

LUCIANA NOGUEIRA DE ALMEIDA GUIMARÃES

**DNA DE *Leishmania* sp. EM SALIVA E MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

**CAMPO GRANDE
2015**

LUCIANA NOGUEIRA DE ALMEIDA GUIMARÃES

**DNA DE *Leishmania* sp. EM SALIVA E MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Yvone Maia Brustoloni.

**CAMPO GRANDE
2015**

LUCIANA NOGUEIRA DE ALMEIDA GUIMARÃES

DNA DE *Leishmania* sp. EM SALIVA E MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Yvone Maia Brustoloni.

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu o conceito

_____.

Campo Grande/MS, 25 de Setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

NOTA/CONCEITO

Dr^a Yvone Maia Brustoloni

Dra. Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval

Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos os pacientes que,
acometidos pela leishmaniose visceral,
estiveram, em algum momento,
sob nossos cuidados.*

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração de várias pessoas, às quais gostaria de expressar algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em especial:

A Deus, por me ter concedido saúde, coragem e fé, durante todo o percurso desta jornada; pela vida e a oportunidade de percorrer esse caminho evolutivo, por permitir tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

À minha mãe e a meu pai, exemplos de vida regida pela honestidade, caráter e generosidade. Obrigada por todos os seus valiosíssimos ensinamentos. À minha irmã, parceira a quem muito estimo, pelo ouvido que escutou tantas reclamações e pelas risadas que amenizavam o stress diário.

Agradeço à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Yvone Maia Brustoloni, que, com carinho, aceitou a tarefa de me orientar, obrigada pela liberdade e confiança referentes ao presente trabalho. Sem a sua paciência de me escutar e de ouvir minhas inquietações, certamente não teria conseguido ordenar as ideias que borbulhavam na minha cabeça.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, por ter me concedido novos horizontes de conhecimento.

A todos os professores da pós-graduação, em especial ao Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, que pelo seu exemplo de determinação e humildade nos mostra que ninguém é melhor e mais importante que o outro, mas que possuímos habilidades diferentes que precisam ser desvendadas e bem trabalhadas.

À Prof^ª Dr^ª Inês Tozetti, por compreender todas as dificuldades percorridas nesses dois anos e por acreditar que tudo daria certo no final, muito obrigada!

À Prof^ª Maria Elizabeth Dorval, nossa querida “Prof Beth”, por sua simplicidade, companheirismo, profissionalismo e suas deliciosas gargalhadas!

Agradeço ao Manuel Sebastião da Costa Lima Junior pelo fundamental apoio técnico-científico, além da grande amizade e conversas descontraídas.

À Prof^ª Dr^ª Maria de Fatima Cepa Matos pela disponibilidade do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares para realização da biologia molecular, e

também à sua equipe, Karina Garcia Franco e Rosianne Assis de Souza Tsujiki, na realização dos exames moleculares.

A todos os profissionais que trabalham no Serviço de infectologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, pelo auxílio e apoio concedidos, que foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes que gentilmente aceitaram participar, eles são parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Agradeço a todos os amigos do Hospital-Dia Prof^a Esterina Corsini, Adriana Negri, Luis, Vilela e Marcos, pelo enorme aprendizado, apoio e carinho. No Hospital-Dia percebi que o aprendizado é uma construção diária cujo ingrediente principal é o afeto. A esta rede de apoio que me acolhe, os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos colegas da pós-graduação, pela valiosa troca de experiências em doenças infecciosas e parasitárias. Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade!

*“Quem tem um amigo, mesmo que um só,
não importa onde se encontre,
jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades,
mas não estará só.”*

Amir Klink

Às minhas amigas de turma do “Mestrado et al., 2005”: Nara Tosta, Eunice Cury, Edy Firmina, Samara Graeff e Anna Letícia Miranda, por todos os momentos de alegria que tivemos durante o curso. Amigas e companheiras sempre dispostas a ajudar, vocês foram fundamentais nesses dois anos de trabalho, desde os pequenos até os grandes problemas. Mais que companheiras, amigas para todos os momentos. Muito obrigada pelas conversas, risadas, ajudas e companheirismo.

Um enorme agradecimento ao meu amigo Anderson, apesar de quase todo o trabalho ter se constituído num caminho difícilimo e longo, ele esteve presente do início ao fim, sempre disposto a ajudar de forma significativa.

Agradeço de forma especial às minhas amigas e companheiras de trabalho: Cirlene dos Santos Urias e Suellen Raulino, amigas fieis que estiveram ao meu lado em momentos cruciais da elaboração dessa dissertação. Vocês foram simplesmente essenciais. Agradeço também a Evelin dos Santos, mesmo com pouco tempo de convivência, pela incrível disponibilidade oferecida. É um privilégio fazer parte de uma equipe de trabalho como essa.

Agradeço também, e de modo muito especial, a Angelita Fernandes Druzian, porque a ela devo, não apenas incontáveis indicações de preciosas leituras, mas, sobretudo, o fato de ter sempre sido uma incansável e atenciosa amiga.

Esposo e filhos... Deixei vocês por último, porque sempre deixo o melhor para o final, e vocês são o melhor da minha vida! De modo geral, é preciso destacar o afeto, solidariedade e compreensão da família. Sem o apoio deles, a execução desse trabalho teria sido impossível. Logicamente, ao meu esposo Carlus, que nos meus momentos de estresse, manifestou seu amor com paciência, carinho e zelo com nossos filhos, devo a amizade e o incansável apoio nesses últimos anos. A ele, pelo imenso amor, meu muito obrigada! Aos meus filhos, tesouros da minha vida, Riccardo e Amanda, obrigada meus amores por compreenderem as ausências e impaciências. Agradeço pela paciência de esperar que a tarefa chegasse ao final. Vocês são minha fortaleza, meus pilares, minha fonte de carinho.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

*"Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo.
Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e
fazendo coisas novas, Porque somos curiosos...
e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.
Siga em frente."*

Walt Disney

RESUMO

Introdução: *Leishmania infantum* (sinonímia: *Leishmania chagasi*) é um dos agentes causadores da leishmaniose visceral (LV), doença que, quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. Estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos de LV ocorrem anualmente em todo o mundo. Caracterizada como doença de caráter eminentemente rural, a LV vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou um crescente problema de saúde pública no Brasil e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica. O diagnóstico e tratamento dos pacientes devem ser realizados oportunamente e, para isso, é fundamental disponibilizar métodos e recursos para o pronto diagnóstico laboratorial que, na rede básica de saúde, baseia-se principalmente em exames imunológicos e parasitológicos, necessitando de procedimentos invasivos. A saliva e o esfregaço de células da mucosa oral têm sido cada vez mais utilizados como substratos para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de doenças infecciosas e para o diagnóstico da LV. **Objetivo:** Avaliar o potencial da saliva e do esfregaço de mucosa bucal como substratos no diagnóstico da leishmaniose visceral pela PCR. **Material e Métodos:** Materiais e Métodos: Participaram do estudo 30 pacientes, a partir de 18 anos de idade, internados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Pronto Atendimento do NHU-UFMS, em Campo Grande/MS, com diagnóstico de leishmaniose visceral. As amostras de saliva e células da mucosa bucal foram coletadas com “swab” de Rayon e escova cervical, respectivamente, ambos estéreis, totalizando 60 amostras. A PCR foi realizada com os iniciadores P1: 5' (C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' P2: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3', que amplificam o fragmento conservado do minicírculo de KDNA de *Leishmania*, tamanho de fragmento de 120pb. **Resultados:** 60 amostras foram analisadas, 30 de saliva e 30 de esfregaço bucal, das quais se obteve positividade de 73,3% (22/30) e 53,3% (16/30) respectivamente. Em pacientes coinfectados com HIV (9/30) a positividade foi de 66,7% (6/9) na saliva e 55,5% (5/9) em células da mucosa bucal. No geral, 76,6% (23/30) dos pacientes apresentaram pelo menos uma amostra positiva pela PCR. **Conclusão:** A saliva e o esfregaço da mucosa bucal são obtidos de forma fácil por procedimento não invasivo, tendo melhor aceitação pelos pacientes e oferecem mais segurança para o profissional de saúde, pois elimina os riscos de acidentes com perfurocortantes. A saliva e o esfregaço de mucosa bucal apresentam-se como substratos úteis para o diagnóstico da leishmaniose visceral quando empregada a PCR e poderiam ser utilizados como uma alternativa não invasiva de investigação em indivíduos com suspeita da doença.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; PCR; *Leishmania infantum*; saliva; esfregaço de mucosa bucal.

ABSTRACT

Introduction: *Leishmania infantum* (synonymy: *Leishmania chagasi*) is a causative agent of visceral leishmaniasis (VL), a disease that, when left untreated, can progress to death in more than 90% of the cases. It is estimated that 200,000 to 400,000 new cases of VL occur annually throughout the world. Characterized as a disease of character eminently rural, the VL is expanding to urban areas of medium and large size and has become a growing public health problem in Brazil and in other areas of the American continent, being an endemic disease in franca geographic expansion. The diagnosis and treatment of patients should be conducted in due time and, for this reason, it is essential to provide methods and resources for the ready laboratory diagnosis which, in the basic health network, mainly based on exams immunological and parasitological, requiring invasive procedures. The saliva and the smear of oral mucosa cells have been increasingly used as substrates for the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the diagnosis of infectious diseases and for the diagnosis of LV. **Objective:** To evaluate the potential of saliva and the smear of buccal mucosa as substrates in the diagnosis of visceral leishmaniasis by PCR. **Material and Methods:** Materials and Methods: the study included 30 patients, from 18 years of age, admitted to the Service of Infectious and Parasitic Diseases and Emergency Care of the NHU-UFMS, in Campo Grande/MS, with diagnosis of visceral leishmaniasis. The samples of saliva and cells of the oral mucosa were collected using a swab of Rayon and cervical brush, respectively, totaling 60 samples. The PCR was performed with the initiators P1: 5' (C/G) (C/G) (G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3 'P2: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3 ', which amplify a fragment preserved in the minicirculo of KDNA of *Leishmania*, size of fragment of 120pb. **Results:** 60 samples were analyzed, 30 of saliva and 30 of buccal smear, which there was a positivity of 73.3% (22/30) and 53.3% (16/30) respectively. In patients coinfecting with HIV (9/30) the positivity was 66.7% (6/9) in the saliva and 55.5% (5/9) in cells of the oral mucosa. Overall, 76.6% (23/30) of the patients had at least one sample was positive by PCR. **Conclusion:** The saliva and the smear of buccal mucosa present as substrates useful for the diagnosis of visceral leishmaniasis when employed the PCR and could be used as a noninvasive alternative research in individuals with the disease was suspected.

Keywords: visceral leishmaniasis; PCR; *Leishmania infantum*; saliva; oral mucosa smear.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Áreas endêmicas para a leishmaniose visceral, 2013.....	17
Figura 2 – Distribuição de casos de leishmaniose visceral nas Américas em 2012..	17
Figura 3 – Distribuição de casos de leishmaniose visceral segundo município de residência com maior número de registros, Mato Grosso do Sul, 2014.....	18
Figura 4 – Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. no interior de um macrófago.....	20
Figura 5 – Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	21
Figura 6 – Ciclo biológico da <i>Leishmania infantum</i>	22
Figura 7 – Células do sistema imune e citocinas envolvidas na resposta à <i>Leishmania</i>	23
Figura 8 – Hepatoesplenomegalia na leishmaniose visceral.....	24
Figura 9 – Desenho do estudo.....	36
Figura 10 – Materiais utilizados para a coleta de saliva e esfregaço da mucosa bucal.....	37
Figura 11 – Materiais preparados para a coleta das amostras de saliva e esfregaço de mucosa bucal.....	38
Figura 12 – Coleta de saliva.....	38
Figura 13 – Esfregaço da mucosa bucal.....	39
Figura 14 – Saliva e esfregaço da mucosa bucal acondicionados em tubo Falcon..	39
Figura 15 – Produtos de amplificação da PCR.....	45
Figura 16 – Produtos de amplificação da PCR.....	45
Figura 17 – Positividade da PCR em saliva e células da mucosa bucal de pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30).....	45
Figura 18 – Positividade da PCR em saliva e células da mucosa bucal de pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos casos de leishmaniose visceral por faixa etária, gênero e coinfeção com HIV, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)...	43
Tabela 2 – Frequência das manifestações clínicas observadas na internação de pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30).....	43
Tabela 3 – Casos de leishmaniose visceral segundo terapia medicamentosa administrada, Hospital Universitário/UFMS–2014 (n= 30).....	44
Tabela 4 – Resultados dos testes laboratoriais utilizados para confirmação da leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30).....	44
Tabela 5 – Resultado da PCR em saliva e células da mucosa bucal de pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30).....	45
Tabela 6 – Positividade da PCR em saliva e células da mucosa bucal de pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – *Acquired immune deficiency syndrome*
AMO – Aspirado de Medula Óssea
ARV – Antirretroviral
CMV – Citomegalovírus
DAT – Direct Agglutination *Test*
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EBV – Virus Epstein-Barr
ELISA – Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
HBV – Vírus da hepatite B
HCV – Vírus da hepatite C
HHV – Herpesvírus humano
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HPV – Papiloma vírus humano
HSV – Herpes simples vírus
IL – Interleucina
INF- γ – Interferon-gama
LV – Leishmaniose visceral
NHU – Núcleo Hospital Universitário
PCR – Reação em cadeia da polimerase
RIFI – Reação de imunoflorescência indireta.
rK39 – Antígeno recombinante K39
RNA – Ácido ribonucleico
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SES – Secretaria de Estado de Saúde
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS/MS – Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
Th1-Th2 – Linfócitos T auxiliares
TR – Teste rápido
UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
VZV – Vírus Varicela-Zoster
WHO – World Health Organization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Leishmaniose visceral	16
2.1.1 <u>Aspectos epidemiológicos</u>	16
2.1.2 <u>Agente etiológico</u>	19
2.1.3 <u>Transmissão</u>	19
2.1.4 <u>Ciclo biológico</u>	20
2.1.5 <u>Imunopatogenia</u>	22
2.1.6 <u>Aspectos clínicos</u>	24
2.1.7 <u>Diagnóstico</u>	25
2.1.7.1 Métodos parasitológicos.....	26
2.1.7.2 Métodos imunológicos.....	26
2.1.7.3 Métodos moleculares.....	28
2.1.8 <u>Tratamento da leishmaniose visceral</u>	29
2.2 Saliva	30
2.2.1 <u>Definição, composição e funções</u>	30
2.2.2 <u>Saliva e esfregaço de mucosa bucal como substrato diagnóstico</u>	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Local e população	35
4.2 Desenho do Estudo	35
4.3 Coleta de saliva e esfregaço de mucosa bucal	36
4.4 Extração do DNA para PCR	40

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase	40
4.6 Eletroforese em gel de agarose.....	41
4.7 Estatística descritiva e analítica.....	41
4.8 Aspectos Éticos.....	41
5 RESULTADOS.....	43
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICES.....	75
ANEXOS.....	80

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose que apresenta grande importância para a saúde pública devido à alta incidência, ampla distribuição e ao surgimento de formas graves que conduzem ao óbito se não tratadas. No Brasil, o agente etiológico é *Leishmania infantum* (sinonímia *Leishmania chagasi*). Os parasitos são transmitidos pela picada de insetos denominados flebotomíneos, que veiculam as formas promastigotas para animais suscetíveis, ou para o homem. Esses vetores pertencem a espécies do gênero *Lutzomyia*, destacando-se *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*.

Para fins diagnósticos da LV, os exames laboratoriais mais utilizados envolvem métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares, havendo necessidade de procedimentos invasivos para a obtenção dos materiais biológicos.

Para a realização de exames sorológicos e imunológicos, o sangue é coletado por métodos invasivos, e há certa dificuldade na realização desse procedimento que frequentemente promove para o paciente um confronto com a dor e contribui com aumento do seu nível de tensão e medo.

A punção aspirativa de medula óssea também é um procedimento invasivo que deve ser realizado por profissional devidamente treinado. Geralmente realizada no osso esterno, além de provocar dor ou incômodo para o paciente no local da punção, apresenta risco de ultrapassar-se a tábua óssea interna e atingir vasos nobres. Já na punção de crista ilíaca, existe a possibilidade, embora rara, de ultrapassar-se a tábua óssea interna e atingir a alça intestinal.

O esfregaço de mucosa bucal e a saliva são agora importantes substratos para a utilização em testes laboratoriais, na realização de diversos diagnósticos, principalmente em doenças infecciosas. Na LV são escassos esses estudos, tornando-se necessário aprofundá-los, o que justifica o desenvolvimento do presente trabalho que visa avaliar o potencial da saliva e do esfregaço de mucosa bucal de pacientes com LV internados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do NHU-UFMS, como amostras biológicas para a reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da parasitose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmaniose visceral

Em 1900, Leishman identificou a presença de um protozoário no baço de um soldado que foi a óbito em decorrência da febre “Dum Dum”. O agente etiológico foi descrito por Donovan em 1903, que demonstrou a presença dos parasitos em aspirados esplênicos de uma criança que apresentava febre irregular (MICHALICK; GENARO, 2005).

