

THIAGO LEITE FRAGA

**PCR EM SANGUE PERIFÉRICO COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO E NO
CONTROLE DE CURA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS**

**CAMPO GRANDE
2009**

THIAGO LEITE FRAGA

**PCR EM SANGUE PERIFÉRICO COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO E NO
CONTROLE DE CURA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Yvone Maia Brustoloni.

**CAMPO GRANDE
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

F811p Fraga, Thiago Leite.
PCR em sangue periférico como ferramenta no diagnóstico e no controle de cura da leishmaniose visceral em crianças / Thiago Leite Fraga. -- Campo Grande, MS, 2009.
61 f. ; 30 cm.

Orientador: Yvone Maia Brustoloni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose visceral - Diagnóstico. 2. Leishmaniose visceral - Tratamento. 3. Crianças – Doenças. I. Brustoloni, Yvone Maia. II. Título.

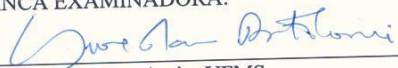
CDD (22) 616.9364



TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação intitulada PCR EMSANGUE PERIFÉRICO COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO E NO CONTROLE DE CURA DA LESHMANIOSE VISCERAL EM CRIANÇAS, apresentada à banca examinadora por THIAGO LEITE FRAGA, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obteve aprovação.

BANCA EXAMINADORA:


Yvone Maia Brustoloni – UFMS


Claude Pirmez – FIOCRUZ


Maria Elizabeth M. Cavalheiros Dorval – UFMS

Renato Andreotti e Silva – EMBRAPA

Campo Grande, 18 de julho de 2009.

RESUMO

No Brasil e em vários outros locais onde a leishmaniose visceral é prevalente, as crianças são as mais acometidas pela doença. Um dos principais problemas para a realização do diagnóstico na infância diz respeito à coleta das amostras biológicas, pois esta envolve procedimentos invasivos, que causam dor e desconforto ou podem apresentar acidentes potencialmente fatais. O controle de cura da patologia também apresenta dificuldades, pois apesar da volta à normalidade das alterações clínicas e laboratoriais após um curso de tratamento, a doença é sujeita a recidivas. As técnicas moleculares, como a PCR, têm sido cada vez mais utilizadas no diagnóstico e no monitoramento após o tratamento de pacientes com leishmaniose visceral. No entanto, os estudos que empregam esses métodos em crianças são escassos ou abrangem um número pequeno de participantes. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a utilidade da PCR em sangue periférico no diagnóstico da LV em crianças no Mato Grosso do Sul, Brasil, comparando-a com métodos diagnósticos que utilizam coleta de tecidos através de procedimentos menos invasivos (microscopia direta, cultura e PCR em aspirado de sangue medular). Objetivou-se também analisar o emprego da técnica no controle de cura durante (1, 2 e 3 semanas) e após o tratamento (1, 2, 3 e 6 meses). Os resultados evidenciaram que a PCR em sangue periférico realizada em 45 crianças apresentou positividade elevada (95,6%) e semelhante à PCR em sangue medular (91,1%), e foram mais sensíveis que a microscopia direta (80%) e a cultura (26,7%). A avaliação do controle de cura de 29 crianças, das quais foram coletadas 232 amostras de sangue periférico para a realização da PCR sequencial, mostrou que na maioria dos pacientes os resultados tornaram-se negativos após duas semanas de tratamento, mas em alguns deles resultados fracamente detectáveis foram demonstradas até dois ou três meses após o tratamento, podendo significar resquícios de DNA ou mesmo parasitos viáveis, mantidos quiescentes de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro. A presença de banda de forte intensidade na PCR em uma criança que recidivou e que já havia apresentado negatificação da reação antes do reaparecimento dos sintomas, evidenciou que este método foi capaz de detectar precocemente parasitemia em caso de tratamento insatisfatório. O estudo reafirma que a PCR em sangue periférico pode substituir com vantagem os tradicionais métodos invasivos no diagnóstico da leishmaniose visceral na infância, e mostrou-se bastante útil para a monitorização do controle de cura, sugerindo que a realização desta técnica durante os três primeiros meses após o tratamento pode ser uma ferramenta valiosa na detecção de recidivas em pacientes imunocompetentes.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, PCR, diagnóstico.

ABSTRACT

In Brazil and in other localities where visceral leishmaniasis (VL) is prevalent the children are the most committed by the disease. One of the main problems for diagnosis in childhood is to obtain of biological samples because it involves invasive procedures that causes pain and discomfort or can lead to potentially fatal accidents. The healing control of the pathology also poses difficulties as despite the return to normality of the clinical and laboratorial changes after the treatment the disease is subjected to relapses. Molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR), have been in diagnosis and following up after the treatment VL. However the studies that use these methods are scarce and include few participants. The objective of this paper is to assess the efficacy of PCR to evaluate appraise the efficacy of PCR in peripheral blood to diagnose on VL in children from Mato Grosso do Sul State, Brazil, comparing it diagnosis methods that collect tissues by invasive procedures (direct microscopy, culture and PCR in bone marrow blood aspirate). The study also analyzed the use of the technique in control of cure during the treatment (1, 2 and 3 weeks) and post treatment (1, 2, 3, and 6 months). The results evidenced that PCR performed in peripheral blood of 45 children presented high positivity (95,6%) similar to PCR in bone marrow blood (91,1%) and was more sensitive than direct microscopy (80%) as even as in culture (26,7%). The evaluation of healing control of 29 children from who were collected 232 samples of peripheral blood to perform sequential PCR, demonstrated that in most patients the results turned negative after two weeks of treatment. Some of them had poorly detectable reactions that were demonstrated after two or three weeks with treatment, possibly signifying that esquires of DNA or even of the parasite could remain viable, kept quiescent according to the host immunological response. The detection of strong PCR bands in children that relapsed and that had already presented negative reaction at results was demonstrated before reappearance of symptoms, evidencing that this method was able to detect the early presence of parasites with unsatisfactory treatment. This study reasserts that PCR with peripheral blood can advantageously the traditional invasive methods to diagnose on VL in children and that it is useful to control following up and healing, suggesting that the realization of this technique during the first three months of treatment could be a valuable tool in detecting of relapses in immunocompetent patients.

Key - words: visceral leishmaniasis, PCR, diagnosis

Dedico às crianças, vítimas da leishmaniose visceral, que dentro de sua realidade de dor e agonia continuam sempre silenciosas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus mentores por sempre me guiarem na melhor escolha.

