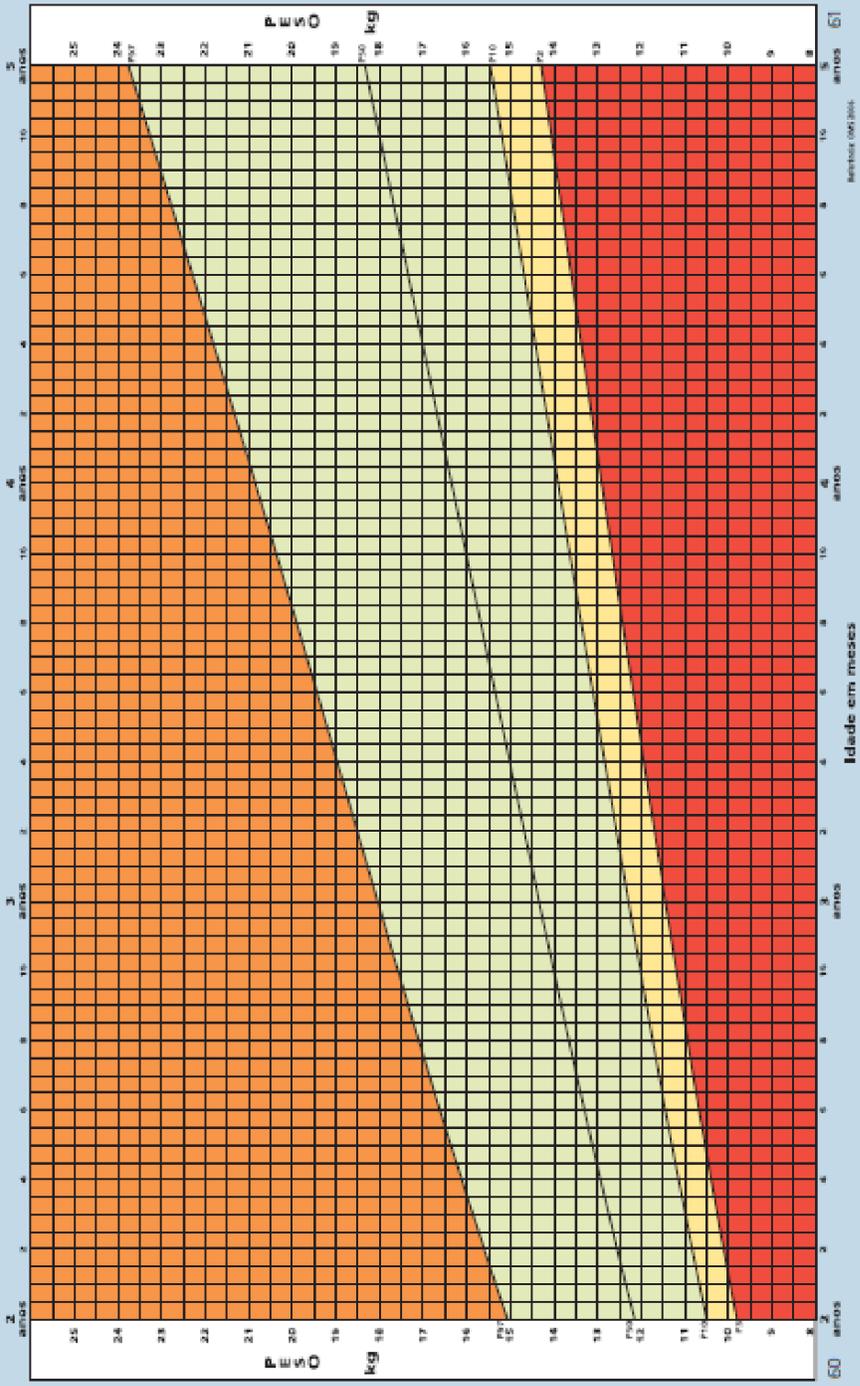


GRÁFICO DE PESO X IDADE - DE 2 A 5 ANOS



**ANEXO B - CARTA DE LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM
SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
– UFMS.**



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1350 da Pesquisadora Andréia Insabralde de Queiroz Cardoso intitulado "Densidade parasitária de medula óssea de crianças com leishmaniose visceral e sua correlação com os aspectos clínicos, laboratoriais e do tratamento", foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 25 de junho de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 29 de junho de 2009.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.