A doença causada por esse protozoário, então chamada *kala-azar*, era a leishmaniose visceral humana. O nome da doença indicava hiperpigmentação, embora outros achem que estaria relacionado com sua gravidade (PRATA; SILVA, 2005).

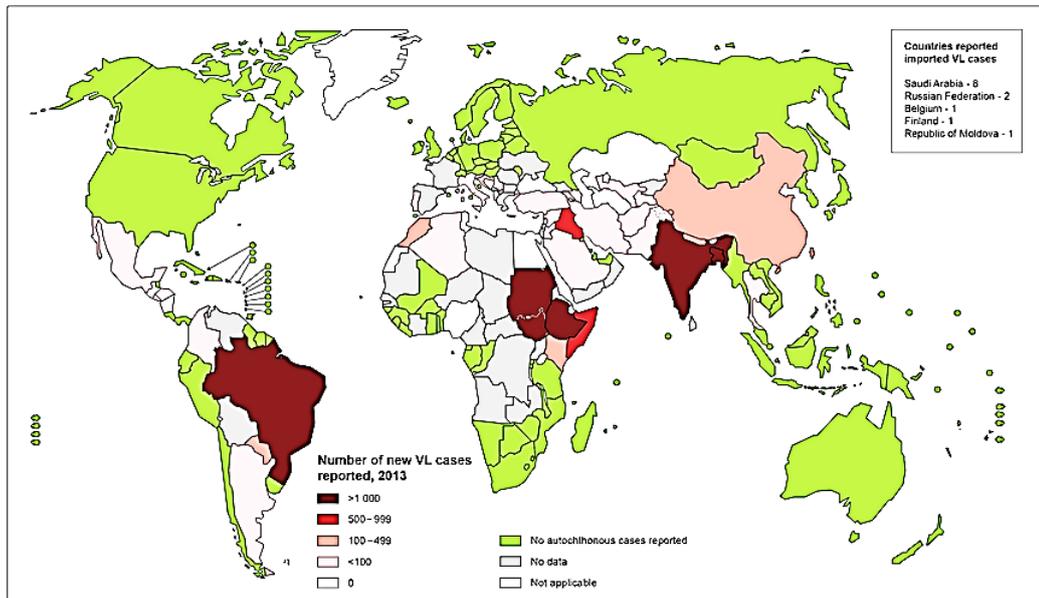
Os primeiros casos da infecção no Brasil foram relatados por Penna em 1934, a partir de lâminas histológicas de fígado examinadas *post mortem* para diagnóstico de febre amarela. Durante estudos epidemiológicos da doença, Evandro Chagas suspeitou que o mosquito responsável pela transmissão aos humanos fosse o flebotomíneo *Lu. longipalpis* devido sua constante presença ao redor e no interior das residências de pacientes doentes (RANGEL; LAINSON, 2003).

A LV tornou-se uma doença de grande importância para a saúde pública devido à sua ampla distribuição e alta letalidade, principalmente em crianças desnutridas, idosos, pacientes portadores de coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em pacientes não tratados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). É uma doença grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não tratada adequadamente (GONTIJO; MELO, 2004).

2.1.1 Aspectos epidemiológicos

Estima-se que 200.000 a 400.000 casos novos de LV ocorrem no mundo a cada ano, com estimativas de mais de 20.000 mortes. Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 1) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

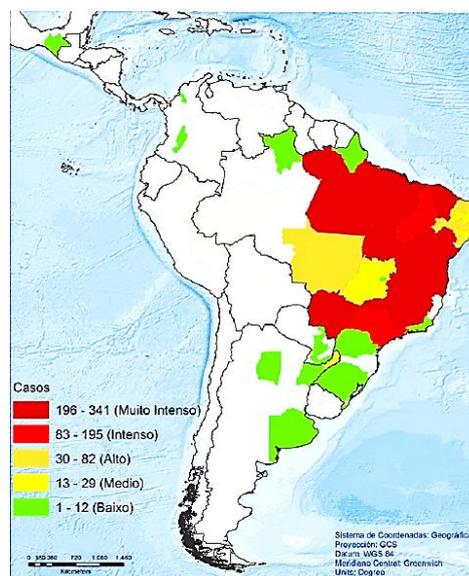
Figura 1 – Áreas endêmicas para a leishmaniose visceral, 2013.



Fonte: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png

Nas Américas, 12 países já reportaram casos autóctones de LV, e destes, cinco notificaram em 2012 o total de 3.231 casos distribuídos em 781 municípios, sendo o Brasil o país que concentra 96,5% dos casos, seguido do Paraguai 2,4%, Argentina 0,7%, Colômbia 0,3% e México 0,1% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014) (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição de casos de leishmaniose visceral nas Américas em 2012.

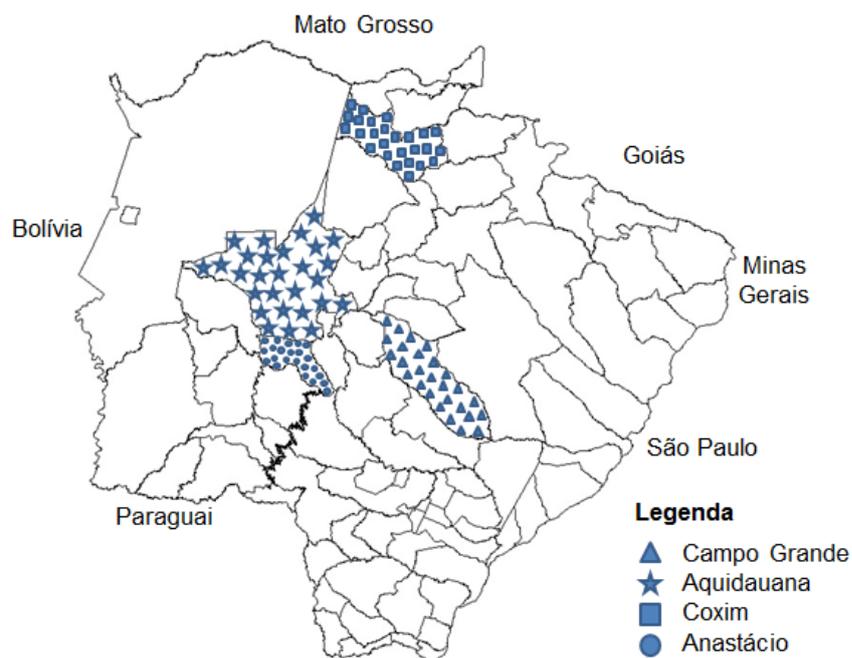


Fonte: <file:///C:/Users/L/Downloads/Reporte-Leishmaniasis-OPAS-Junho2014%20(2).pdf>

No Brasil a LV está registrada em 21 das 27 Unidades da Federação (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008), com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (BRASIL, 2014). Restrita anteriormente às áreas rurais do Nordeste brasileiro, a LV avançou para outras regiões consideradas livres da doença alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos. Dessa forma, os estados do Pará e Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo passaram a influenciar significativamente nos números da LV no Brasil (GONTIJO; MELO, 2004).

Em Mato Grosso do Sul, de janeiro de 1999 até dezembro de 2014, foram confirmados 3.245 casos humanos de LV distribuídos em 58 municípios. No mesmo período, 273 óbitos pela doença foram registrados. De acordo com o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), de janeiro a dezembro de 2014 foram confirmados 151 casos, distribuídos em 29 municípios do Estado. Do total de casos no período, 92 (60,9%) são do município de Campo Grande, seguido por Aquidauana com 8 (5,3%) casos, Coxim com 6 (4%) e Anastácio com 5 (3,3%) casos (Figura 3) (MATO GROSSO DO SUL, 2015).

Figura 3 – Distribuição de casos de leishmaniose visceral segundo município de residência com maior número de registros, Mato Grosso do Sul, 2014.



2.1.2 Agente etiológico

As leishmanioses têm como agentes etiológicos microrganismos que são parasitos intracelulares do sistema fagocítico mononuclear (SFM), capazes de infectar e se multiplicar em diferentes espécies de mamíferos. Apresentam-se sob duas formas durante seu ciclo evolutivo: amastigota e promastigota (BRASIL, 2014). Esses microrganismos foram sistematicamente organizados no grupo dos eucariotos protozoários e são taxonomicamente classificados na Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*, divididos nos Subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (SHAW, 1994)

A leishmaniose visceral é causada por espécies de protozoários pertencentes ao subgênero *Leishmania* onde se incluem: *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (LAINSON; SHAW, 1987). Nas Américas, há uma tendência de denominação do protozoário responsável pela LV como *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Espécies de *Leishmania* são compostas de populações clonais cuja estrutura varia de acordo com o método de caracterização. Uma solução taxonômica aceitável seria criar subespécies com as linhagens *infantum* e *donovani* (SHAW, 2006). Segundo Dantas-Torres (2006), *L. infantum* e *L. chagasi* devem ser considerados como sinonímia, até que uma nova classificação do gênero *Leishmania* seja proposta.

2.1.3 Transmissão

O principal meio de transmissão das formas infectantes para o homem e outros mamíferos é pela picada das fêmeas de flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (BRASIL, 2014). Geralmente tem a cor parda, por esse motivo possuem denominação popular de “mosquito palha”, e seu aparelho bucal está adaptado para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue (CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

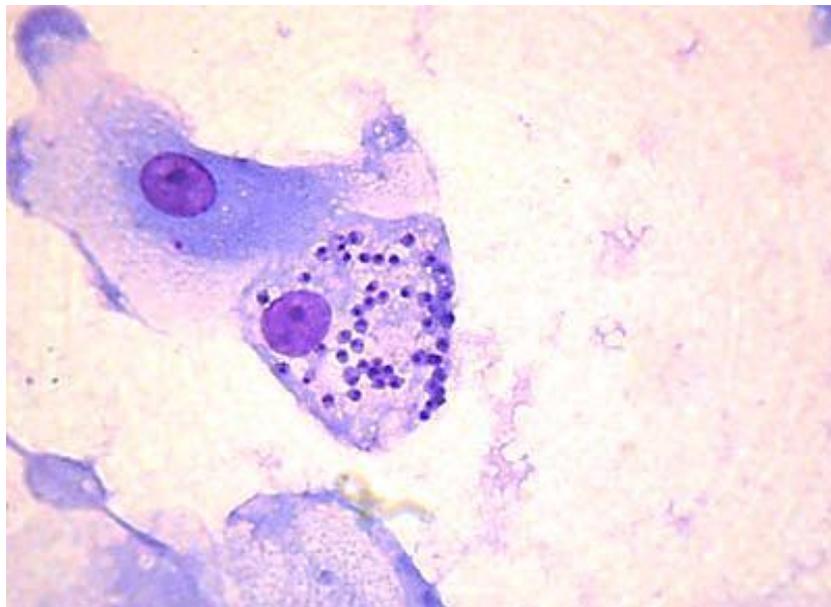
A adaptação deste vetor aos ambientes urbanos e em periferias de grandes centros possibilita seu encontro no peridomicílio, abrigos de animais domésticos, intradomicílio e entre outros ambientes, apresentando atividade crepuscular e noturna. Como consequência, o Brasil vem enfrentando a expansão da doença nos centros urbanos. O cão é considerado o principal hospedeiro no ambiente doméstico, assim como fonte de infecção para os vetores, tendo grande importância

nas estratégias de controle da doença (BRASIL, 2014). Outra forma de transmissão da LV foi descrita por Shaw (2007) que relatou casos de humanos com a doença, onde possivelmente a transmissão ocorreu após transfusão sanguínea.

2.1.4 Ciclo biológico

O ciclo de vida dos protozoários tem seu desenvolvimento em dois hospedeiros diferentes, um invertebrado e outro vertebrado. As espécies do gênero *Leishmania* possuem características biológicas que as permitem se apresentar sob duas formas quando presentes em seus diferentes hospedeiros: amastigotas – formas arredondadas e sem flagelo (ou com um curto flagelo), observadas dentro de macrófagos do hospedeiro vertebrado infectado (Figura 4) e promastigotas – formas extracelulares alongadas e flageladas presentes no sistema digestivo do hospedeiro invertebrado e nos meios de cultura (Figura 5) (BRASIL, 2014).

Figura 4 - Formas amastigotas de *Leishmania* no interior de um macrófago.



Fonte: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=315&sid=32>

Figura 5 – Formas promastigotas ou flageladas do parasito.

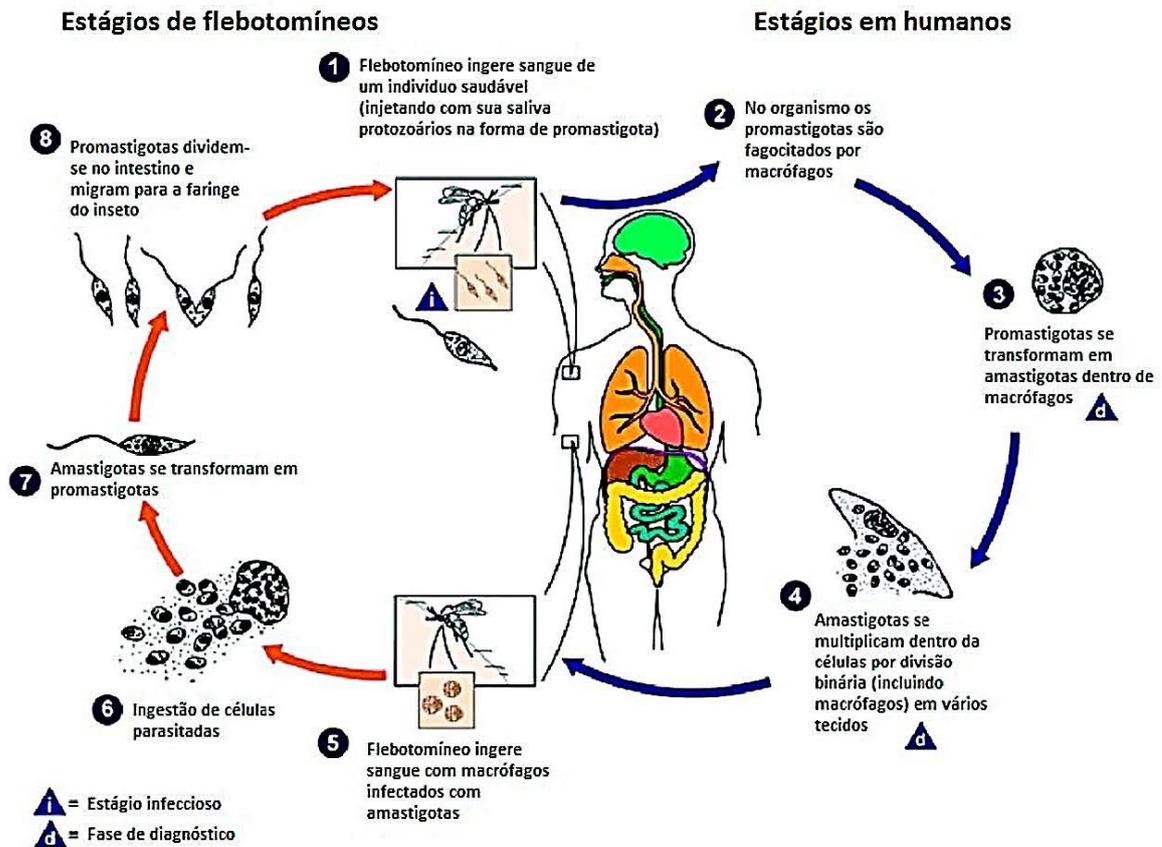


Fonte: http://fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Leishmania.htm

A infecção do flebotomíneo ocorre quando as fêmeas, hematófagas, se alimentam em hospedeiros vertebrados infectados e ingerem macrófagos parasitados. No trato digestivo do inseto ocorre o rompimento dessas células, liberando as formas amastigotas que após divisão binária, diferenciam-se em formas promastigotas. Cerca de 48 a 72 horas após o repasto alimentar as formas promastigotas passam a colonizar o esôfago e a faringe do inseto onde se transformam em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (MICHALICK; GENARO, 2005).

As fêmeas infectadas, ao realizarem um novo repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do SFM, onde se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dessas células e liberação das formas que serão fagocitadas por novas células num processo contínuo, havendo a disseminação hematogênica principalmente para tecidos ricos em células do SFM, como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea (LAINSON *et al.*, 1986) (Figura 6).

Figura 6 – Ciclo biológico de *Leishmania infantum*.