À Dra. Yvone Maia Brustoloni, pela orientação constante, pelos ricos ensinamentos, pela confiança, paciência, dedicação e empenho durante todo o trabalho. Mas especialmente, pela amizade e exemplo de integridade, ética e sabedoria na profissão e na vida.

A FIOCRUZ - RJ (Laboratório de Imunopatologia) pela grande colaboração, estrutura, equipamentos, reagentes e pela acolhida. Em especial à grande amiga Rosi por sua incansável disponibilidade em ajudar-me, principalmente pelo interesse e comprometimento no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos do laboratório de Parasitologia Humana – UFMS, pelas ricas sugestões, estímulos e contribuições neste estudo.

A minha inesquecível turma de pós-graduação, pelos momentos inesquecíveis, pelo sentimento verdadeiro de coletividade, por terem me ensinado a dividir, colaborar e compartilhar sempre, pelas incansáveis festas, isso é o que nos faz ultrapassar os sucessivos obstáculos.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias o meu sincero respeito e cumprimento.

À amiga Janaína pela presença em todas as dificuldades relativas ao projeto de pesquisa e pela grande contribuição nas coletas nos períodos em que estive ausente.

À minha família pelo lar rico de união, carinho, serenidade e amor, pelos esforços e sacrifícios incontáveis, estando sempre ao meu lado, mas principalmente, pela confiança e incentivo.

À minha namorada Simone pela cumplicidade, companheirismo, paciência, carinhos e cuidados, compartilhando comigo sua grandeza de sentimentos e atitudes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Aspectos históricos	11
2.2 Distribuição geográfica	11
2.3 O agente etiológico	13
2.3.1 Taxonomia	13
2.3.2 Ciclo de vida do parasito	14
2.4 Reservatórios	14
2.5 Métodos de diagnóstico	15
2.5.1 Diagnóstico parasitológico	15
2.5.2 Diagnóstico sorológico	16
2.5.3 Diagnóstico molecular e o DNA do parasito	17
2.6 Avaliação da densidade parasitária em amostras biológicas : PCR em tempo real (real-time PCR)	22
2.7 Identificação das espécies de <i>Leishmania</i>	24
2.7.1 Análise isoenzimática	25
2.7.2 PCR-RFLP.....	25
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
5 RESULTADOS	32
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO	60

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma doença grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não adequadamente tratada. No Brasil e em vários outros locais, como nos países da bacia do Mediterrâneo, a LV é mais comum em crianças. Uma importante característica é o acometimento de crianças de baixa idade, principalmente menores de cinco anos, o que geralmente se deve à maior suscetibilidade à infecção e à imaturidade imunológica observada nesta faixa etária.

O manejo da LV é complexo e apresenta particularidades que constituem um desafio constante para pesquisadores e clínicos. Entre múltiplos aspectos, dois assumem grande importância por estarem relacionados ao sucesso terapêutico dos casos: as dificuldades do diagnóstico precoce e o estabelecimento de critérios confiáveis de cura após o tratamento.

O diagnóstico rápido e preciso da patologia permite a instituição precoce do tratamento e constitui a chave da sobrevivência para os cerca de 500 mil pacientes que adquirem a LV no mundo todo a cada ano. No entanto, o diagnóstico clínico muitas vezes é difícil, devido à existência de sinais e sintomas que são comuns a outras enfermidades presentes nas áreas onde também incide a LV, exigindo confirmação etiológica laboratorial, o que justifica a busca constante de novas técnicas para o diagnóstico. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, porém, o número de testes disponíveis continua limitado.

Os métodos parasitológicos são os ideais, no entanto, além das dificuldades na utilização destes, como a baixa sensibilidade e a subjetividade dos exames microscópicos e a morosidade da cultura, as técnicas exigem o emprego de procedimentos invasivos para a coleta de tecidos infectados (aspirados de medula óssea, baço ou fígado), o que é particularmente complicado em crianças.

A partir da década de 80, várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitos do gênero *Leishmania*. Métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de DNA e RNA estão agora disponíveis. A PCR tem demonstrado ser um método de alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LV, independente da imunocompetência do paciente.

Dentre os diferentes tipos de amostras biológicas que podem ser utilizadas na PCR, tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos e camada leucocitária, a possibilidade da utilização de sangue periférico para a detecção de DNA de *Leishmania* torna-

a especialmente atraente para uso em crianças, onde os convencionais procedimentos invasivos causam dor e desconforto ou podem ocasionar acidentes potencialmente fatais.

A PCR também tem sido utilizada com outras finalidades além do diagnóstico, tais como, estudos epidemiológicos e para avaliação do controle de cura. O controle de cura da LV após o tratamento dos casos muitas vezes é difícil, pois o aparente retorno à normalidade das alterações clínicas e laboratoriais no final da terapêutica não exclui a possibilidade de recidiva dos sintomas, demonstrando uma resposta insatisfatória. Isso tem estimulado os pesquisadores na procura de marcadores moleculares que poderiam prever com precisão qual paciente, aparentemente curado, poderia sofrer recorrência da doença. A detecção persistente de DNA de parasitos em tecidos infectados pode ser usada como marcador para o risco de recidiva após uma cura clínica inicial. Nesse contexto, PCR tem sido empregada no seguimento e monitorização após tratamento, porém, em um número limitado de estudos.

Apesar dos aspectos acima abordados, poucas pesquisas na literatura têm explorado o uso da PCR em crianças, especialmente utilizando sangue periférico, material biológico de fácil obtenção, tanto para diagnóstico como para seguimento dos casos tratados. A maioria dos estudos relata experiências em casuísticas que incluem crianças e adultos em uma mesma amostra, ou, quando empregam somente crianças, abrangem um pequeno número destas.

Considerando-se que a LV é uma doença em franca expansão em Mato Grosso do Sul e em várias localidades brasileiras, e a escassez de trabalhos que auxiliem a validar a utilização de técnicas de PCR na infância, em pesquisas referentes ao diagnóstico e ao controle de cura após o tratamento, justificou-se o desenvolvimento da presente pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos

Em 1091, Sir William Boog Leishman identificou microorganismos em esfregaços do baço de um soldado britânico, morto com quadro de disenteria, febre, caquexia e hepatoesplenomegalia, procedente da cidade de Dum-Dum na Índia (LEISHMAN, 1093). A doença, que se caracterizava de alto risco, ficou conhecida como febre Dum-Dum e seus principais sintomas eram febre irregular e arrastada, debilidade, atrofia muscular, anemia grave e esplenomegalia. O quadro também ficou conhecido como calazar (do hindu: Kala=Negro, azar=Doença).