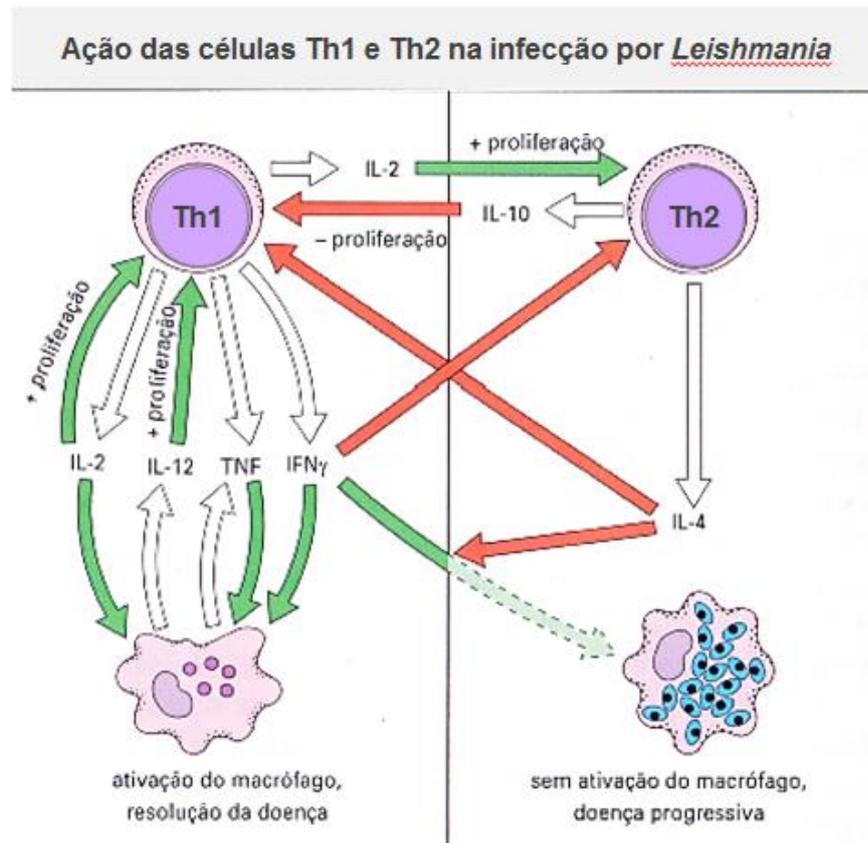


Fonte: <http://www.cruesp.sp.gov.br/?p=4543>

2.1.5 Imunopatogenia

A resposta imune celular contra a *Leishmania* abrange os macrófagos e outras células do sistema imune, como os linfócitos T. Um subtipo específico de linfócito T, denominado linfócito T auxiliar (T_a ou T_h "helper"), estaria diretamente relacionado com a resposta contra esses parasitos. Linfócitos T CD4⁺, por suas características, podem ser subdivididos em duas subpopulações, Th1 e Th2, sendo a subpopulação Th1 capaz de eliminar os parasitos e conferir imunidade, prevenindo uma possível reinfecção. Após ativação via moléculas secretadas pelas células Th1, as células T citotóxicas ou CD8⁺ e as "Natural Killers" (NK) são adicionadas à resposta (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003) (Figura 7). De forma oposta, a subpopulação Th2 favorece suscetibilidade à infecção e progressão da doença (MURRAY; BERMAN; SARAIVA, 2005).

Figura 7 - Células do sistema imune e citocinas envolvidas na resposta à *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de Roitt; Brostoff; Male (2003), p. 265.

Outro componente importante da resposta imune são as citocinas, que funcionam na regulação da resposta contra patógenos e substâncias estranhas. Como as citocinas secretadas pelas células Th1 e Th2 são antagonistas mútuos, a subpopulação que predomina determina o resultado da infecção. No caso das leishmanioses, o interferon-gama (INF- γ), uma citocina produzida por Th1, induz a destruição desses protozoários que parasitam os macrófagos, conferindo resistência à infecção (COSTA *et al.*, 1999; MURRAY; BERMAN; SARAIVA, 2005; ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

As leishmanioses em humanos caracterizam-se pela inibição da síntese de INF- γ , consequência do aumento da expressão de IL-10, citocina associada às células Th2, responsáveis pela supressão da proliferação e função das células Th1 (COSTA *et al.*, 1999; ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

2.1.6 Aspectos clínicos

A LV apresenta período de incubação que varia entre dois e seis meses (BRASIL, 2014). Os sintomas clássicos são variados, fazendo-se necessário o diagnóstico diferencial com outras doenças febris, como malária, doença de Chagas, doenças hematológicas, entre outras. Geralmente, entre os sintomas apresentados estão a febre prolongada, hepatoesplenomegalia (Figura 8), tosse, diarreia, emagrecimento e astenia. As citopenias podem se apresentar em diferentes graus, sendo a anemia a mais frequente. A hiperglobulinemia policlonal e a inversão do padrão albumina/globulina podem estar presentes (GONTIJO; MELO, 2004). A desnutrição, principalmente em crianças, tem sido relacionada como um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença (MACIEL *et al.*, 2008).

Figura 8 – Hepatoesplenomegalia na leishmaniose visceral.



Fonte: Profª Drª Anamaria Mello Miranda Paniado

O Ministério da Saúde divide a evolução clínica da LV clássica em três períodos: o período inicial, o período de estado e o período final. O período inicial caracteriza-se pelo início dos sintomas, que pode variar de acordo com cada paciente, podendo-se observar febre, palidez e hepatoesplenomegalia, onde o aumento do baço quase sempre é mais evidente que o aumento de fígado. Sinais e sintomas de coinfeções bacterianas podem confundir a apresentação clínica no momento do diagnóstico inicial. O hemograma apresenta anemia, leucócitos sem

alterações significativas e a contagem de plaquetas ainda pode estar normal. Proteínas totais e frações podem estar discretamente alteradas (BRASIL, 2014).

No período de estado, observa-se febre irregular, normalmente associada a emagrecimento progressivo, palidez e aumento da hepatoesplenomegalia. O quadro clínico, já arrastado com mais de dois meses de evolução, associa-se ao comprometimento do estado geral do paciente. Exames complementares mostram anemia, leucopenia, trombocitopenia e inversão do padrão albumina/globulina.

No período final, que ocorre quando não há diagnóstico e tratamento, observa-se febre contínua e comprometimento intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição e edema dos membros inferiores, podendo evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias, icterícia e ascite. Nestes casos, infecções bacterianas e/ou manifestações hemorrágicas podem levar o paciente a morte.

2.1.7 Diagnóstico

Em 2011, o Ministério da Saúde do Brasil adequou as definições de caso suspeito e caso confirmado de LV descritos a seguir:

São considerados casos suspeitos de LV:

- a. Todo indivíduo com febre e esplenomegalia, proveniente de área com ocorrência de transmissão de LV;
- b. Todo indivíduo com febre e esplenomegalia, proveniente de área sem ocorrência de transmissão, desde que descartados os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região.

São considerados casos confirmados de LV:

- a. Encontro do parasito em pesquisa direta ou em cultura;
- b. RIFI com títulos iguais ou superiores a 1/80, excluídos outros diagnósticos;
- c. Testes imunocromatográficos, comumente conhecidos como teste rápido, que utilizam antígenos recombinantes.

Pacientes clinicamente suspeitos, sem confirmação laboratorial, procedentes de áreas endêmicas de LV, com resposta favorável à terapia serão considerados confirmados pelo critério clínico epidemiológico (BRASIL, 2011).

O diagnóstico clínico da LV é difícil de ser realizado devido à variedade de sinais que a doença pode apresentar. Esses sinais podem ser confundidos com outras enfermidades e por isso devem-se incluir exames baseados em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares para confirmação da doença (GONTIJO; MELO, 2004).

2.1.7.1 Métodos parasitológicos

Os métodos parasitológicos são considerados os padrões de referência no diagnóstico da LV e estão relacionados com a demonstração direta do parasito e no seu isolamento em cultivo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). As formas amastigotas de *Leishmania* sp. podem ser visualizadas através do exame direto após coloração (Giemsa ou Leishman) de esfregaços contendo tecidos do baço, medula óssea, fígado e linfonodos (DAVIES *et al.*, 2003). O esfregaço esplênico apresenta sensibilidade de 93 a 98% e o da medula óssea de 52 a 85%. Aspiração esplênica deve ser evitada, pois pode acarretar hemorragia potencialmente fatal em cerca de 0,1% dos indivíduos (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Pode-se realizar o isolamento do parasito em cultura *in vitro* de fragmentos ou aspirado de tecidos em meio bifásico, Novy-Mac-Neal-Nicole (NNN) onde posteriormente serão visualizadas formas promastigotas (SUNDAR; RAI, 2002). As culturas devem ser mantidas entre 24 e 26°C e observadas em microscopia semanalmente, durante quatro semanas (BRASIL, 2014). Nos aspirados esplênicos e de medula óssea, a positividade do cultivo é bastante elevada, acima de 80%. O cultivo dos parasitos aumenta a sensibilidade da pesquisa, mas pode retardar em semanas o diagnóstico (SUNDAR; RAI, 2002).

2.1.7.2 Métodos imunológicos

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico da LV desde 1964 (DUXBURY; SADUN, 1964), sendo disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde no Brasil. A técnica consiste na aderência de antígenos constituídos de promastigotas mortas de *Leishmania* em lâminas de microscopia para fluorescência, onde se processa a reação com o soro a ser testado. A ligação antígeno-anticorpo pode ser visualizada por meio de um

conjugado fluorescente e os resultados são expressos em diluições, onde são considerados reagentes os títulos iguais ou superiores a 1:80. Para títulos iguais a 1:40, recomenda-se a coleta de uma nova amostra em 30 dias (BRASIL, 2014). O teste apresenta sensibilidade e especificidade de 96 e 98% (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

O ensaio de anticorpos ligados à enzima (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay-ELISA*) tem sido utilizado desde 1971. Este método detecta anticorpos específicos contra o parasito e seu desempenho está diretamente relacionado ao antígeno utilizado (HO *et al.*, 1983). Os critérios de positividade dependem dos “cut-offs”, que devem ser fixados para cada teste (MAALEJ *et al.*, 2003).

Uma desvantagem comum aos métodos que utilizam antígenos não purificados é a baixa especificidade, causada pela reatividade cruzada. Para tentar contornar este problema, alguns antígenos purificados recombinantes tem sido identificados e posteriormente avaliados por ELISA (MAALEJ *et al.*, 2003). O ELISA apresenta sensibilidade e especificidade dependentes do antígeno utilizado. Resultados promissores têm sido demonstrados com o antígeno rk39 com 96% sensibilidade e 100% de especificidade (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

O teste de aglutinação direta (DAT) é um dos testes mais simples já desenvolvidos para o diagnóstico da LV e foi descrito em 1975 por Allain e Kagan. É de fácil realização e interpretação, entretanto, como os demais testes de detecção de anticorpos, não diferencia infecção ativa e passada (SILVA *et al.*, 2005; HAILU *et al.*, 2006). O teste é semi-quantitativo e nesse processo, soro, sangue ou urina diluídos são misturados às partículas antigênicas de promastigotas mortas em sua forma íntegra. Após um período de incubação a aglutinação se completa e, caso os anticorpos contra o protozoário estejam presentes, a reação de aglutinação fica visível a olho nu (EL HARITH *et al.*, 1986; EL HARITH *et al.*, 1988; FERREIRA; AVILA, 2001). Em estudos utilizando DAT, foram obtidas sensibilidade e especificidade de 94% e 85%, respectivamente. A desvantagem principal é a necessidade de múltiplas pipetagens, tempo de incubação relativamente longo e custo elevado do antígeno (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana são a RIFI e o ELISA, sendo considerado principalmente este último, teste de escolha para inquéritos populacionais (GONTIJO; MELO, 2004).

Utilizando a proteína rK39 como antígeno, um teste rápido foi inicialmente avaliado na Índia por Sundar *et al.* (1998). Entretanto, assim como outros métodos sorológicos, não diferencia infecção ativa e passada, devendo ser associado à clínica sugestiva da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). O teste rápido é um método diagnóstico não invasivo, que possibilita a detecção de anticorpos com rapidez. Os anticorpos presentes no material biológico reagem contra o antígeno recombinante impregnado na fita teste, promovendo alguns minutos depois uma reação de cor. O teste é considerado positivo quando visualizamos as duas linhas, teste e controle, e negativo quando é possível visualizar somente a linha controle (SUNDAR *et al.*, 1998; SUNDAR; RAI, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Sua sensibilidade e especificidade variam de 67 a 100% e 59 a 100%, respectivamente (SUNDAR *et al.*, 1998). No Brasil, são disponibilizados os testes imunocromatográficos rápidos IT-Leish e Kalazar Detect ® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em serviços de saúde pública (BRASIL, 2010).

2.1.7.3 Métodos moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui a principal abordagem molecular de pesquisadores e profissionais de saúde (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). A PCR baseia-se na síntese “in vitro” do DNA, permitindo um aumento exponencial do número de sequências específicas a partir de um único DNA alvo, sendo necessárias condições de desnaturação da fita molde, ligação dos iniciadores e extensão, em ciclos alternados, promovidos pela variação da temperatura na presença de componentes da reação (MULLIS; FALOONA, 1987).

A técnica da PCR possibilita a amplificação do DNA do parasito presente em diferentes tipos de amostras biológicas, tais como aspirados de baço, fígado, medula óssea, linfonodos, sangue periférico e soro (GONTIJO; MELO, 2004). Entre os alvos de amplificação do DNA, um dos mais utilizados é o DNA do cinetoplasto (kDNA), estrutura que contém uma região com grande homologia entre as espécies de *Leishmania*, a região conservada do kDNA (SCHALLIG; OSKAM, 2002). Utilizando a PCR em sangue periférico de pacientes imunocompetentes, de maneira geral, tem sido relatada sensibilidade variando entre 91 e 100% e especificidade variando entre

87 a 100% (MAURYA *et al.*, 2005). Já a PCR utilizando DNA extraído a partir de lâminas de medula óssea coradas com solução de Giemsa para diagnóstico da LV foi considerada altamente sensível (92,3%) e específica (97,7%), mostrando-se útil na elucidação de casos difíceis (BRUSTOLONI *et al.*, 2007). Essa mesma técnica, utilizando aspirado medular em pacientes imunocomprometidos, tem mostrado sensibilidade variando entre 82 e 100% (ANTINORI *et al.*, 2007). Utilizando a PCR, foram identificadas espécies de *Leishmania*, a partir de aspirado medular e/ou biópsia de lesão, conforme a suspeita clínica (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2009) e também foi possível a amplificação do DNA da *Leishmania* (V.) *braziliensis*, obtido a partir da saliva de um paciente com leishmaniose tegumentar americana, que não apresentava qualquer lesão na mucosa oral (CORVALAN *et al.*, 2011).

2.1.8 Tratamento da leishmaniose visceral

Distribuído aos serviços pelo Ministério da Saúde, o antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime®) é o medicamento de primeira escolha utilizado no tratamento dos pacientes no Brasil. O Glucantime® pode ser administrado por via endovenosa ou intramuscular durante um período mínimo de 20 dias. A droga é tóxica e nem sempre efetiva, sendo contra indicada para alguns grupos de pacientes, como gestantes nos dois primeiros trimestres de gestação e pacientes com insuficiência renal, hepática ou cardíaca (BRASIL, 2014).

Os efeitos colaterais mais comuns ao Glucantime® são alterações cardiovasculares, vômito, náusea, dor de cabeça, dor abdominal, febre, entre outros. A via de administração, o longo esquema de tratamento e a toxicidade da droga constituem causas importantes de não adesão ao tratamento. Além disso, a medicação requer monitoração cardiológica, renal e hepática, o que em muitas localidades só é possível com a hospitalização do paciente (BRASIL, 2014).

O desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomas (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal) estão sendo utilizados como alternativas terapêuticas, entretanto diversos efeitos colaterais, tais como, cefaleia, febre, calafrios, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão, também têm sido relatados para estes de medicamentos (BRASIL, 2014).

2.2 Saliva

2.2.1 Definição, composição e funções

A saliva é um fluido aquoso, hipotônico, transparente, que é secretado diretamente na cavidade bucal pelos três pares de glândulas salivares maiores: a parótida, submandibular e sublingual e pelas glândulas salivares menores. Constitui-se de um complexo de secreções multiglandulares, além de ser composta de fluido gengival, células epiteliais descamadas, microrganismos, leucócitos, resíduos alimentares e sangue. Entretanto, seu maior componente é a água – 99% (JENKINS, 1970; MANDEL, 1989; SAHINGUR; COHEN, 2004), e apenas 1 % de componentes inorgânicos e orgânicos (JENKINS, 1978; NIKIFORUK, 1985). As concentrações de cada componente são muito variadas, tanto no mesmo indivíduo como entre indivíduos (JENKINS, 1978). O principal fator que afeta a composição salivar é o fluxo, assim como a duração do estímulo (ERICSON; MÄKINEN, 1986).

Dentre os componentes inorgânicos, destacam-se os íons sódio, potássio, cloreto e bicarbonato, que são os principais contribuintes para a osmolaridade da saliva, que é sempre hipotônica em relação ao plasma. Os componentes orgânicos presentes na saliva apresentam diferentes funções: antimicrobiana, inibição de precipitação de cálcio e fosfato, efeitos bactericidas ou bacteriostáticos. As proteínas constituem os principais componentes orgânicos da saliva (NIKIFORUK, 1985; ERICSON; MAKINEN, 1986).

Tendo em vista a complexidade de sua composição, a saliva possui várias funções: contribuição no processo digestivo, através da amilase salivar; proteção dos tecidos duros e moles; lavagem da cavidade oral; neutralização e tamponamento dos ácidos provenientes dos alimentos, assim como do metabolismo bacteriano. A saliva também é responsável pela manutenção do equilíbrio ecológico na cavidade oral, através da remoção contínua de bactérias das superfícies dentárias e das mucosas com a ação do fluxo salivar. Além disso, a saliva interfere na aderência bacteriana impedindo a adesão das mesmas na superfície dentária, além de promover a manutenção do pH relativamente neutro na cavidade bucal (NIKIFORUK, 1985; MANDEL, 1989).

2.2.5 Saliva e esfregaço de mucosa bucal como substratos para diagnóstico

Preferencialmente, o DNA utilizado em estudos moleculares é obtido de amostras de sangue, pois fornece um grande número de células e, conseqüentemente, um bom rendimento. No entanto, sendo a coleta realizada através de um procedimento invasivo, ocorre resistência por parte dos pacientes por ocasião de sua realização, além de necessitar de um profissional especializado para o procedimento (AIDAR; LINE, 2007).

Nesse contexto, foram desenvolvidos diversos protocolos para a coleta de materiais que dispensam técnicas invasivas, como a utilização de células bucais, empregando escovas citológicas, saliva, bochecho com solução salina, dentre outros (FEIGELSON, 2001), considerados métodos alternativos e não invasivos. Para a obtenção de DNA de células bucais, estes métodos mostram que, além de práticos, apresentam resultados compatíveis com os de células sanguíneas (DE VRIES *et al.*, 1996), confirmando a eficiência da extração a partir da saliva.

A extração de DNA genômico deve ser realizada por meio de procedimento simples, pouco invasivo, de baixo custo (AIDAR; LINE, 2007) e com bom rendimento para que seja possível realizar diversas avaliações laboratoriais. As células do epitélio oral têm sido apontadas como uma fonte alternativa e promissora desse DNA, uma vez que são obtidas por protocolos que envolvem baixo custo (HARTY *et al.*, 2000).

Diagnósticos baseados em saliva têm sido o principal foco de investigação para uma variedade de agentes infecciosos incluindo vários microrganismos endêmicos em todo o mundo.

O *Mycobacterium tuberculosis* (EGUCHI *et al.*, 2003) e muitos vírus são detectados na saliva utilizando como método a PCR, incluindo o vírus Ebola (FORMENTY *et al.*, 2006), herpes simples vírus (HSV) (FURUTA *et al.*, 1998), Epstein-Barr (EBV), herpes vírus humano (HHV) e citomegalovírus (CMV) (BLACKBOURN *et al.*, 1998).

A detecção de CMV na saliva de recém-nascidos por PCR pode identificar a infecção congênita (BOPPANA *et al.*, 2011). A técnica de PCR também tem sido utilizada para detectar CMV em saliva não estimulada e sangue periférico de pacientes com periodontite crônica (IMBRONITO *et al.*, 2008) e foi relatado que a

saliva é tão confiável quanto a urina para detecção de CMV em grandes programas de rastreio (YAMAMOTO *et al.*, 2006).

A carga de DNA do EBV no sangue e saliva, detectada por PCR, tem mostrado resultados semelhantes em “coortes” de pacientes HIV positivos (IDESAWA *et al.*, 2004; LING *et al.*, 2003). A detecção de Papilomavírus humano (HPV) em amostras de saliva foi possível por meio da amplificação de seu DNA pelo método da PCR (CHUANG *et al.*, 2008) e este método também tem sido utilizado para detectar diferentes tipos de HPV (ANDREWS *et al.*, 2009).

Análises comparativas de PCR utilizando saliva e amostras de sangue periférico têm detectado Varicela-Zoster vírus (HSV-1) com frequências semelhantes em ambos os tipos de amostras (GRANDE *et al.*, 2008). Similarmente, foram reportadas a detecção e quantificação de ácidos nucleicos para o HSV-1, HSV-2 e VZV nos fluidos orais (RAGGAM *et al.*, 2008). A detecção do HHV-8 na saliva também foi demonstrada utilizando PCR e imuno-histoquímica (WIDMER *et al.*, 2006), e a carga viral no sangue, soro e saliva, por meio da RT-PCR (*Real Time PCR*), mostraram títulos compatíveis (MANCUSO *et al.*, 2008).

A saliva pode ser um meio de análise útil para a detecção de HIV-1, quando os níveis de HIV-1 RNA são elevados, tal como nos casos de infecção aguda por HIV. Em respostas de monitorização à terapia antirretroviral, a carga viral na saliva tem sensibilidade reduzida e pode não refletir com precisão os valores da carga viral no plasma, mas, no entanto, poderia identificar alto nível de viremia durante a falha do tratamento. O uso de sequências de HIV-1 para controlar a resistência aos fármacos pode ser possível (BALAMANE *et al.*, 2010).

Em estudo realizado por Abdalla *et al.* (2010), foram encontrados resultados positivos da PCR para *Mycobacterium leprae* em amostras periodontais e saliva de pacientes paucibacilares e multibacilares.

Métodos utilizados rotineiramente não permitem a detecção de bactérias patogênicas que causam doenças dos pulmões e vias respiratórias superiores e inferiores. Um estudo mostrou que *M. tuberculosis* foi detectado no fluido oral pelo método da PCR em 98% das amostras, mas pelo cultivo, somente 17,3% foram positivas (EGUCHI *et al.*, 2003)

Considerada como a causa mais comum de úlceras pépticas, *Helicobacter pylori* é também um fator de risco para o carcinoma e linfoma do tecido linfoide associado à mucosa. A detecção de DNA de *Helicobacter pylori* em amostras de

saliva de pacientes sintomáticos, por meio do método da PCR, permite o diagnóstico da infecção no seu estado ativo (TIWARI *et al.*, 2005).

O diagnóstico e a monitoração de infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) e vírus da hepatite C (HCV) consistem principalmente em análises de sangue e sorologia, avaliando a carga viral, bem como anticorpos e antígenos virais. Estudos têm indicado que HBV e HCV DNA, anticorpos, antígenos virais, existem na saliva de indivíduos infectados, e os resultados são compatíveis com aqueles obtidos em amostras de sangue (CHEN *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2005), sugerindo um papel potencial para saliva como um modo não invasivo de diagnóstico para HBV e HCV, e monitoramento do estado da doença. O frequente diagnóstico da infecção pelo HCV em pacientes sem qualquer fator de risco parenteral sugere a existência de outras vias de transmissão (FERREIRO; DIOS; SCULLY, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da saliva e do esfregaço de mucosa bucal como substratos no diagnóstico da leishmaniose visceral pela PCR.

3.2 Objetivos específicos

- a. Descrever a técnica utilizada na coleta de saliva e esfregaço de mucosa bucal em pacientes com LV.
- b. Descrever a reação de PCR utilizada com os substratos acima;
- c. avaliar a positividade do método da PCR para cada amostra clínica utilizada;
- d. estabelecer o substrato mais adequado para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e população

Este estudo foi realizado no município de Campo Grande/MS, com pacientes acima de 18 anos de idade, internados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Pronto Atendimento do NHU-UFMS, com diagnóstico de leishmaniose visceral e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

a) Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão:

- Ter idade igual ou maior que 18 anos de ambos os sexos;
- Apresentar quadro clínico sugestivo de leishmaniose visceral, com diagnóstico confirmado por método parasitológico (mielograma e/ou cultura) e/ou teste rápido e/ou sorologia por imunofluorescência;
- Assinar, antes da inclusão no estudo, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão:

- Pacientes indígenas;
- Pacientes gestantes.

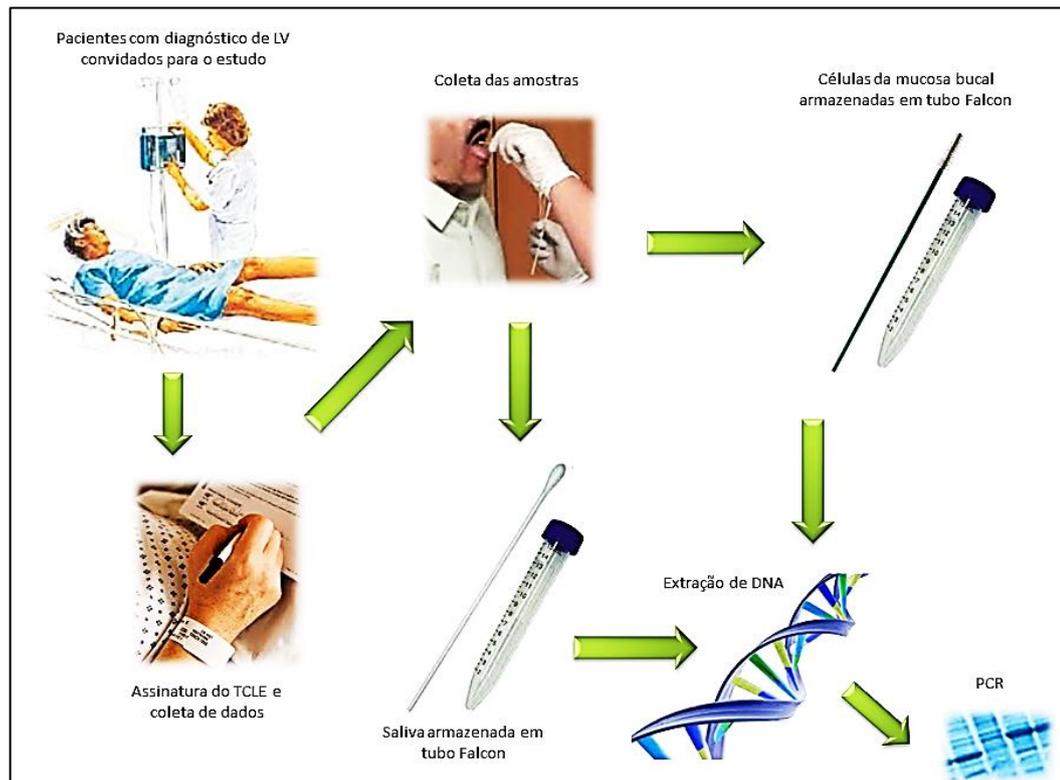
4.2 Desenho do Estudo

Todos os pacientes a partir de 18 anos de idade internados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Pronto Atendimento do NHU-UFMS em Campo Grande/MS com diagnóstico de leishmaniose visceral, foram convidados a participar do estudo.

Trabalhou-se com o total de 30 pacientes, que após terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), foram entrevistados e seus dados registrados em um formulário de coleta de dados (APÊNDICE B) desenvolvido para o estudo.

Posteriormente, os pacientes foram submetidos à coleta de saliva e células da mucosa bucal. As amostras foram coletadas com “swab” de Rayon e escova cervical, respectivamente, ambos estéreis, e armazenadas em tubo Falcon separadamente, para posterior extração de DNA e realização da PCR.

Figura 9 – Desenho do estudo.



Fonte: A autora.

4.3 Coleta de saliva e esfregaço de mucosa bucal

Para a coleta, foram utilizados os seguintes materiais (Figuras 10 e 11):

- 1 “swab” de Rayon;
- 1 escova cervical;
- 2 tubos Falcon de 15mL;
- Luva estéril;
- Capote;
- Gorro;
- Máscara cirúrgica;
- Lâmina de bisturi.

Figura 10 – Materiais utilizados para a coleta de saliva e esfregaço da mucosa bucal.



As amostras dos pacientes foram obtidas no dia do diagnóstico, preferencialmente antes do início da terapia medicamentosa. Foram coletadas entre 9h e 10h da manhã, para reduzir a interferência do ciclo circadiano em cada participante, além disso, durante a coleta, foi solicitado que ficassem sentados de forma ereta e relaxados por 5 minutos (FALCÃO, 2005).

Os voluntários foram submetidos a dois diferentes métodos de coleta e orientados a permanecer sem ingerir alimentos, bebidas ou escovar os dentes por pelo menos 2 horas antes da coleta.

O primeiro método utilizado foi a coleta de saliva não estimulada, utilizando o “swab” de Rayon e o segundo foi a coleta de células da mucosa bucal utilizando a escova cervical. Para a coleta de saliva (Figura 12), solicitou-se que os voluntários permanecessem de boca aberta, posicionando-se o “swab” de Rayon na região de fundo do sulco por aproximadamente 30 segundos, embebendo-se completamente o cotonete em saliva. Para a coleta do esfregaço de mucosa bucal (Figura 13), foi realizado o procedimento de escovação da região de mucosa jugal, friccionando-se a escova cervical durante 30 segundos com movimentos giratórios leves.

Em seguida, tanto o “swab” quanto a escova tiveram a porção externa das hastes cortadas e colocadas em tubo Falcon de 15mL separadamente (Figura 14). As amostras colhidas foram armazenadas em geladeira e posteriormente congeladas a -80°C até a extração da DNA.

Todos os procedimentos de biossegurança foram rigorosamente obedecidos durante as coletas, como o uso obrigatório de equipamentos de proteção individual (luvas descartáveis de borracha, máscara, gorro e capote), além de lavagem repetida das mãos com água e sabão, seguida de desinfecção com álcool 70%. Foram utilizados exclusivamente equipamentos e materiais estéreis e descartáveis, desprezados após a utilização em locais próprios (lixo hospitalar).

Figura 11 – Materiais preparados para a coleta das amostras de saliva e esfregaço de mucosa bucal. a) material disposto em uma superfície de apoio; b) utilização do invólucro da luva estéril como campo.

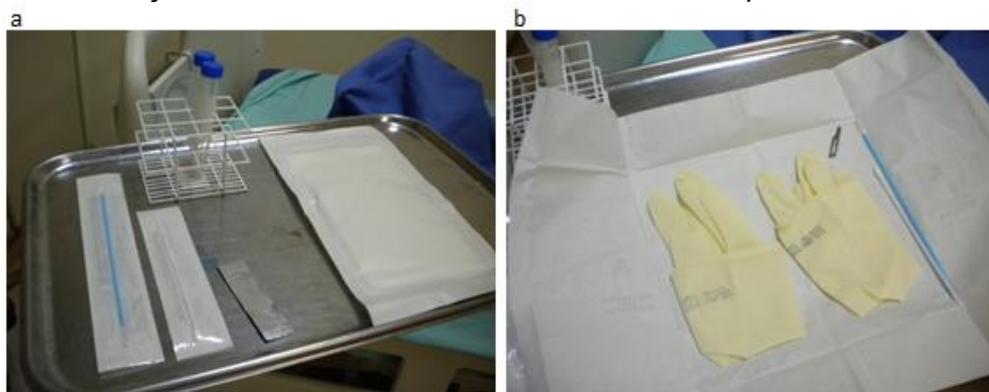


Figura 12 – Coleta de saliva. a) com “swab” de Rayon; b) corte do “swab”; c) quebra do “swab” para acondicionamento em tubo Falcon.



Figura 13 – Esfregaço da mucosa bucal. a) esfregaço da mucosa bucal com escova cervical; b) corte da escova cervical; c) quebra da escova cervical para acondicionamento em tubo Falcon.

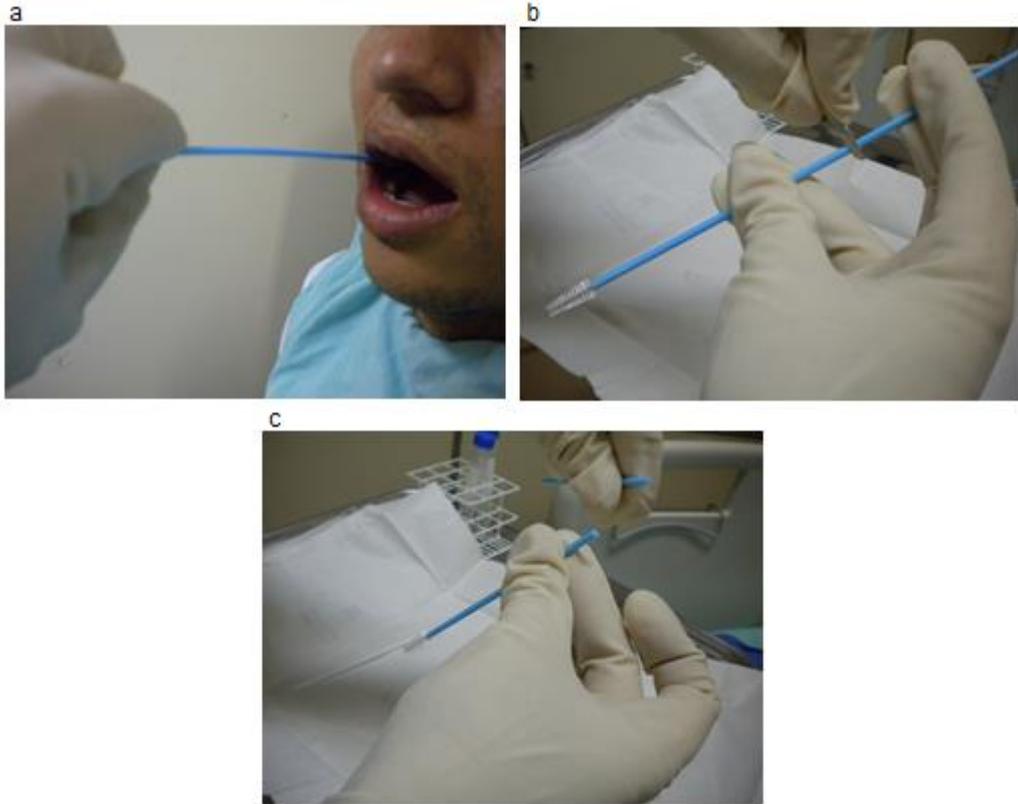


Figura 14 – Saliva e esfregaço da mucosa bucal acondicionados em tubos Falcon.