Em seguida, o microorganismo identificado foi classificado como tripanossoma por Charles Donovan no ano de 1903, que o confundiu com o *Trypanosoma brucei*. Bruce, Laveran e Mesnil, posteriormente consideraram-no como sendo uma nova espécie. A associação desse parasito à etiologia da leishmaniose visceral (LV) deve-se a Major Ross, que nomeou o novo microorganismo de *Leishmania donovani*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006) o gênero *Leishmania* fora descoberto e logo em seguida, no ano de 1908, Charles Nicolle descreveu o cão como sendo o hospedeiro intermediário da *Leishmania donovani* (BADARÓ; DUARTE, 2002).

Pouco mais de 10 anos depois, em 1913, é relatado o primeiro caso autóctone no Brasil descrito por Migone, de um paciente da cidade de Boa Esperança no Mato Grosso, (BADARÓ; DUARTE, 2002); somente no ano de 1936 Evandro Chagas descreveu o primeiro caso diagnosticado em paciente vivo procedente de Aracajú, Sergipe (LAINSON; RANGEL, 2005).

2.2 Distribuição geográfica

A LV é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença emergente e não-controlada o que estimula constantemente a pesquisa de novos métodos de diagnóstico e drogas para tratamento, além do planejamento de estratégias para seu controle (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

A LV encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, possui ampla distribuição geográfica e é endêmica em 88 países. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem predominantemente em países em desenvolvimento: Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Em todos os locais a doença assume grande importância devido à elevada taxa de mortalidade dos indivíduos humanos infectados não submetidos ao tratamento, representando assim, sério problema em saúde pública (GUERIN et al., 2002).

Nas Américas a LV é considerada uma zoonose que deixou de ser primariamente silvestre e passou a se estabelecer em áreas rurais, mas atualmente também ocorre em áreas peri-urbanas e urbanas. No Brasil é uma doença em franca expansão e tem avançado por diversas localidades. Nos últimos 30 anos, com o surgimento de focos em regiões até então indenes, várias cidades brasileiras de médio e grande porte tornaram-se áreas de transmissão intensa. De 1980 a 2005 há registro de 59.129 casos no país, 82,5% (48. 783) na região Nordeste, com uma média de 2.274 novos casos por ano. Gradualmente, houve expansão para as regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste, com aumento de 15% em 1998 para 44% em 2005, sendo que atualmente há registros da patologia em 20 (74%) estados brasileiros (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a peri-urbanização e urbanização da LV no país, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO), (MATO GROSSO DO SUL, 2008).

Em Mato Grosso do Sul (MS), a LV invadiu diversas cidades. Desde a década de 80 tem sido reconhecida em cães e humanos no oeste do Estado, na região de Corumbá (NUNES et al; 1988), permanecendo restrita a essa área até 1995, porém, a partir de então iniciou sua difusão lenta para os municípios adjacentes (OLIVEIRA, 2006), ocorrendo sua franca expansão a partir de 2001. Hoje relata-se a ocorrência da doença em 49 dos 78 municípios do Estado (MATO GROSSO DO SUL, 2008).

A LV assumiu, portanto, um papel importante na saúde pública de diversas regiões e, uma vez estabelecido um foco de transmissão, muitas pessoas serão acometidas até que medidas de controle comecem a conter o avanço da doença. Além disso, *Leishmania* é um

protozoário que apresenta ciclo de vida complexo em dois hospedeiros, exigindo diversificadas ações de controle.

2.3 O agente etiológico

2.3.1 Taxonomia

A partir da descrição do gênero *Leishmania* surgiram as primeiras tentativas de classificação dos parasitos em espécies, considerando, inicialmente, aspectos clínicos e epidemiológicos da doença humana.

Vários sistemas taxonômicos que consideram os níveis de subgênero, espécie e subespécie têm sido propostos, mas até o momento não existe uma classificação amplamente aceita que incorpore todos estes elementos. O modelo taxonômico mais utilizado foi proposto por Lainson e Shaw (1987), sendo as espécies de *Leishmania* divididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Atualmente, o número total de espécies está em torno de 30, sendo que cerca de 20 infectam humanos (CUPOLILLO et al., 1994; VOLPINI, 2003).

Como a classificação de qualquer grupo, a de *Leishmania* está sujeita a mudanças com a aquisição de novas informações, sendo necessária a utilização do maior número possível de caracteres (GONTIJO; MELO, 2004).

Dessa forma, com o passar do tempo novas espécies são descobertas e descritas, assim como as relações filogenéticas dentro do grupo vão sendo elucidadas. Daí a necessidade de metodologias que possibilitem a investigação de características específicas para que ao se isolar um organismo seja mais fácil sua identificação com base em comparações com características já estabelecidas.

A posição taxonômica e a origem do agente etiológico da LV no Novo Mundo têm sido uma questão polêmica e muito discutida. Desde que Cunha e Chagas (1937) descreveram e incriminaram *Leishmania chagasi* como uma nova espécie responsável pela doença nas Américas, a sua origem tem sido objeto de muito debate e especulação. Alguns autores separam *L. infantum*, o agente etiológico da LV no Velho Mundo, e *L. chagasi* em duas espécies (ELLIS; CRAMPTON, 1991; GRAMICCIA et al., 1992; LAINSON; SHAW, 1987; PALATNIK et al., 1990). Outros acreditam que estes parasitos são diferentes, mas decidiram separá-los em duas subespécies (LAINSON; RANGEL, 2005). E ainda, alguns pesquisadores

acreditam que *L. chagasi* e *L. infantum* são sinônimos, e que a primeira foi importada da Europa no período da colonização portuguesa e espanhola (DANTAS-TORRES, 2006; KILLICK-KENDRICK, 1985; RIOUX et al., 1990;).

Entretanto, até o momento nenhuma destas classificações foi consensualmente aceita. Desta forma, adotou-se neste trabalho a nomenclatura proposta por Shaw (2006), *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Esse autor afirma que ainda existem muitas perguntas acerca da origem, identidade e epidemiologia dos parasitos causadores da LV no Novo Mundo, por isso é mais prudente utilizar esta nomenclatura.