4.4 Extração do DNA para PCR

A extração foi realizada segundo Sambrook *et al.* (1989) (modificado), nos tubos onde a saliva e as células da mucosa bucal foram colocadas separadamente; adicionou-se 300 µL de tampão de lise (NaCl 1 M; Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0) e 200µL de SDS 10% seguido de homogeneização vigorosa em vórtex. Adicionou-se 20 µL de proteinase K (20mg/mL) e incubou-se a 65°C por 1 hora, em seguida adicionou-se 400µL de clorofórmio procedendo-se a agitação vigorosa até completa homogeneização, centrifugando-se o material a 10.000 rpm por 10 minutos.

Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de 1,5µL e completou-se o volume com isopropanol 100%, homogeneizando-se por inversão até a precipitação do DNA. Centrifugou-se a 10000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado por inversão. Adicionou-se 1mL etanol 70% e centrifugou-se a 10000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado por inversão. O passo foi repetido mais duas vezes. O pellet seco foi ressuspenso com 50 µL de água ultrapura e incubado a 20°C e posteriormente armazenado a – 4°C.

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase foi primeiramente padronizada. Cada reação possuía o volume de 25µL com as seguintes concentrações finais de reagentes: tampão 1X da Invitrogen, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,16 pmol cada iniciador, TaqDNA polimerase 2U da Invitrogen, DNA 1 µL e água 19,75 µL. Foram utilizados os iniciadores P1: 5' (C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' P2: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3', que amplificam a região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania*, tamanho de fragmento de 120pb.

As reações foram realizadas em termociclador da marca BIORAD, modelo T100 thermalcycle; as condições de ciclagem dos reagentes utilizadas foram: 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 54,5 °C por 1 minuto para anelamento, 72 °C por 30 segundos para extensão e mais uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Em todas as reações foi incluído um controle positivo (C+), a cepa referência *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP/75)

fornecida pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (Belo Horizonte, Brasil) e um controle negativo (C-) (mix + água).

4.6 Eletroforese em gel de agarose

A verificação da amplificação do fragmento de DNA de *Leishmania* foi realizada utilizando-se 12 µL do produto da PCR acrescidos de 3 µL de tampão da amostra (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 30% de glicerol) por eletroforese submarina horizontal em gel de agarose a 2%, em tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA).

Após a eletroforese, o gel de agarose foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e os produtos de amplificação visualizados sob a luz ultravioleta em transiluminador (Macrovue Uvis-20) da Amersham Pharmacia. Para a detecção da presença de um fragmento de 120 pb para o gênero *Leishmania* utilizou-se marcador molecular de DNA de 50 pb e controle positivo.

4.7 Estatística descritiva e analítica

Os dados obtidos por meio de formulário específico para o estudo foram armazenados em um banco de dados e organizados em planilhas no programa Microsoft Excel® (Office 2003). A análise descritiva está apresentada sob forma de tabela onde os dados são expressos por número (N) e percentual (%).

Com o objetivo de verificar se houve associação significativa entre PCR em saliva e PCR em esfregaço de mucosa bucal, foi aplicado teste de χ^2 ou exato de Fisher que foram considerados estatisticamente significantes com o nível de significância menor que 0,05 ou 5%. A análise foi processada pelo *software* estatístico BioEstat (versão 5.3).

4.8 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e aprovado em 4 de Julho de 2014, com parecer nº 709.560, protocolo 19312913.6.0000.0021 (ANEXO A).

Todos os pacientes que fizeram parte desta pesquisa tiveram o TCLE assinado antes de sua participação no trabalho.

Quanto à questão da confidencialidade, todas as informações foram protegidas por códigos ou iniciais do entrevistado, e nenhum formulário do estudo, exceção feita ao TCLE, conteve a identificação completa do entrevistado. Os materiais da pesquisa foram todos guardados em local protegido, sob supervisão direta do investigador principal do projeto.

O acesso aos dados foi de atribuição exclusiva do investigador principal. Os dados agregados do projeto foram armazenados em um único computador, com adequada capacidade de memória. Este computador é protegido por senha de entrada e de acesso a conteúdos específicos.

5 RESULTADOS

Foram estudados 30 pacientes com diagnóstico confirmado de LV entre julho de 2014 e fevereiro de 2015. Verificou-se um claro predomínio do sexo masculino. No que se refere à faixa etária, a média de idade encontrada foi de 39 e variou entre 18 e 83 anos. Observou-se uma maior incidência entre 20 a 39 anos; destaca-se ainda que a faixa etária de 40 a 59 também concentrou grande quantidade de casos. Os pacientes coinfectados LV/HIV/AIDS representavam 30% dos casos e eram predominantemente do sexo masculino (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos casos de leishmaniose visceral por faixa etária, gênero e coinfeção com HIV, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)

Variáveis	Feminino		Masculino		Total	
	N	%	N	%	N	%
Faixa etária						
Até 19 anos	1	3,3	1	3,3	2	6,7
20 a 39	3	10,0	13	43,3	16	53,3
40 a 59	1	3,3	7	23,4	8	26,7
Acima de 59	3	10,0	1	3,3	4	13,3
Coinfeção com HIV/AIDS						
Sim	1	3,3	8	26,7	9	30,0
Não	7	23,3	14	46,7	21	70,0

Na Tabela 2, entre as manifestações clínicas mais frequentes, destacaram-se febre, fraqueza, emagrecimento, palidez, esplenomegalia e hepatomegalia. O tempo decorrido entre o início dos sintomas e o início do tratamento variou de 5 a 180 dias, com média de 30,9 dias.

Tabela 2 – Frequência das manifestações clínicas observadas na internação de pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)

Sintomas (1)	Pacientes	
	N	%
Fraqueza	26	86,6
Emagrecimento	25	83,3
Febre	24	80,0
Palidez	22	73,3
Esplenomegalia	21	70,0
Hepatomegalia	20	66,6
Tosse	13	43,3
Diarreia	11	36,6
Quadro infeccioso	9	30,0
Hemorragia	9	30,0
Icterícia	9	30,0
Edema	5	16,6

(1) Cada paciente poderia apresentar um ou mais sintomas

Com relação ao tratamento, a droga mais utilizada foi a anfotericina B lipossomal, seguida de anfotericina B desoxicolato e antimoniato pentavalente (Tabela 3).

Tabela 3 – Casos de leishmaniose visceral segundo terapia medicamentosa administrada, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)

Tratamento	Coinfecção HIV/AIDS				Total	
	Sim		Não		N	%
	N	%	N	%		
Antimoniato Pentavalente	-	-	4	13,3	4	13,3
Anfotericina B Desoxicolato	-	-	8	26,7	8	26,7
Anfotericina B Lipossomal	9	30,0	9	30,0	18	60,0
Total	9	30,0	21	70,0	30	100,0

Dos exames laboratoriais, o teste imunocromatográfico rápido foi o mais realizado e mostrou elevada positividade (Tabela 4). A pesquisa direta do parasito em aspirado de medula óssea foi realizada em 17 pacientes (56%), sendo positiva em 53% deles. A cultura de aspirado medular foi realizada em 16 dos 17 pacientes submetidos à coleta desse material e demonstrou o menor índice de positividade dos exames realizados. Em relação ao exame de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), 69,2% tiveram resultados positivos para a doença (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados dos testes laboratoriais utilizados para confirmação da leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)

Testes diagnósticos (1)	Pacientes	
	Nº Realizado	Positividade % (N)
Teste rápido	26	92,3 (24)
Aspirado de medula óssea	17	53,0 (9)
Cultura	16	25,0 (4)
Imunofluorescência indireta	13	69,2 (9)

(1) Cada paciente poderia realizar um ou mais testes diagnósticos

Nas amostras positivas para PCR em saliva e esfregaço de mucosa bucal (Figura 15 e 16), houve a amplificação de fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb), utilizando-se o par de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania*. Na Tabela 5 e Figura 17, pode-se observar a positividade de 73,3% (22/30) na saliva e 53,3% (16/30) em células da mucosa bucal.

Figura 15 – Produtos de amplificação da PCR em amostras de saliva com os iniciadores P1 e P2 em gel de agarose 2% - M – marcador de 50pb, 1 a 15 - Amostras de saliva, 16 – cepa referência *Leishmania infantum* (MHOM/74/PP75), 17 – Controle negativo.

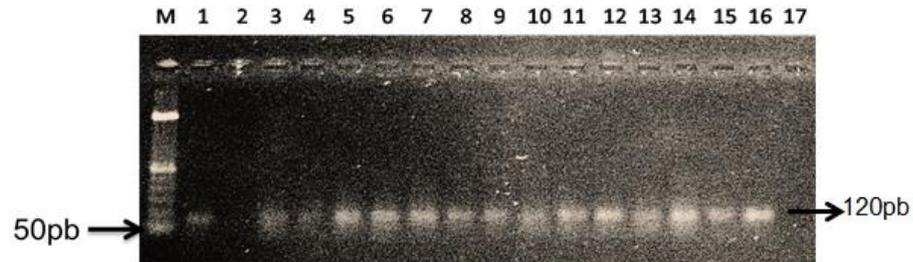


Figura 16 – Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores P1 e P2 em gel de agarose 2% - M – marcador de 50pb, 1 a 14 – Amostras de esfregaço da mucosa bucal, 15 – cepa referência *Leishmania infantum* (MHOM/74/PP75), 16 – Controle negativo.

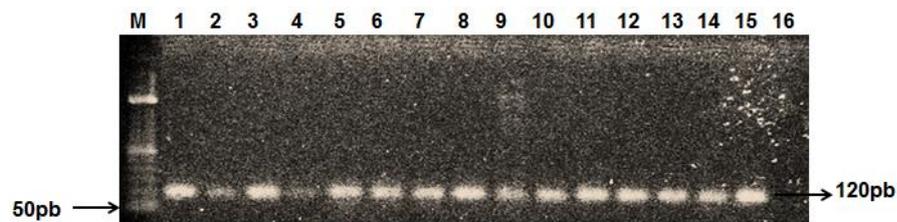
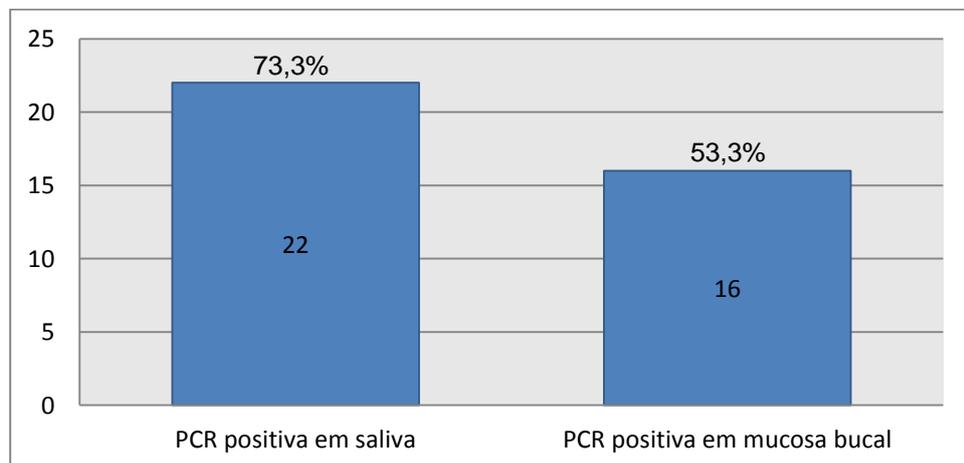


Tabela 5 – Resultado da PCR em saliva e células da mucosa bucal em pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)

Pacientes	Saliva				Células da mucosa bucal			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Total	22	73,3	8	26,7	16	53,3	14	46,7

Figura 17 – Positividade da PCR em saliva e células da mucosa bucal em pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)



Observa-se que a PCR utilizando esfregaço de mucosa bucal apresentou menor positividade em relação a PCR em saliva, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$).

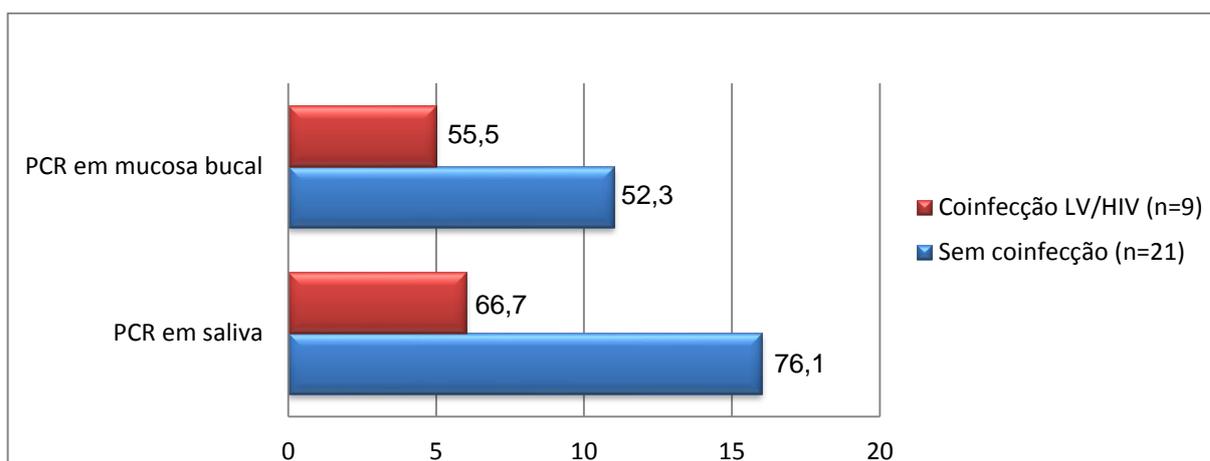
No geral, 76,6% (23/30) dos pacientes apresentaram pelo menos uma amostra positiva pela PCR; apenas um paciente (3,3%) apresentou positividade somente em células da mucosa bucal e sete pacientes (23,3%) apenas na saliva.

A distribuição da positividade na PCR segundo o material biológico e coinfeção LV/HIV/AIDS está representada na tabela 6 e na figura 18. As amostras de pacientes coinfectados (9/30) tiveram uma positividade de 66,7% (6/9) na saliva e 55,5% (5/9) em células da mucosa bucal.

Tabela 6 – Positividade da PCR realizada em saliva e células da mucosa bucal em pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)

Coinfecção com HIV	Saliva		Células da mucosa bucal	
	Realizado	Positividade	Realizado	Positividade
Sim	9	66,7% (6)	9	55,5% (5)
Não	21	76,1% (16)	21	52,3% (11)

Figura 18 - Positividade da PCR realizada em saliva e células da mucosa bucal em pacientes com leishmaniose visceral, Hospital Universitário/UFMS – 2014 (n= 30)



6 DISCUSSÃO

A suscetibilidade humana a LV é de fato bem conhecida, podendo atingir ambos os sexos e todas as faixas etárias (OLIVEIRA *et al.*, 2008; ALVARENGA *et al.*, 2010). A LV tem sido mais frequente em crianças com até quatro anos, entretanto, alguns autores têm identificado um grande acometimento entre adultos jovens (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; XAVIER-GOMES *et al.*, 2009), concordando com os dados do nosso estudo.

Assim como verificado por Albuquerque *et al.* (2009) e Alvarenga *et al.* (2010), houve predomínio da doença no sexo masculino (53,3%). Esta maior incidência também foi igualmente identificada em outros estudos, como os realizados por Oliveira (2011) em Minas Gerais, no período de 2007 a 2010, por Silva *et al.* (2008), no Maranhão durante 2004 a 2006 e por Botelho e Natal (2009) no Mato Grosso do Sul, no período de 2001 a 2006. Na Espanha, um estudo realizado por Gil-Pietro *et al.* (2011) avaliando pacientes internados com leishmaniose identificou que a maioria era do sexo masculino (73%), com idade média de 33,5 anos.

A maior suscetibilidade masculina à infecção tem sido atribuída principalmente a fatores comportamentais, como atividades de trabalho e lazer, com maior exposição ao vetor. Fatores genéticos e hormonais também têm sido considerados (XAVIER-GOMES *et al.*, 2009; ALVARENGA *et al.*, 2010).