2.3.2 Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* inclui uma fase no tubo digestivo do vetor flebotomíneo - *Lutzomyia longipalpis*, e outra em diferentes hospedeiros vertebrados - canídeos silvestres (*Cerdocyon* e *Dusicyon*) e domésticos (*Canis familiaris*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (DEANE; DEANE, 1955). O hábito sinantrópico destes hospedeiros pode favorecer o intercâmbio entre os ciclos silvestre e doméstico.

A transmissão ocorre pela picada de fêmeas de insetos da ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub família Phlebotominae. No momento do repasto sanguíneo, ao picarem um animal infectado, esses insetos sugam juntamente com o sangue as formas amastigotas, que após atingirem o tubo digestivo transformam-se em promastigotas e multiplicam-se intensamente. Em seguida, migram para as partes anteriores do tubo digestivo do flebotomíneo, o qual, ao picar outro animal poderá regurgitar as formas promastigotas metacíclicas. Estas formas serão fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os macrófagos, onde irão se transformar em amastigotas e se multiplicar (BAUZER et al., 2007).

2.4 Reservatórios

Os cães são considerados os mais importantes reservatórios domésticos e certamente contribuíram para a mudança no perfil epidemiológico da doença (MARZOCHI; MARZOCHI, CARVALHO, 1994; MISSAWA; LOROSA, DIAS, 2008). Na transmissão da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, o homem serve apenas como uma fonte de

alimentação para os flebotomíneos e a transmissão depende largamente da presença de cães infectados (LAINSON; SHAW, 1987). O cão e a raposa apresentam um intenso parasitismo cutâneo, o que permite a fácil infecção dos flebotomíneos (DEANE; DEANE, 1954). Entretanto, é provável que em algumas situações específicas existam outras fontes de infecção (DEANE; DEANE, 1955) e que o homem esteja envolvido na cadeia de transmissão, como por exemplo, no caso de pacientes imunodeficientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ARIAS; MONTEIRO, ZICKER, 1996).

2.5 Métodos de diagnóstico

2.5.1 Diagnóstico parasitológico

A visualização direta de amastigotas é o “padrão ouro” para o diagnóstico da LV. A microscopia pode ser realizada em diversos tipos de materiais, com sensibilidade variável: em torno de mais de 95% em aspirados esplênicos, 55-97% em material de medula óssea, 60% em linfonodos (MURRAY et al., 2005; SINGH, 2006), e em torno de 50-75% em material obtido por punção hepática (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Apesar dos métodos parasitológicos serem ideais para a confirmação diagnóstica, exigem a realização de procedimentos invasivos para a coleta dos materiais biológicos.

A microscopia de aspirado de medula óssea (mielograma) é o método diagnóstico mais seguro para pacientes pediátricos (KAFETZIS; MALTEZOU, 2002) já que a punção esplênica é um procedimento potencialmente fatal, pela possibilidade de ocorrência de hemorragias graves (SIDDIG et al., 1988; ZIJLSTRA et al., 1992).

Para que a detecção de parasitos em sangue medular atinja boa sensibilidade, as lâminas de mielograma devem ser analisadas cuidadosamente e por um período de tempo adequado, recomendando-se a análise de pelo menos 1200 campos (20 minutos) como o mínimo necessário antes de se determinar uma amostra como negativa; isso forneceria uma sensibilidade de 90% (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005). Se examinado rapidamente, o método apresenta uma menor positividade. A sensibilidade do método também é influenciada pela experiência do microscopista no reconhecimento das formas parasitárias.

A mielocultura é um método através do qual os parasitos podem ser cultivados utilizando-se o clássico meio de NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e meio líquido Schneider,

mas a mesma é demorada, fornecendo o resultado em dias ou semanas, e não serve para uma decisão terapêutica rápida (PAIVA et al., 2007; ZIJLSTRA et al., 1992). O cultivo de *Leishmania* é feito em poucos locais como método de diagnóstico de rotina, por ser um método trabalhoso, demorado e que requer muita experiência (FERREIRA et al., 2007; SCHALLIG; OSKAM, 2002). A positividade da mielocultura varia em torno de 40-50%, enquanto que a de aspirado esplênico situa-se em torno de 70-98% (SINGH; SIVAKUMAR, 2003).

A inoculação de amostras de tecidos em hamsters (*Mesocricetus auratus*) também requer longo tempo para a positividade (1 a 3 meses) (BRASIL, 2006).

2.5.2 Diagnóstico sorológico

Entre as técnicas sorológicas, a reação de imunofluorescência (RIFI), o “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e o teste de aglutinação direta (DAT) são as mais utilizadas (KAR, 1995).

A RIFI é um dos testes mais sensíveis. Apresenta sensibilidade variando de 55% a 96% e especificidade em torno de 70 a 98% (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Diluições a partir de 1:80 são consideradas positivas (BRASIL, 2006).

ELISA é um teste útil e sensível, podendo utilizar vários antígenos. Sua sensibilidade e especificidade são influenciadas pelo antígeno empregado na reação (SINGH, 2006; SINGH; SIVAKUMAR, 2003), variando de 36% - 100% e de 85%-100%, respectivamente .

O DAT é um método simples, de fácil execução e baixo custo, com sensibilidade relatada em até 100% (SILVA et al., 2001).

A limitação dos testes sorológicos refere-se à possibilidade de reações cruzadas com outros microorganismos, como os causadores de leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (KAR, 1995), presença de resultados positivos em indivíduos assintomáticos de áreas endêmicas e pouca confiabilidade no diagnóstico em imunocomprometidos, devido à falta de resposta humoral nesse tipo de paciente (ALVAR et al., 1997).

Esses testes usam promastigotas ou proteínas solúveis do parasito como fonte de antígeno, o que pode limitar a especificidade e/ou aumentar os problemas com a produção de preparações antigênicas padrões. A sensibilidade e especificidade desses métodos têm sido

melhoradas através da utilização de antígenos purificados ou recombinantes, como o rK39 (GONTIJO; MELO, 2004).

Como nenhuma destas técnicas permite isoladamente um diagnóstico definitivo, métodos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) estão sendo cada vez mais empregados no diagnóstico da LV (BERRAHAL et al., 1996; LEONTIDES et al., 2002; REITHINGER et al., 2000; SCHONIAN et al., 2003).