A LV nos últimos anos assumiu caráter de doença oportunista em pessoas infectadas com o HIV e a concomitância de ambas as infecções pode reduzir a sobrevida dos pacientes (CHOI; LERNER, 2001). Isso foi evidenciado em estudo realizado por Druzian *et al.* (2015), analisando fatores de risco para o óbito por LV onde a coinfeção com HIV/SIDA esteve presente em 36,6% dos casos, e por Góes Melo e Sierpe (2012), relatando que a coinfeção pelo HIV tem sido descrita em 21,2% dos casos de LV no mundo, podendo atingir índices de 15-30% como na Etiópia, concordando com valores do presente estudo. Entretanto, o percentual de coinfeção LV/HIV/AIDS encontra-se superior aos valores descritos para outros países endêmicos em desenvolvimento, que variam de 2,0 a 9,0% (SOUZA-GOMES *et al.*, 2011).

No Brasil, de acordo com os dados do SINAN, o número de casos de coinfeção LV/HIV/AIDS aumentou de 112 em 2007 para 282 em 2013. Essa associação foi notificada com maior frequência nos estados de Minas Gerais

(14,8%), Ceará (15,6%), Piauí (12,9%), Mato Grosso do Sul (12,2%) e São Paulo (10,7%). Estes dados indicam o risco cada vez mais presente de uma sobreposição das áreas de risco para LV e HIV (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

A distribuição dos casos de LV/HIV/AIDS nesse estudo foi predominante no sexo masculino, mantendo-se o padrão encontrado para os casos dessa coinfeção no Brasil, no período de 2001 a 2005 (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2007). Esse achado assemelha-se ao encontrado em Uganda (ALVAR *et al.*, 2008) e na Europa (DESJEUX; ALVAR, 2003).

A LV é uma doença que pode apresentar um largo espectro de manifestações clínicas, desde formas assintomáticas até a forma clássica, com presença de hepatoesplenomegalia associada à febre, emagrecimento, pancitopenia e hipergamaglobulinemia, além de importante queda do estado geral (NUNES *et al.*, 2010; RIGO; RIGO; HONER, 2009). A esplenomegalia é um sinal clássico da LV, que pode levar à queixa de dor e distensão abdominal. Ela tem sido observada em mais de 90% dos casos de LV. No Brasil, 95% dos acometidos apresentam perda de peso. Segundo, outras manifestações como tosse e/ou diarreia têm sido menos frequentes (MACHADO DE ASSIS; RABELLO; WERNWCK, 2012).

No presente estudo, praticamente todos os pacientes apresentaram os principais sinais e sintomas da doença descritos na literatura. Variações na sintomatologia podem ser ocasionadas por fatores ligados ao tempo de diagnóstico (NUNES *et al.*, 2010).

As manifestações clínicas mais frequentes nos pacientes coinfectados foram semelhantes àquelas observadas em pacientes com LV clássica, corroborando o estudo realizado por Souza-Gomes *et al.* (2011). Existem casos de indivíduos coinfectados LV/HIV/AIDS cuja leishmaniose evolui sem nenhum impacto aparente da infecção pelo HIV. A gravidade dos casos está diretamente associada à condição imunológica do paciente, avaliada por meio da contagem de linfócitos TCD4+, visto que a coinfeção acelera o desenvolvimento da LV, manifestando-se, principalmente, quando a contagem de linfócitos T CD4+ está menor do que 200 (CRUZ *et al.*, 2006; BRASIL, 2015).

A tríade clássica da LV é também a manifestação mais comum dessa doença na coinfeção: hepatoesplenomegalia, febre e pancitopenia são observadas em 75% dos casos. Relatos na literatura descrevem frequências relativas das manifestações clínicas nos pacientes, variando de 80% a 87% para febre, de 12% a 57% para

adenopatia, de 70% a 90% para astenia e emagrecimento, de 49% a 100% para anemia, de 54% a 90% para esplenomegalia, de 34% a 85% para hepatomegalia, de 56% a 95% para leucopenia, e de 52% a 93% para plaquetopenia (BRASIL, 2015).

Dados da literatura descrevem grande variabilidade em relação ao tempo de evolução da doença, com períodos que variam de dois a seis meses em média (OLIVEIRA *et al.*, 2010; PASTORINO *et al.*, 2002), observados também neste estudo. A presença dos sinais e sintomas que sugerem LV deve alertar o profissional de saúde para o diagnóstico da doença, pois o reconhecimento precoce e o tratamento oportuno são essenciais para o aumento da possibilidade de cura.

Há uma grande limitação no arsenal terapêutico disponível para tratamento da leishmaniose, sendo os antimoniais pentavalentes os fármacos de 1ª escolha no Brasil. Embora apresentem registros de altos índices de cura da LV no país, os fármacos disponíveis apresentam eficácia limitada e algumas vezes toxicidade significativa e efeitos adversos (LINDOSO e GOTO, 2006). Cada vez mais tem sido ressaltada essa potencial toxicidade, que pode levar à falência renal, pancreatite aguda ou cardiotoxicidade, e em consequência, à morte. Pacientes com mais de 45 anos e LV apresentam um maior risco de morte ou de reações adversas mais severas durante o tratamento com os antimoniatos do que os pacientes mais jovens (CHAPPUIS *et al.*, 2011).

Nos Estados Unidos e Europa mediterrânea a anfotericina B tem sido o fármaco de primeira escolha para LV (MURRAY, 2012). A melhor eficácia terapêutica da anfotericina B lipossomal, principalmente em áreas onde há resistência ao tratamento com os antimoniatos, vem aumentando o seu emprego em todo o mundo como tratamento para LV. Um grande obstáculo para o seu uso ainda é o alto custo (BERN *et al.*, 2006).

O Ministério da Saúde, em 2013, ampliou a indicação de uso desse fármaco para o tratamento da LV no Brasil, passando esta a ser considerada a droga de primeira escolha também para menores de um ano de idade, coinfectados com HIV, comorbidades, uso de medicamentos que comprometam a imunidade e falha terapêutica ao antimoniato de N-metil glucamina (BRASIL, 2013).

Neste estudo, todos os pacientes com mais de 50 anos utilizaram anfotericina B lipossomal. Também seguindo as recomendações, todos os pacientes portadores da coinfeção LV/HIV/AIDS foram tratados com essa medicação. Os pacientes que

receberam antimoníato de N-metil glucamina foram os mais jovens do estudo, com idade variando entre 18 e 22 anos e aqueles que foram tratados com anfotericina B tinham idade entre 24 e 45 anos e não apresentavam indicações que justificassem o uso de anfotericina B lipossomal.

O diagnóstico considerado padrão ouro na LV ocorre pelo encontro de formas parasitárias, principalmente pela pesquisa direta em AMO e/ou pela mielocultura. Em algumas localidades a pesquisa direta tem sido a técnica mais empregada, mas os métodos imunológicos têm sido cada vez mais utilizados pela maior praticidade. No presente estudo, o exame parasitológico direto e a cultura foram realizados em pouco mais da metade dos casos.

A positividade da microscopia direta tem variado em diversos estudos, de 66,0 a 91,8% (OLIVEIRA, 2011; XAVIER-GOMES *et al.*, 2009). Apesar do relato de poucas complicações, o aspirado de medula óssea é um procedimento invasivo, com necessidade de treinamento e habilidade técnica, além de estar associado a dor e potenciais riscos de complicações (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Neste estudo, a RIFI foi solicitada em menos da metade dos casos, embora seja a reação sorológica mais utilizada para o diagnóstico da LV no Brasil, com uma sensibilidade que varia de 55 a 96%, e especificidade de 70 a 98% (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

Com o objetivo de agilizar o diagnóstico nas unidades de referência, o Ministério da Saúde implantou o teste rápido, que utiliza o antígeno rk39, que, além de ser um teste não invasivo, tem demonstrado boa sensibilidade (ROMERO; BOELAERT, 2010). O Kalazar-Dectect mostra sensibilidade e especificidade de 83 a 92,3% e 82,3-96%, respectivamente. O It-Leish tem sensibilidade entre 89 a 96% e especificidade variando de 90 a 100% (ASSIS *et al.*, 2008; PERUHYPE-MAGALHÃES; ASSIS; RABELLO, 2012). Neste estudo, o teste rápido foi o exame mais empregado, com elevada positividade, indicando grande utilidade para o diagnóstico da LV.

Diferentes métodos podem ser utilizados para o diagnóstico da LV, que rotineiramente é realizado por meio da associação de parâmetros clínicos e epidemiológicos a uma confirmação laboratorial por meio de exames parasitológicos, sorológicos e/ou moleculares. No presente estudo não foi possível a comparação entre os métodos diagnósticos dos pacientes e a PCR em saliva e em células da

mucosa bucal, pois os pacientes não foram submetidos a todos os testes diagnósticos tendo em vista que, frente a um resultado positivo em um deles, os outros exames não foram solicitados.

O diagnóstico precoce é importante para evitar a gravidade dos casos e, conseqüentemente, a morte do paciente (SCHALLING; OSKAM, 2002). Nesse contexto, os métodos convencionais apresentam algumas limitações. A visualização do parasito em microscópio e a cultura são pouco sensíveis, além da cultura necessitar de maior tempo para a definição do diagnóstico. Já os ensaios baseados em sorologia, mesmo sendo úteis, possuem desvantagens ao apresentarem reações cruzadas e resultado diferenciado de acordo com o tempo de infecção, não sendo indicados para diagnóstico de pacientes assintomáticos e imunossuprimidos (GONTIJO; MELO, 2004).

Considerando essas limitações e a necessidade de aprimorar técnicas para um diagnóstico seguro, os métodos moleculares vêm sendo utilizados para identificação de grupos e espécies de *Leishmania*, em diferentes amostras clínicas, isolados de cultura, bem como em flebotômicos (MICHALSKY *et al.* 2002; VERMA *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de amostras biológicas, tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel-filtro, podem ser utilizados como fonte de material para a reação em cadeia da polimerase, com a finalidade de detectar DNA do parasito (TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003), mostrando que a PCR é um método útil no diagnóstico da LV (PANDEY *et al.*, 2009).

Considerando que a biópsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas de coleta adequadas para uso fora do ambiente hospitalar, muitos centros de pesquisas têm avaliado o uso da PCR em sangue periférico para o diagnóstico de LV (LACHAUD *et al.*, 2001).

O uso da PCR utilizando sangue periférico como material biológico demonstrou sensibilidade variando de 79% a 100% (CASCIIO *et al.*, 2002; CRUZ *et al.*, 2006; KAOUECH *et al.*, 2008; FRAGA *et al.*, 2010). Segundo Cruz *et al.* (2006), a positividade em aspirado de medula óssea foi de 100% e de 79% em sangue periférico.

A PCR de DNA extraído a partir de esfregaços de medula óssea mostrou ser uma ferramenta adequada para confirmar o diagnóstico em pacientes com LV e

pode também ser útil no diagnóstico de casos difíceis, com sensibilidade variando de 69% a 97% (GANGNEUX *et al.*, 2003; BRUSTOLONI *et al.*, 2007; PANDEY *et al.*, 2010).

A PCR também tem se mostrado uma ferramenta altamente sensível e específica para o diagnóstico da LV em pacientes imunocomprometidos. Em estudo realizado por Antinori *et al.* (2007) a sensibilidade da PCR foi de 95,7% para amostras de aspirado de medula óssea e de 98,5% para amostras de sangue periférico. Em pacientes infectados pelo HIV, a sensibilidade da PCR em sangue periférico variou de 82-98% (PIZZUTO *et al.*, 2001; PIARROUX *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 1996).

Técnicas não invasivas, mais simples e sensíveis, já foram desenvolvidas para o diagnóstico da LV canina usando amostras de urina ou amostras de “swab” conjuntival, com sensibilidade variando entre 90 a 92% nos esfregaços conjuntivais, porém para seres humanos este método não é recomendado, pois está associado à possibilidade de danificação da córnea (LEITE *et al.*, 2010; PILATTI *et al.*, 2009; STRAUSS-AVALI *et al.*, 2004).

Amostras de “swabs” bucais seriam mais práticas para o diagnóstico da LV, especialmente em condições de campo (SINGH *et al.*, 2009), uma vez que as mesmas têm uma vantagem distinta como espécime biológico porque não requerem equipamento especial para a amostragem, conservação e transporte especializado (KAUFMAN; LAMSTER, 2002).

“Swabs” bucais têm sido utilizados como substrato em reações de PCR para o diagnóstico de LV. Vaish *et al.* (2011) avaliaram “swabs” bucais de 148 pacientes com exame parasitológico positivo para LV. Para o diagnóstico molecular foi utilizado um método não invasivo de coleta de células esfoliativas da mucosa bucal empregando-se o kit Hi-Media “swab” estéril. A sensibilidade da PCR foi de 83,11%. Estudo realizado por Galaï *et al.* (2011) foram incluídos 37 pacientes pediátricos com LV. Eles não apresentavam doenças imunossupressoras ou infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Fluidos orais foram coletados por meio de um dispositivo Oracol onde, resumidamente, a haste de espuma foi retirada do dispositivo de armazenamento e esfregada sobre as gengivas da criança até que ficasse completamente embebida em saliva. A sensibilidade do ensaio de PCR realizada em células desse fluido oral foi de 94,6%.

Amostras orais de pacientes HIV positivos também foram analisadas por PCR. Foi relatada, pela primeira vez, a presença de DNA de *L. donovani* em amostras de “swab” bucal de pacientes HIV coinfectedos com LV em estudo realizado por Das *et al.* (2014), com células esfoliativas da mucosa bucal. A população do estudo consistiu de 22 pacientes, sendo que 19 dos 22 casos (86,3%) foram considerados positivos para este teste.

No presente estudo, a positividade em esfregaço bucal de coinfectedos foi menor do que em saliva, apontando para a possibilidade do uso desse último espécime biológico no diagnóstico molecular em casos de coinfeção LV/HIV/AIDS.

Embora os ensaios da PCR tenham mostrado uma alta sensibilidade e especificidade na detecção de DNA de *Leishmania* em estudos que utilizaram métodos não invasivos de coleta (Vaish *et al.*, 2011; Galai *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2014), alguns pacientes do presente estudo não tiveram DNA de *Leishmania* detectável nas amostras aqui estudadas, devendo-se levar em conta que vários fatores podem estar relacionados com os resultados obtidos.

Em sangue periférico, a eficiência da PCR em detectar a presença do parasito em indivíduos assintomáticos pode depender de fatores tais como tipo de amostra avaliada, método de extração, alvo e *primers* utilizados, quantidade de DNA detectável e a área de estudo (MORENO *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2008). Indivíduos com teste sorológico positivo, mas que apresentam kDNA negativo pela PCR, indicam que *L. infantum* circula de forma intermitente e com baixa densidade parasitária (CARDO *et al.*, 2006; LE FICHOUX *et al.*, 1999). Segundo Viana *et al.* (2008), em determinado momento pode não haver DNA detectável circulante, mas há produção de anticorpos, e em outro momento, o parasito pode ser detectado justificando a PCR positiva.

Sendo assim, a menor positividade aqui encontrada, tanto para saliva como em células da mucosa bucal, provavelmente se deve às diferenças metodológicas e de amostragem dos pacientes, devendo-se considerar ainda, a variação na quantidade de DNA celular que pode ser extraído a partir de fluidos orais e o não conhecimento da carga parasitária nesse material, assim como a fase de evolução da doença.

Sabe-se que a principal forma de transmissão da LV ocorre por meio da picada dos flebotomíneos fêmeas nos hospedeiros vertebrados. Entretanto, segundo estudos realizados por Fukutani *et al.* (2014) e França *et al.* (2013), a infecção

assintomática está presente entre a população de doadores de sangue, sendo necessário que se faça uma triagem destes também para LV, devido ao risco de infecção por meio da transfusão sanguínea.

Questões sobre a transmissão de diversas patologias através de exposição à saliva, como, por exemplo, mononucleose infecciosa, rubéola, parotidite e hepatite B (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010a), e a possível transmissão do HCV (ROY *et al.*, 1995), HPV (ANDREWS *et al.*, 2009) e HHV-8 (BLACKBOURN *et al.*, 1998; WIDMER *et al.*, 2006) por meio de exposição a este fluido corporal já foram levantadas. Pode-se, portanto, especular se seria possível considerar a saliva como fonte do agente etiológico da leishmaniose visceral, já que a presença do DNA desse parasito tem sido demonstrada em fluidos orais, como já discutido. Não se observa na literatura estudos que abordem esse tema, nem o uso frequente da PCR na saliva para o diagnóstico da LV, mostrando mais uma vez a necessidade de novas pesquisas nesse campo.

7 CONCLUSÕES

Os resultados aqui descritos apontam para a possibilidade da utilização da saliva como substrato no diagnóstico da leishmaniose visceral quando empregada a PCR, podendo constituir uma alternativa não invasiva de investigação em indivíduos com suspeita de LV. No entanto, estes resultados, bem como os demais dados publicados em literatura sobre o uso de fluidos orais para diagnóstico da LV por PCR, são preliminares.