2.5.3 Diagnóstico Molecular e o DNA do parasito

O genoma da *Leishmania* consiste de três tipos de ácido desoxirribonucléico (DNA) de replicação autônoma: DNA nuclear (nDNA), DNA mitocondrial referido como DNA do cinetoplasto (kDNA), e DNA extracromossômico (CHOCHOLOVÁ; JIRKŮ; LUKES, 2008).

A análise de sequências repetitivas do genoma nuclear tem mostrado grande heterogeneidade dentro do gênero, caracterizando-as como alvos específicos para tipagem e identificação precisa de organismos distintos (SIMPSON et al., 1987). O gene de mini-exon representa uma dessas sequências repetitivas que tem permitido a distinção entre gêneros e espécies dos Kinetoplastida (FERNANDES et al., 1994). Outro gene que se encontra em múltiplas cópias no genoma das leishmânias e que tem mostrado ser útil em ensaios de tipagem, é o gene codificante para o RNA ribossômico.

O kDNA representa a informação genética mitocondrial dos Kinetoplastida e corresponde a 10-20% do DNA total. Consiste de uma rede de DNA gigante com milhares de círculos de DNA interligados de 1-2 μ m de diâmetro, contendo aproximadamente 10^7 pares de bases (pb), localizado na matriz mitocondrial da célula, composta de dois componentes: os maxicírculos e os minicírculos (Figura 1) (BREWESTER; ASLETT; BARKER, 1998; KENNEDY, 1984; RAY, 1987; RYAN, 1988; SIMPSON et al., 1987).

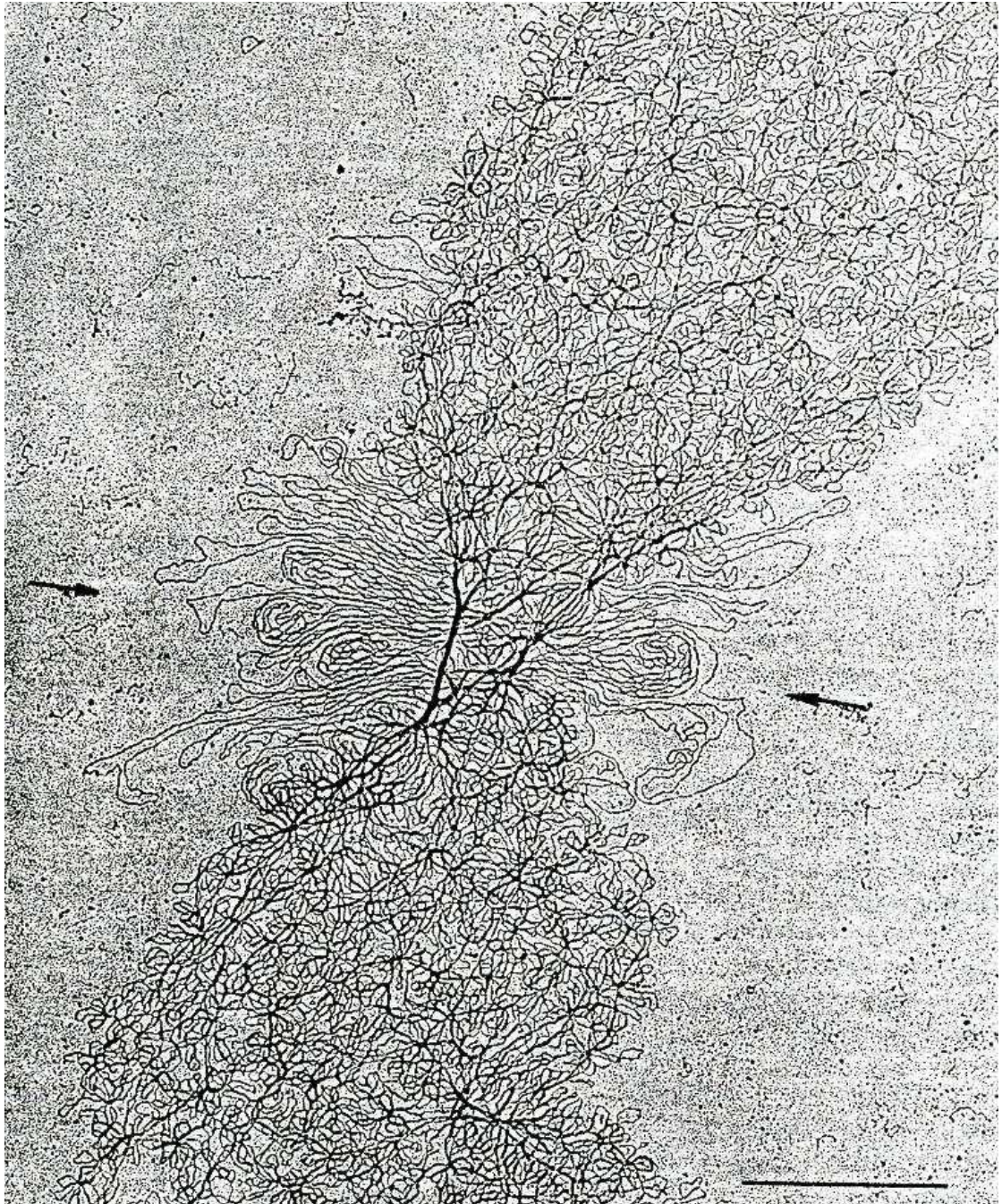


Figura 1 - Longos maxicírculos indicados por seta conectando duas redes formadas por minicírculos. A barra horizontal representa 1µm

Retirado de: BORST; HOEIJMAKERS, 1979.

Os maxicírculos estão presentes em menor número na rede, cerca de 30-50 cópias, variando de 20 a 37 kb, dependendo da espécie (BREWESTER; ASLETT; BARKER, 1998). Equivalem, geneticamente, ao DNA mitocondrial em outros eucariotos e codificam para genes mitocondriais estruturais como citocromo, subunidades de citocromo oxidase,

subunidades de NADH desidrogenase, todos envolvidos no processo de obtenção de energia celular, e também para genes de RNAs ribossomais da mitocôndria, 9S e 12S, além de outras fases abertas da leitura (DE LA CRUZ; NECKELMANN; SIMPSON, 1984; SHAPIRO; ENGLUND, 1995; SIMPSON et al., 1987; STEINERT; VAN ASSEL, 1974).

Os minicírculos, na maioria das espécies de tripanossomatídeos perfazem aproximadamente 90-95% da massa do kDNA (ENGLUND, 1982) e são divididos em uma região conservada de aproximadamente 150pb e uma região variável de 600pb (MORALES et al., 2001). A função genética crucial dos minicírculos é codificar pequenos RNAs guia que possuem aproximadamente 70 nucleotídeos e que têm como função governar a edição do RNA mitocondrial (STURM; SIMPSON, 1990). Apesar da heterogeneidade existente entre as sequências primárias dos minicírculos, algumas características de organização de sequências são comuns a todos eles.

Essas moléculas contêm ao menos uma região conservada de 120 a 150 pb (SIMPSON et al., 1987). O restante da molécula, denominada de região variável, apresenta heterogeneidade nas sequências, cujo grau parece refletir o número de RNAs necessário para a edição dos transcritos mitocondriais (SHAPIRO; ENGLUND, 1995). A região conservada constitui bom alvo para o diagnóstico molecular.

O fato dos minicírculos estarem presentes em cerca de 10.000 cópias na rede de kDNA torna-os excelentes substratos para sondas moleculares destinadas ao diagnóstico e diferenciação das espécies de *Leishmania*, pois estão presentes em grande quantidade. O DNA presente nos minicírculos do DNA mitocondrial (kDNA) da região conservada, ou o minicírculo completo são considerados os melhores alvos para o diagnóstico molecular das leishmanioses pela PCR (KENNEDY, 1984; RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990).

Nos últimos anos, o aprimoramento de abordagens moleculares para a identificação de sequências de ácidos nucleicos específicas para determinados patógenos abriu novas oportunidades para a identificação e a caracterização de agentes infecciosos, incluindo os causadores das leishmanioses. Vários trabalhos têm mostrado que os ensaios moleculares permitem uma detecção mais rápida e sensível de diversas doenças parasitárias, além da possibilidade de caracterização dos microrganismos envolvidos. De acordo com Reithinger et

al. (2000), Leontides et al. (2002) e Schonian et al. (2003), técnicas moleculares baseadas na PCR podem prover um melhor desempenho no diagnóstico da LV.

Mais de uma década após o desenvolvimento do primeiro ensaio da reação em cadeia pela polimerase para *Leishmania* (RODGERS; POPPER, WIRTH, 1990), uma experiência considerável com esta técnica para o diagnóstico da LV tem sido acumulada e a seleção dos genes alvo é crítica tanto para a sensibilidade quanto para a especificidade da PCR.

A PCR é um método molecular simples que provou ser mais específica e sensível do que testes diagnósticos convencionais e pode ser realizada a partir de diferentes amostras biológicas, como medula óssea (CORTES et al., 2004; OSMAN et al., 1997; PIARROUX et al., 1994), sangue humano (CASCIO et al., 2002; LACHAUD et al., 2001) e canino (LACHAUD et al., 2002), linfonodos (LACHAUD et al., 2002), creme leucocitário (LACHAUD et al., 2001), raspados de pele e conjuntiva de cães (LACHAUD et al., 2002), biópsias de pele e mucosas (PIRMEZ et al., 1999, STARK et al., 2006). Além disso, PCR tornou possível a utilização de materiais secos ou espécimes antigas estocadas, como sangue ou medula óssea coletados em papel de filtro (CORTES et al., 2004, DA SILVA et al., 2004), tecidos embebidos em parafina (LANÚS et al., 2005), espécimes de museu (COOPER, 1994) e lâminas de mielograma (BRUSTOLONI et al., 2007).

Diferentes métodos de extração de DNA (MULLER et al., 2003; REITHINGER et al., 2003) e diferentes genes alvo (LACHAUD et al., 2002) têm sido comparados (LACHAUD et al., 2001).

Iniciadores desenhados para amplificar a região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto têm facilitado o diagnóstico de infecções por *Leishmania* (REALE et al., 1999; SINGH et al., 1999; SMYTH et al., 1992) e podem ser utilizados para detectar todas as espécies de *Leishmania* (DEGRAVE et al., 1994), enquanto aqueles dirigidos para a região variável originam produtos que são diferenciados para cada espécie ou complexo de espécies existentes (DE BRUIJN; BARKER, 1992; ERESH; MCCALLUM; BARKER, 1994; CORTES et al., 2004). Diferentes pares de oligonucleotídeos vêm sendo propostos como iniciadores e estão sendo testados com resultados promissores. Rodgers et al. (1990) mostraram que a PCR pode detectar o kDNA equivalente a um parasito.

Outras sequências alvo também podem ser utilizadas na PCR, como o DNA ribossomal e a região espaçadora entre os transcritos internos ou “internal transcribed spacer” (ITS-1) deste gene (NASEREDDIN et al., 2006).

Os métodos de PCR apresentam sensibilidade e especificidade bastante elevadas no diagnóstico da leishmaniose visceral. Aproximadamente 100% das amostras são positivas quando se emprega aspirado de medula óssea (CORTES et al., 2004; LYNCH; BROWN, 1990; PIZZUTO et al., 2001). Já a utilização de sangue periférico tem demonstrado ser uma alternativa não invasiva altamente eficiente para o diagnóstico e controle da infecção, mostrando sensibilidade variando de 82% a 100% e especificidade de 100% (LACHAUD et al., 2000; SINGH et al., 1999; XIAO-SU et al., 2000).

Esse método permite a amplificação (replicação *in vitro*) de segmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos (*primers*) anelados especificamente nas margens da região alvo. A reação é dependente de DNA polimerase termoestável e se realiza ao longo de 30 ciclos, cada ciclo consistindo tipicamente de:

- a) desnaturação: a temperatura é elevada de 94°C a 96°C por pouco tempo para que haja a separação da dupla cadeia de DNA, permitindo que as fitas tornam-se acessíveis para o anelamento (hibridização);
- b) anelamento: etapa em que a temperatura é reduzida entre 50°C a 60°C permitindo que os *primers* anelem-se com a fita molde de DNA;
- c) extensão: a temperatura é elevada a 72°C para que a DNA polimerase termoestável exerça sua atividade de síntese de DNA.

A PCR possibilita a amplificação de milhões de cópias da sequência alvo, permitindo que a mesma seja detectada diretamente através de eletroforese. As características inerentes à PCR fazem com que o método seja extremamente sensível e específico. Nesse sentido, em geral, é mais sensível que os métodos diagnósticos baseados na hibridização com sondas moleculares.