Este estudo mostrou que a pesquisa de DNA de *Leishmania* por PCR na saliva com os iniciadores P1/P2 apresentou maior positividade do que quando se emprega esfregaço de mucosa bucal. Esses resultados são difíceis de serem interpretados, pela escassez de estudos que aplicaram substratos semelhantes em testes para diagnóstico da leishmaniose visceral e que possam servir de comparação com os dados obtidos.

A coleta de saliva e/ou de esfregaço da mucosa bucal oferece vantagens sobre a coleta de sangue e de aspirado medular para o diagnóstico da LV, pois permite uma investigação não invasiva dos casos suspeitos. A coleta é menos dolorosa e estressante, oferece mais segurança para o profissional de saúde, eliminando os riscos de acidentes pérfuro-cortantes, tem melhor aceitação do paciente e proporciona facilidade para estudos de grandes populações, podendo ser realizada em locais onde a coleta por meios invasivos é inconveniente.

Faz-se necessária a utilização de novos meios de diagnóstico na LV. O emprego de saliva e esfregaços de mucosa bucal no diagnóstico dessa patologia precisa ser mais estudado.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, L. F.; SANTOS, J. H. A.; COLLADO, C. S. C.; CUNHA, M. G. S.; NAVECA, F. G. *Mycobacterium leprae* in the periodontium, saliva and skin smears of leprosy patients. **Revista Odonto Ciência**, v. 25, n. 2, p. 148-153, feb. 2010.

AIDAR, M.; LINE, S. R. P. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, n. 2, p. 148-152, mar. 2007.

ALBUQUERQUE, P. L.; SILVA JUNIOR, G. B.; FREIRE, C. C.; OLIVEIRA, S. B.; ALMEIDA, D. M.; SILVA, H. F.; CAVALCANTE, M. S.; SOUZA, A. Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n. 4, p. 330-333, oct. 2009.

ALLAIN, D. R.; KAGAN, .I G. A direct agglutination test for leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 24, n. 2, p. 223-226, mar. 1975.

ALVAR, J.; APARICIO. P.; ASEFFA, A.; BOER, M. D.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; TER HORST, R.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MORENO, J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the Second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 334-359, apr. 2008.

ALVARENGA, D. G.; ESCALDA, P. M.; COSTA, A. S.; MONREAL, M. T. Visceral leishmaniasis: retrospective study on factors associated with lethality. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194-197, mar-apr. 2010.

ANDREWS, E.; SHORES, C.; HAYES, D. N.; COUCH, M.; SOUTHERLAND, J.; MORRIS, D.; SEAMAN, W. T.; WEBSTER-CYRIAQUE, J. Concurrent human papillomavirus-associated tonsillar carcinoma in 2 couples. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 6, p. 882–887, sep. 2009.

ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; MAGNI, C.; Orlando, G.; GRAMICCIA, M.; ACQUAVIVA, V.; FOSCHI, A.; CORVASCE, S.; COLOMBA, C.; TITONE, L.; PARRAVICINI, C.; CASCIO, A.; CORBELLINO, M. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected e HIV uninfected. **Clinical Infectious Disease**, v. 44, n. 12, p. 1602–1610, mar. 2007.

ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BIÁ, M.; CALDAS, A. J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 107-116, jun. 2008.

BALAMANE, M.; WINTERS, M. A.; DALAI, S. C.; FREEMAN, A. H.; TRAVES, M. W.; ISRAELSKI, D. M.; KATZENSTEIN, D. A.; KLAUSNER, J. D. Detection of HIV-1 in saliva: implications for case-identification, clinical monitoring and surveillance for drug resistance. **The Open Virology Journal**, v. 4, p. 78-83, may. 2010.

BERN, C.; ADLER-MOORE, J.; BERENQUER, J.; BOELAERT, M.; DEN BOER, M.; DAVIDSON, R. N.; FIQUERAS, C.; GRADONI, L.; KAFETZIS, D. A.; RITMEIJER, K.; ROSENTHAL, E.; ROYCE, C.; RUSSO, R.; SUNDAR, S.; ALVAR, J. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Disease**, v. 43, n. 7, p. 9179-24, aug. 2006.

BLACKBOURN, D.J.; LENNETTE, E.T.; AMBROZIAK, J.; MOURICH, D.V.; LEVY, J.A. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. **The Journal of Infectious Diseases**, v.177, n. 1, p. 213–216, jan. 1998.

BOPPANA, S.B.; ROSS, S.A.; SHIMAMURA, M.; PALMER, A.L.; AHMED, A.; MICHAELS, M.G.; SANCHEZ, P.J.; BERNSTEIN, D.I.; TOLAN, R.W.; NOVAK, Z.; CHOWDHURY, N.; BRITT, W.J.; FOWLER, K.B. Saliva polymerase-chain-reaction

assay for cytomegalovirus screening in newborns. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 22, p. 2111–2118, jun. 2011.

BOTELHO, A.C.A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 503-508, set. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos**. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Orientações quanto à utilização do teste imunocromatográfico humano para diagnóstico de leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 02 de dez. 2010. Disponível em: <<http://www.saude.ms.gov.br/controle/ShowFile.php?id=113357>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral: Recomendações clínicas para a redução da letalidade**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: MS, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVS divulga novo protocolo de tratamento da leishmaniose visceral. **Portal da Saúde**, 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/7700>>. Acesso em: 31 mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV.**

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 1. ed., rev. e ampl. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015.

BRUSTOLONI, Y. M.; LIMA, R. B.; DA CUNHA, R. V.; DORVAL, M. E.; OSHIRO, E. T.; DE OLIVEIRA, A. 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**, v. 102, n. 4, p. 497-500. Jun. 2007.

CAMARGO, L. M.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, jan-mar.2003.

CARDO, L.J. *Leishmania*: risk to the blood supply. **Transfusion**, v. 46, n. 9, p. 1641–1645, sep. 2006.

CASCIO, A.; CALATTINI, S.; COLOMBA, C.; SCALAMOGNA, C.; GALAZZI, M.; PIZZUTO, M.; CAMILLI, R.; GRAMICCIA, M.; TITONE, L.; CORBELLINO, M.; SPINELLO, A. Polymerase Chain Reaction in the diagnosis and prognosis of mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. **Pediatrics**, v. 109, n. 2, p. 27-31, feb. 2002.

CHAPPUIS, F.; ALIROL, E.; WORKU, D. T.; MUELLER, Y.; RITMEIJER, K. High mortality among older patients treated with pentavalent antimonials for visceral leishmaniasis in East Africa and rationale for switch to liposomal amphotericin B. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 455-456, jan. 2011.

CHEN, L.; LIU, F.; FAN, X.; GAO, J.; CHEN, N.; WONG, T.; WU, J.; WEN, S. W. Detection of hepatitis B surface antigen, hepatitis B core antigen, and hepatitis B virus DNA in parotid tissues. **International Journal of Infectious Disease**, v. 13, n. 1, p. 20–23, jan. 2009.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, p. 175-182, aug. 2001.

CHUANG, A.Y.; CHUANG, T.C.; CHANG, S.; ZHOU, S.; BEGUM, S.; WESTRA, W.H.; HA, P. K.; KOCH, W.M.; CALIFANO, J.A. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 44, n. 10, p. 915–919, oct. 2008.

CORVALAN, F. H.; SAMPAIO, R. N. R.; BRUSTOLONI, Y. M.; ANDREOTTI, R.; LIMA JÚNIOR, M. S. C. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 98-102, feb. 2011.

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

COSTA, S. R.; JUNIOR. A.O.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. T Cell Response of Asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant *Leishmania* Antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, v. 3, p. 367–370, jun. 1999.

CRUZ, I.; NIETO, J.; MORENO, J.; CANAVATE, C.; DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 357-388, mar. 2006.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 117-118, feb. 2006.

DAS, S.; HALDER, A.; RABIDAS, V. N.; MANDAL, A.; DASA, P. Specific noninvasive detection of *Leishmania donovani* in desquamated buccal cell swab samples from

human visceral leishmaniasis-HIV coinfecting patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1238–1241, apr. 2014.

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **British Medical Journal**, v. 326, n. 7385, p. 377-382, feb. 2003.

DE VRIES, H. G.; COLLEE, J. M.; VAN VELDHUIZEN, M. H.; ACHTERHOF, L.; SMIT SIBINGA, C. T.; SCHEFFER, H.; BUYS, C. H. C. M.; TENKATE, L. P. Validation of the determination of deltaF508 mutations of the cystic fibrosis gene in over 11 000 mouthwashes. **Human Genetics**. v. 3, n. 3, p. 334-336, mar. 1996.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe, Madri, **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. v. 97, n. 1, p. S3–S15, oct. 2003.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, p. 525-529, jul. 1964.

DRUZIAN, A. F.; SOUZA, A. S.; CAMPOS, D. N.; CRODA, J.; HIGA, M. G.; DORVAL, M. E. C.; POMPILIO, M. A.; OLIVEIRA, P. A.; PANIAGO, A. M. M. Risk factors for death from visceral leishmaniasis in an urban area of Brazil I. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. e0003982, aug. 2015.

EGUCHI, J.; ISIHARA, K.; WATANABE, A.; FUKUMOTO, Y.; OKUDA, K. PCR method is essential for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in oral cavity samples. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 3, p. 156-159, jun. 2003.

EL HARITH, A.; KOLK, A. H. J.; KAGER, P. A. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 583-587, 1986.

EL HARITH, A.; KOLK, A. H.; KAGER, P. A.; LEEUWENBURG, J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; HUIGEN, E.; JELSMA, T. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 1321-1325, jul. 1988.

ERICSON, T; MÄKINEN, K.K. Saliva - formation, composition and possible role. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Textbook of Cariology**. 1. ed.: Copenhagen: Munksgaard, 1986. cap.3, p. 28-45.

FALCÃO, D.P. **Avaliação da Viscosidade Salivar e sua Relação com a Halitose**. 2005. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – Estomatologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

FEIGELSON, H. S.; RODRIGUEZ, C.; ROBERTSON, A. S.; JACOBS, E. J.; CALLE, E. E.; REID, Y. A.; THUN, M. J. Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. **Cancer Epidemiol Biomarkers and Prevention**, v. 10, n. 9, p. 1005-1008, 2001.

FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FERREIRO, M. C.; DIOS, P. D.; SCULLY, C. Transmission of hepatitis C virus by saliva? **Oral Diseases**, v. 11, n. 4, p. 230–235, jul. 2005.

FORMENTY, P.; LEROY, E. M.; EPELBOIN, A.; LIBAMA, F. O.; LENZI, M.; SUDECK, H.; YABA, P.; ALLARANGAR, Y.; BOUMANDOUK, P.; NKOUNKOU, V. B.; DROSTEN, C.; GROLLA, A.; FELDMANN, H.; ROTH, C. Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo. **Clinical Infectious Disease**, v. 42, n. 11, p. 1521–1526, apr. 2006.

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**, v. 105, n.3, p. 310-313, may. 2010.

FRANÇA, A. DE O.; DE CASTRO, V. L.; LIMA, M. S. JR.; PONTES, E. R.; DORVAL, M. E. Anti-*Leishmania* antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 49, n. 3, p. 627-630, dec. 2013.

FUKUTANI, K. F.; FIGUEIREDO, V.; CELES, F. S.; CRISTAL, J. R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; OLIVEIRA, C. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil, Salvador, **BioMed Central Infectious Diseases**, v. 14, p.422-429, jul. 2014.

FURUTA, Y.; FUKUDA, S.; CHIDA, E.; TAKASU, T.; OHTANI, F.; INUYAMA, Y.; NAGASHIMA, K. Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy. **Journal of Medical Virology**, v. 54, n. 3, p. 162–166, mar. 1998.

GALAÏ, Y.; CHABCHOUB, N.; BEN-ABID, M.; BEN-ABDA, I.; BEN-ALAYA-BOUAFIF, N.; AMRI, F.; AOUN, K.; BOURATBINE, A. Diagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis by detection of *Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in oral fluid samples collected using an oracol device. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3150–3153, sep. 2011.

GANGNEUX, J. P.; MENOTTI, J.; LORENZO, F.; SARFATI, C.; BLANCHE, H.; BUI, H.; PRATLONG, F.; GARIN, Y. J. F.; DEROUIN, F. Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world *Leishmania* infections in an area of nonendemicity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1419–1422, apr. 2003.

GIL-PRIETO, R.; WALTER, S.; ALVAR, J.; DE MIGUEL, A. G. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997- 2008). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n.5, p. 820-825, nov. 2011.

GÓES, M. A. O.; MELO, C. M.; SIERPE, V. L. Série temporal da leishmaniose visceral em Aracajú, estado de Sergipe, Brasil(1999 a 2008): aspectos humanos e caninos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.15, n. 2, p. 298-307, jun. 2012.

GONÇALVES, P. L.; CUNHA, C. B.; BUSEK, S. C. U.; OLIVEIRA, G. C.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; PEREIRA, F. E. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 28 –34, feb. 2005.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-348, set. 2004.

GRANDE, S. R.; IMBRONITO, A. V.; OKUDA, O. S., LOTUFO, R. F.; MAGALHÃES, M. H.; NUNES, F. D. Herpes viruses in periodontal compromised sites: comparison between HIV-positive and negative patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 10, p. 838– 845, oct. 2008.

HAILU, A.; SCHOONE, G. J.; DIRO, E.; TESFAYE, A.; TECHANE, Y.; TEFERA, T.; ASSEFA, Y.; GENETU, A.; KEBEDE, Y.; SCHALLIG, H. D. Field evaluation of a fast anti-*Leishmania* antibody detection assay in Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, p. 48-52, jan. 2006.

HARTY, L. C.; SHIELDS, P. G.; WINN, D. M.; CAPORASO, N. E.; HAYES, R. B. Self-collection of oral epithelial cell DNA under instruction from epidemiologic interviewers. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, n. 2, p. 199-205, jan. 2000.

HO, M.; LEEUWENBURG, J.; MBUGUA, G.; WAMACHI, A.; VOLLER, A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 32, n. 5, p. 943-946, sep. 1983.

IDESAWA, M.; SUGANO, N.; IKEDA, K.; OSHIKAWA, M.; TAKANE, M.; SEKI, K.; ITO, K. Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 4, p. 230–232, aug. 2004.

IMBRONITO, A. V.; GRANDE, S. R.; FREITAS, N. M.; OKUDA, O.; LOTUFO, R. F.; NUNES, F. D. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. **Journal of Oral Science**, v. 50, n. 1, p. 25–31, mar. 2008.

JENKINS, G. N. **The physiology of the mouth**. 3. ed. Great Britain: The Alden Press, 1970. p.289.

JENKINS, G. N. **The physiology and biochemistry of the mouth**. 4. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978. cap.9, p.284-359.

KAOUËCH, E.; KALLEL, K.; TOUMI, N. H.; BELHADJ, S.; ANANE, S.; BABBA, H.; CHAKER, E. Pediatric visceral leishmaniasis diagnosis in Tunisia: comparative study between optimised PCR assays and parasitological methods. **Parasite**, v. 15, n. 2, p. 143-150, jun. 2008.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. The diagnostic applications of saliva: a review. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, n. 2, p. 197–212, 2002.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.2, p. 613-617, feb. 2001.

LAINSON, R., SHAW, J. J., SILVEIRA, F. T., BRAGA, R. R., RYAN, L., PÓVOA, M. M., ISHIKAWA, E. A. Y. A *Leishmania* e as leishmanioses. In: Fundação Serviços de Saúde Pública (SESP). **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**, v. 1, p. 83-124, 1986.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *In*: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) **The leishmaniasis in biology and medicine**, Academic Press, v.1, p.1-120, 1987.

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

LEITE, R. S.; FERREIRA, S. D.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n.3-4, p. 201–206, jun. 2010.

LIMA JÚNIOR, M. S. C.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. L. T. E.; OLIVEIRA, A. G.; MATOS, M. F. C. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 303-308, mai-jun. 2009.

LINDOSO, J. A. L.; GOTO, H. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 3, n. 26, p. 7-10, fev. 2006.

LING, P. D.; VILCHEZ, R. A.; KEITEL, W. A.; POSTON, D. G.; PENG, R. S.; WHITE, Z. S.; VISNEGARWALA, F.; LEWIS, D. E.; BUTEL, J. S. Epstein-Barr virus DNA loads in adult human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. **Clinical Infectious Disease**, v. 37, n. 9, p. 1244–1249, feb. 2003.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; SALAH, A. B.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n.3, p. 312-320, mar. 2003.

MACHADO-DE-ASSIS, T. S.; RABELLO, A.; WERNECK, G. L. Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. 1542, fev. 2012.

MACIEL, B. L. L.; LACERDA, H. G.; QUEIROZ, J. W.; GALVAO, J.; PONTES, N. N.; DIMENSTEIN, S. E. M.; MCGOWAN, S. E.; PEDROSA, L. F.; JERÔNIMO, S. M. Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 591-8, out. 2008.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; LUCENA, F.; SOUSA-GOMES, M. L.; ALVES, W. A.; PAZ, L. Coinfecção da leishmaniose visceral e AIDS no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n.1, p. 124, out-dez. 2007.