Métodos moleculares também podem ser utilizados no controle de cura após um curso de tratamento. Estudos prospectivos, embora em número limitado, têm demonstrado que os testes de PCR realizados em linfonodos, medula óssea e sangue periférico podem identificar uma evolução bem sucedida da LV (MAURYA et al., 2005; OSMAN et al., 1997), realizando de maneira adequada o monitoramento da terapêutica medicamentosa e detectando recidivas.

Cascio et al. (2002) conduziram um estudo prospectivo em crianças hospitalizadas com suspeita de LV durante um ano, para verificar a utilidade da técnica de PCR no diagnóstico e seguimento da LV na infância. A detecção de DNA de *Leishmania* em sangue periférico permitiu a realização de um diagnóstico rápido e não invasivo de LV em crianças e

o reaparecimento da positividade de PCR no sangue periférico após tratamento foi preditivo de relapso clínico. No entanto, esse estudo empregou um número muito pequeno de pacientes (apenas 10 crianças).

2.6 Avaliação da densidade parasitária em amostras biológicas: PCR em tempo real (real-time PCR)

As enfermidades causadas pelas várias espécies de *Leishmania* são caracterizadas por flutuações no número de parasitos durante o curso da infecção (LECLERCQ et al., 1996; MATTNER; PADOVA; ALBER, 1997; MELBY et al., 1998). Na leishmaniose visceral, a carga parasitária pode variar com o tempo após a infecção no mesmo tecido e também entre diferentes tecidos num mesmo momento após a infecção (MELBY et al., 1998; RIÇA-CAPELA et al., 2003).

Quantificar a carga parasitária pode ser uma boa maneira de acompanhar a evolução da infecção e também verificar o efeito de um determinado esquema terapêutico. A maioria dos estudos sobre a imunobiologia de *Leishmania*, triagem, eficácia e desenvolvimento de novas drogas e estudos relacionados à padronização de novas vacinas requer a detecção e quantificação da carga parasitária em diferentes amostras de tecidos. Métodos para quantificação de parasitos podem ser empregados para verificar a eficácia do tratamento e, consequentemente como critério de cura da doença (COSTA FILHO; ÍRIS CAMPOS; NONATA RIBEIRO, 2008)

A determinação da densidade de parasitos em diferentes amostras biológicas pode ser conseguida através da microscopia, pela contagem de amastigotas em relação aos núcleos das células do hospedeiro em esfregaços do tecido (REIS et al., 2006; STAUBER; FRANCHINO; GRUN, 1958). No entanto, essa é uma técnica consumidora de tempo e pouco acurada, considerando que os parasitos não estão distribuídos igualmente nos tecidos e órgãos.

A quantificação através dos ensaios de microdiluição em cultura também pode ser utilizada. Porém, esta técnica requer o cultivo do parasito, o que limita a sua execução devido a todas as dificuldades associadas à manutenção da cultura, além de ser extremamente demorada e laboriosa (BRETAGNE et al., 2001).

Devido às dificuldades que estas técnicas de quantificação apresentam, métodos altamente sensíveis de detecção e quantificação do DNA do parasito em amostras clínicas têm

sido desenvolvidos, permitindo o monitoramento contínuo dos produtos amplificados por PCR.

A técnica de PCR quantitativo em tempo-real (qPCR), uma variante da reação de PCR convencional, é considerada uma ferramenta muito promissora para a detecção e quantificação de parasitos e representa um grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por possibilitar a quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica.

A reação de amplificação em tempo real é baseada na detecção e quantificação em tempo real da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese do produto de PCR (HIGUCH et al., 1993; BASSLER et al., 1995; MORRISON; WEIS, WITTEWER, 1998, 1999; ABE et al., 1999; DONOVAN et al., 2000).

O qPCR atualmente já é empregado para *Toxoplasma gondii* (JAUREGUI et al., 2001), *Borrelia burgdorferi* (PIESMAN; SCHNEIDER, ZEIDNER, 2001), *Plasmodium falciparum* (BRUÑA-ROMERO et al., 2001; HERMSEN et al., 2001), *Neospora caninum* (COLLANTES-FERNANANDEZ et al., 2002) e *Leishmania* (BRETAGNE et al., 2001; NICOLAS et al., 2002a e NICOLAS; MILON; PRINA, 2002b; ROLÃO et al., 2004).

Os sinais de fluorescência requeridos para detecção podem ser obtidos pela marcação dos “amplicons” com corante fluorescente. Esta marcação pode ser feita utilizando-se uma sonda que se liga à sequência alvo (sistema *Taq-Man*) ou então uma molécula fluorescente que se intercala na dupla-fita de DNA. Ambos os sistemas combinam um termociclador e um fluorímetro, permitindo o monitoramento contínuo do acúmulo de produto de PCR gerado.

A quantificação através da incorporação do corante fluorescente SYBR-Green na dupla-fita do DNA permite a definição aproximada do ciclo de PCR em que o produto começou a ser formado (Threshold cycle) e por inferência, a quantificação precisa de DNA “template” presente no início da reação. A partir da quantificação de DNA “template”, uma estimativa da carga relativa de parasitos pode ser obtida (MORTARINO et al., 2004).

A PCR em tempo real permite não só a quantificação de DNA em várias amostras biológicas, como também pode ser utilizada para o diagnóstico e identificação de microrganismos, diferenciando espécies ou cepas de vários microrganismos de importância médica através da análise das curvas de dissociação dos produtos de PCR (LOGAN et al., 2001). Dessa maneira, *L. major* foi diferenciada de *L. donovani*, *L. tropica* e *L. infantum*, de acordo com a temperatura de anelamento, a qual é uma função do índice GC/AT,

comprimento e sequências do produto amplificado. A análise da curva oferece uma alternativa rápida para a identificação de espécies no diagnóstico ou estudos epidemiológicos das leishmanioses e também no monitoramento de parasitoses assintomáticas (NICOLAS; MILON; PRINA, 2002b).

2.7 Identificação das espécies de *Leishmania*

A identificação dos parasitos presentes em uma área endêmica é de extrema importância em estudos epidemiológicos que buscam conhecer as espécies que circulam em determinado foco de transmissão da doença. É importante acumular informações sobre um determinado organismo, uma vez que algumas das características estudadas poderão ser úteis no descobrimento e desenvolvimento de drogas terapêuticas e vacinas, aliados importantes nos programas de controle da doença.