MAIA-ELKHOURY, A.N.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n. 12, p. 2941-2947, dec. 2008.

MANCUSO, R.; BIFFI, R.; VALLI, M.; BELLINIA, M.; TOURLAKI, A.; FERRUCCI, S.; BRAMBILLA, L.; DELBUE, S.; FERRANTE, P.; TINELLI, C.; CLERICI, M. HHV8 a subtype is associated with rapidly evolving classic Kaposi's sarcoma. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n.12, p. 2153–2160, dec. 2008.

MANDEL, I. D. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. **The Journal of the American Dental Association**, v. 119, n. 2, p. 298-304, aug. 1989.

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. **Informe epidemiológico das leishmanioses nº 1/2015**. Campo Grande, Mato do Grosso do Sul, 2015.

MAURYA, R.; SINGH, R. K.; KUMAR, B.; SALOTRA, P.; RAI, M.; SUNDAR, S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assesment of cure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3038-3041, jul. 2005.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Médica**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. c. 10, v. 1, p. 67-83.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. E. P.; SECUNDINO, N. E. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 44, p. 255-259, oct. 2002.

MORENO, E. C.; MELO, M. N.; LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, A. S. R.; ANTUNES, C. M. F.; GENARO, O.; CARNEIRO, M. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the state of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, v. 5, p. 421–427, sep-oct. 2006.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalized chain reaction. **Methods in Enzymology**. v. 155, p. 335-350, 1987.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J.D.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561–1577, oct. 2005.

MURRAY, H. W. Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 434-440, mar. 2012.

NIKIFORUK, G. **Understanding Dental Caries**. v.1 New York: Karger, 1985. 303p.

NUNES, W. S.; ARAUJO, S. R.; CALHEIROS, C. M. Epidemiological profile of leishmaniasis at a reference service in the of Alagoas, Brazil, from January 2000 to September 2008. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**. v. 14, n. 4, p. 342-345, aug. 2010.

OLIVEIRA, E.N. **Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no município de Paracatu, MG no período de 2007 a 2010**. 2011 [Curso de especialização em Atenção Básica em Saúde da Família]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.

OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 2, p. 188-193, mar-abr. 2010.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; SANCHES, M. A.; DORVAL, M. E.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; PAULA, F. H.; PEREIRA, L. G.; CUNHA, R. V.; BOIA, M. N. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2827-2833, dec. 2008.

PANDEY, B. D.; PANDEY, K.; KANEKO, O.; YANAGI, T.; HIRAYAMA, K. Relapse of visceral leishmaniasis after miltefosine treatment in a Nepalese patient. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 580-582, apr. 2009.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120-127, jan. 2002.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; ASSIS, T. S. M.; RABELLO, A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 951-952, nov. 2012.

PIARROUX, R., F. GAMBARELLI, B. TOGA, H. DUMON, M. FONTES, S. DUNAN, AND M. QUILICI. Interest and reliability of a polymerase chain reaction on bone marrow samples in the diagnosis of visceral leishmaniasis in AIDS. **AIDS**, v. 10, n. 4, p. 452–453, apr. 1996.

PILATTI, M. M.; FERREIRA, S. A.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 2, p. 255–257, oct. 2009.

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

PRATA, A.; SILVA L.A.; Calazar. In: COURA J. R. **Dinâmica das Doenças Infeciosas e Parasitárias**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 713-737.

RAGGAM, R. B.; WAGNER, J.; MICHELIN, B. D.; PUTZ-BANKUTI, C.; LACKNER, A.; BOZIC, M.; STAUBER, R. E.; SANTNER, B. I.; MARTH, E.; KESSLER, H. H. Reliable detection and quantitation of viral nucleic acids in oral fluid: Liquid phase-based sample collection in conjunction with automated and standardized molecular assays. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 9, p. 1684–1688, set. 2008.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Lutzomyia longipalpis* e a Eco-Epidemiologia da Leishmaniose visceral Americana (LVA) no Brasil. **Flebotomíneos no Brasil**. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 2003. C. 6, p. 311-336.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 1, p. 21-25, jan. 2007.

RIGO, R. S.; RIGO, L.; HONER, M. R.; Clinical and Laboratory Aspects in American Visceral Leishmaniasis (calazar). **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 31, n. 1, p. 48-54, mar. 2009.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunidade aos Protozoários e Vermes. In: _____. *Imunologia*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 265.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 4, n. 1, p. 1-17, jan. 2010.

ROY, K. M.; BAGG, J.; BIRD, G. L. A.; SPENCE, E.; FOLLETT, E. A.; MILLS, P. R.; LAU, R. L. Serological and salivary markers compared with biochemical markers for monitoring interferon treatment for hepatitis C virus infection. **Journal of Medical Virology**. v. 47, n. 4, p. 429-434, dec. 1995.

SAHINGUR, S. E.; COHEN, R. E. Analysis of host response and risk for disease progression. **Journal of Periodontology**, v. 34, n. 1, p. 57-83, feb. 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, W. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** New York, Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.

SCHALLING, H. D.; OSKAM, L.; Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 8, p. 641-651, aug. 2002.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471-478, sep. 1994.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 577-579, ago. 2006.

SHAW, J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541-547, ago. 2007.

SILVA, E. S.; CHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M. F.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S.; SCHALLIG, H. D. F. H. Application of Direct Agglutination Teste (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 4, n. 4, p. 1-5, jun. 2005.

SILVA, A. R., TAUIL, P. L.; CAVALCANTE, M. N. S.; MEDEIROS, M. N.; PIRES, B. N.; GONÇALVES, E. G. R. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n.4, p. 358-64, ago. 2008.

SINGH, D.; PANDEY, K.; DAS, V. N.; DAS, S.; KUMAR, S.; TOPNO, R. K.; DAS, P. Novel noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by rK39 testing of sputum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2684–2685, ago. 2009.

SOUZA-GOMES, M. L.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; PELISSARI, D. M.; LIMA JUNIOR, F. E. F.; SENA, J. M.; CECHIMEL, M. P. Coinfecção Leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519-526, dez. 2011.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 9, p. 1729–1733, may. 2004.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1-6, jan. 2011.

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

SUNDAR, S.; REED, S. G.; SINGH, R.; KUMAR, P. C.; MURRAY, H. W. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **The Lancet**, v. 351, n. 9102, p. 563-565, 1998.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostic**, v. 3, n. 5, p. 657-667, set. 2003.

TIWARI, S. K.; KHAN, A. A.; AHMED, K. S.; KAUSER, F.; HUSSAIN, M.A.; ALI, S. M.; ALVI, A.; HABEEB, A.; ABID, Z.; AHMED, N.; HABIBULLAH, C. M. Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients using salivary secretion: a non-invasive approach. **Singapore Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 224-228, mai. 2005.

VAISH, M.; MEHROTRA, S.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Noninvasive molecular diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 2003–2005, may. 2011.

VERMA, S.; KUMAR, R.; KATARA, G. K.; SINGH, L. C.; NEGI, N. S.; RAMESH, V.; SALOTRA. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **Plos One**, v. 95, n. 4, p. e10107, apr. 2010.

VIANA, L. G.; ASSIS, T. S. M.; ORSINI, M.; SILVA, A. R.; SOUZA, G. F.; CALIGIORNE, R.; SILVA, A. C.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARCIANO, A. P.; MARTINS-FILHO, O. A.; RABELLO, A. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n; 6, p. 548–555, jun. 2008.

WIDMER, I. C.; ERB, P.; GROB, H.; ITIN, P.; BAUMANN, M.; STALDER, A.; WEBER, R.; CATHOMAS, G. Human herpesvirus 8 oral shedding in HIV-infected men with and without Kaposi sarcoma. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**. v. 42, n. 4, p. 420–425, aug. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The use of visceral leishmaniasis rapid diagnostic tests, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/vl-rdts.pdf?ua=1>>. Acesso em: 3 abr. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Technical Report Series. Control of the Leishmaniasis, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media/integrated_media_2010_leishmaniasis/en/>. Acesso em: 3 abr. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis in the Americas for the General Public, 2014. Disponível em: <<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/02/Leishmaniasis.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

XAVIER-GOMES, L. M.; COSTA, W. B.; PRADO, P. F.; OLIVEIRA-CAMPOS, M.; LEITE, M. T. Características e epidemiológicas da leishmaniose visceral em crianças internadas em um hospital universitário de referência no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, n. 4, p. 549-555, dez. 2009.

YAMAMOTO, A. Y.; MUSSI-PINHATA, M. M.; MARIN, L. J.; BRITO, R. M.; OLIVEIRA, P. F.; COELHO, T. B. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? **Journal of Clinical Virology**. v. 36, n.3, p. 328-230, jul. 2006.

APÊNDICES



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa com o título “**DNA de *Leishmania sp.* em saliva e mucosa bucal de pacientes com leishmaniose visceral**”. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver.

Este estudo está sendo conduzido pelas pesquisadoras Luciana Nogueira de Almeida Guimarães e Yvone Maia Brustoloni.

A finalidade deste estudo é avaliar a possibilidade de detecção do DNA de *Leishmania* em secreção salivar de adultos com diagnóstico de leishmaniose visceral (LV) por meio de um exame chamado Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), portanto, é muito importante a sua participação neste estudo.

A LV visceral é uma doença grave, transmitida pelo mosquito-palha ou birigui (*Lutzomyia longipalpis*) que, ao picar, introduz na corrente sanguínea do hospedeiro (homem) o parasito *Leishmania*. Os principais sintomas da LV são febre com semanas de duração, fraqueza, perda de apetite, emagrecimento, anemia, palidez, aumento do baço e do fígado, comprometimento da medula óssea, problemas respiratórios, diarreia e sangramentos. Quando não tratada, pode levar o paciente à óbito.

O DNA (ácido desoxirribonucléico) é a parte mais importante da célula. Ele contém informações que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos e produzem variações nas características de cada espécie.

Para o estudo, serão coletadas algumas informações pessoais e sobre seu estado de saúde através de um formulário de coleta de dados que será preenchido pelo entrevistador. Antes de ingressar nesta pesquisa, você será submetido a exames de rotina médica para realização do diagnóstico de leishmaniose visceral.

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Participante

Além disso, será requisitado para coleta de saliva (uma colher de chá) e células de dentro da bochecha através de cotonete estéril (swab), coletada pela pesquisadora, durante o atendimento médico realizado no serviço de referência para tratamento da leishmaniose visceral: Serviço de Doenças Infecto Parasitárias e Pronto Atendimento Médico do Núcleo Hospital Universitário/UFMS.

A sua participação no estudo não acarretará em prejuízos. Os riscos para você poderão ser mínimos, como incômodo de pequena intensidade no local da coleta de saliva e do esfregaço da mucosa oral. Você poderá se beneficiar dos resultados desta pesquisa, assim como outras pessoas que possuem sua doença, pois este método é menos doloroso e estressante que os métodos diagnósticos já existentes, como por exemplo, o aspirado de medula óssea.

Se você concordar em participar, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei, somente o pesquisador (ou o seu médico ou outro profissional) a equipe do estudo, Comitê de Ética independente terão acesso aos seus dados para verificar as informações do estudo. Você será informado periodicamente de qualquer nova informação que possa modificar sua vontade de continuar participando do estudo.

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para Luciana Nogueira de Almeida Guimarães, telefone celular número (67)81680217. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo chame o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67) 3345 7187.

A sua participação no estudo é voluntária. Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento. Você não perderá qualquer benefício ao qual tem direito. Se desistir do estudo, isso não implicará na continuidade do tratamento. Você não será proibido de participar de novos estudos, porém poderá ser solicitado a sair do estudo se não cumprir os procedimentos previstos ou atender as exigências estipuladas. Você receberá uma via assinada deste termo de consentimento. As amostras de material serão descartadas após a investigação.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário neste estudo.

Assinatura do participante _____

telefone _____

Assinatura do pesquisador _____

Campo Grande-MS ____/____/____

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

Nº _____ Grupo _____ Data ____/____/____

Iniciais do nome: _____ RGHU _____

Endereço _____

Telefones _____

DN ____/____/____ Idade _____ Sexo _____ Peso _____

Escolaridade ()

0-Analfabeto **1**-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) **2**-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) **3**-5ª à 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) **4**-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) **5**-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) **6**-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) **7**-Educação superior incompleta **8**-Educação superior completa **9**-Ignorado **10**- Não se aplica

Raça () 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado

Procedência _____

Naturalidade _____

Zona () 1 - Urbana 2 – Rural 3 - Periurbana 9 – Ignorado

Ocupação _____

Diagnóstico da LV em ____/____/____

Outros diagnósticos _____

Antecedentes clínicos (descreva brevemente a história clínica do paciente como internações, exames laboratoriais anteriores, entre outros)

Manifestações clínicas:

Febre () fraqueza() emagrecimento() aumento do baço () aumento do fígado()
 edema() tosse e/ou diarreia() palidez() quadro infeccioso() icterícia () fenômenos
 hemorrágicos() outros () Outra infecção associada ()
 especificar: _____

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DNA DE LEISHMANIA SP. EM SALIVA E MUCOSA BUCAL DE CRIANÇAS COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Pesquisador: Luciana Nogueira de Almeida Guimarães

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 19312913.6.0000.0021

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 709.560

Data da Relatoria: 02/07/2014

Apresentação do Projeto:

Para fins diagnósticos da Leishmaniose Visceral, os procedimentos laboratoriais mais utilizados envolvem a análise dos constituintes químicos e celulares do sangue. Vários estudos tem avaliado o potencial da saliva como fluido biológico nos exames para diagnóstico de diversas doenças com diferentes etiologias. O método PCR pode ser utilizado em fluidos bucais na detecção de DNA microbiano para detectar vírus e bactérias. A aplicação desse método, principalmente em crianças, merece ser investigada, sendo o objetivo do estudo detecção DNA de leishmania sp. em saliva e mucosa bucal de pacientes com Leishmaniose Visceral. Trata-se de um estudo avaliativo de desempenho de testes diagnósticos, que será realizado no Município de Campo Grande/MS, no NHU-UFMS, com pacientes com mais de 18 anos de idade, no Pronto Atendimento, com diagnóstico de Leishmaniose Visceral. Indígenas não participarão estudo. Este projeto será submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do NHU-UFMS. Todos os pacientes que fizerem parte desta pesquisa terão o TCLE assinados por seus pais e/ou responsáveis antes de sua participação no trabalho. Os entrevistados serão convidados a realizar a coleta de material para detecção de Leishmania sp. A investigação de Leishmania sp. será realizada por meio do método molecular PCR, com amostras de saliva não estimuladas. O fluido oral dos pacientes será obtido no dia do atendimento médico, antes do início

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110

UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 709.560

da terapia medicamentosa. A secreção salivar será recolhida com uma seringa descartável de 3ml, estéril e sem agulha, e depois transferida para microtubos tipo Eppendorf estéreis de 1,5ml. O esfregaço da mucosa bucal será coletado através de cotonete estéril (swab), cujas pontas serão quebradas e as amostras serão acondicionadas no tubo (estéril). Após serem lacradas e identificadas, as amostras serão acondicionadas em recipiente de isopor com gelo reciclável para transporte e posterior conservação a 20°C até extração do DNA. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) será realizada na FIOCRUZ- Rio de Janeiro

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Detectar DNA de *Leishmania* sp. em saliva e mucosa bucal em crianças com Leishmaniose Visceral pela técnica do PCR

Objetivo Secundário:

Descrever a técnica de coleta de saliva e esfregaço de mucosa oral em crianças com leishmaniose visceral; Descrever a reação de PCR utilizada com os substratos descritos acima; Verificar a sensibilidade e verificar a sensibilidade e especificidade da PCR utilizando saliva e esfregaço de mucosa bucal, comparando com os métodos já existentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e superados pelos benefícios. A coleta de swab da mucosa bucal e/ou a coleta de saliva oferece vantagens sobre a coleta de sangue para o diagnóstico de LV, pois permite uma investigação não-invasiva nos casos suspeitos, sendo potencialmente útil para a investigação da doença em crianças. O método é menos doloroso e estressante; oferece mais segurança para o profissional de saúde, pois elimina os riscos de acidentes perfuro-cortantes; tem melhor aceitação do paciente, particularmente crianças; e proporciona facilidade para estudos de grandes populações, podendo ser usado em locais onde a coleta de sangue é inconveniente, como escolas, por exemplo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante que propõe método alternativo para o diagnóstico da leishmaniose visceral em crianças. Cronograma e orçamento compatíveis. Não foram detectados conflitos de interesse.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As autorizações institucionais estão presentes. O TCLE foi readequado e atende a sua finalidade.O

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 709.560

instrumento de coleta de dados e termo de compromisso para utilização de dados de prontuário, estão presentes.

Recomendações:

Nada consta.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Por terem atendido todas as diligências, e por se encontrar em conformidade com as normativas vigentes somos de parecer favorável a sua aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPO GRANDE, 04 de Julho de 2014

Assinado por:
Odair Pimentel Martins
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br