No Brasil, é consenso que apenas uma espécie é causadora da LV tanto em cães quanto em humanos, contudo, a hipótese da existência de polimorfismos entre cepas isoladas destes diferentes hospedeiros tem sido aventada. Esta diversidade ajudaria a explicar as diferenças observadas na evolução e manifestações clínicas. Com a utilização de técnicas moleculares nos estudos epidemiológicos, muitos conhecimentos acerca das relações entre as espécies, bem como entre cepas da mesma espécie poderão ser gerados, contribuindo para o entendimento do comportamento do parasito e sua relação com os vetores e hospedeiros nos diversos ambientes onde a transmissão se processa (NASEREDDIN et al., 2009).

Na tipagem das leishmânias as técnicas usadas são adaptadas para a detecção de marcadores específicos usualmente testados para a classificação de outros organismos. No gênero *Leishmania* a morfologia não é um bom caráter para distinguir espécies, pois as diferenças observadas são pequenas e sutis. No entanto, cada vez mais têm sido descobertos novos caracteres a partir de métodos mais avançados, que auxiliam na caracterização taxonômica das espécies deste gênero (SERIDI et al., 2008)

Atualmente são considerados bons marcadores, desde as análises de isoenzimas e determinantes antigênicos com anticorpos monoclonais, até uma série de métodos moleculares usados em análises de DNA com especificidade variável dependendo da natureza da sequência-alvo investigada (FLOETER-WINTER; SHAW, 2008).

2.7.1 Análise isoenzimática

Na atualidade, a análise de isoenzimas é o procedimento mais empregado para a identificação de vários parasitos. Este método é considerado como ferramenta-ouro na identificação de isolados de *Leishmania* (CUPOLILLO et al., 1995^a; CUPOLILLO; GRIMALDI; MOMEN, 1995b). O polimorfismo entre os aminoácidos é responsável pela mudança na mobilidade da enzima produzindo diferentes fenótipos ou zimodemas (RIOUX et al., 1990). Esta técnica requer o isolamento e crescimento do parasito em meio de cultura, porém, muitas cepas são de difícil isolamento e manutenção em cultura.

2.7.2 PCR-RFLP

Com o advento da PCR tornou-se possível a associação desta com a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou “polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição”). A PCR trouxe mais confiabilidade à técnica de RFLP, por suas características de especificidade ao amplificar uma sequência alvo conhecida, evitando que fragmentos de um mesmo tamanho, porém, com sequências diferentes, possam ser interpretados como a mesma molécula (AMRO et al., 2008). Após a descrição de um protocolo de PCR-RFLP em *Trypanosoma cruzi* (ÁVILA et al., 1990), a técnica começou também a ser empregada para a identificação de *Leishmania*.

Para alguns autores, com a utilização da PCR-RFLP parece ser possível superar as limitações das técnicas até então empregadas para a identificação de parasitos do gênero *Leishmania* (ANDRADE et al., 2006; FERROGLIO et al., 2006; VOLPINI et al., 2004).

RFLP é um método para o diagnóstico e a identificação de espécies de *Leishmania* que baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição que cortam a dupla-fita do DNA pelo reconhecimento de uma pequena sequência de nucleotídeos, usualmente de 4 a 6 pares de bases de tamanho. Posteriormente há separação, por eletroforese, dos fragmentos gerados, que correspondem a padrões de restrição específicos (SOBRINO et al., 2008).

O kDNA das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* apresentam sequências suficientemente distintas para serem utilizadas na separação. A caracterização da espécie é particularmente importante em regiões onde ocorrem simultaneamente, a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar. Achados recentes

relatam a dispersão de *L. infantum chagasi* para áreas de ocorrência de *L. braziliensis* (CAMARGO-NEVES, 2004). Visto que estes novos focos aparecem em áreas onde a LV não é tradicionalmente prevalente, o principal problema é distinguir entre casos autóctones e infecções adquiridas em outras áreas endêmicas.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Este estudo teve por objetivo avaliar a técnica em PCR de sangue periférico no diagnóstico e controle de cura após tratamento de crianças com leishmaniose visceral.

Objetivos específicos:

Avaliar a técnica de PCR realizada em amostras de sangue periférico no diagnóstico da leishmaniose visceral em crianças.

Comparar a técnica de PCR em sangue periférico com métodos que utilizam coleta de materiais por procedimentos invasivos, como PCR de aspirado medular, microscopia direta e cultura.

Avaliar a técnica de PCR no controle de cura, durante o tratamento, e 30, 60, 90 e 180 dias após o mesmo.

Identificar a espécie envolvida na etiologia da leishmaniose visceral em crianças do MS pela técnica de RFLP, em amostras de sangue periférico ou medular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi baseado em uma análise prospectiva de crianças admitidas para tratamento de leishmaniose visceral no Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU-UFMS), no período março de 2008 a março de 2009.

Foram consideradas portadoras de LV aquelas que apresentavam manifestações clínicas sugestivas (febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia), associadas à detecção de parasitos em aspirado medular (por meio de microscopia direta ou cultura em meio NNN), e/ou sorologia positiva ($\geq 1/80$) por Imunofluorescência Indireta (RIFI). Foram também incluídos pacientes que tiveram manifestações clínicas sugestivas, porém, testes parasitológicos e sorologia negativos, sendo que o diagnóstico foi confirmado pela resposta favorável ao tratamento.

O estudo constituiu-se de duas fases. Na primeira delas, verificou-se a utilidade da técnica de PCR convencional realizada em amostras de sangue periférico no diagnóstico da leishmaniose visceral, comparando-a com outros métodos de diagnóstico.

Para tanto, de todas as crianças que chegavam ao serviço para o tratamento eram coletadas amostras de sangue periférico e medular para a realização da PCR, microscopia direta, cultura e sorologia por RIFI.

No momento da admissão, foram coletados 4 mL de sangue periférico em EDTA, sendo 1 mL reservado para a realização da PCR e 3 mL para a sorologia por RIFI. Aspirado medular foi coletado por punção esternal, sendo 1 mL para realização de PCR e 1 mL para a microscopia direta e cultura, armazenados em tubos contendo EDTA. O material destinado à PCR foi estocado a -20°C até a análise.

Na segunda fase do estudo, avaliou-se a técnica da PCR como instrumento de controle de cura após o tratamento. Para tanto, foram incluídas as crianças que apresentaram PCR positiva no sangue periférico e que poderiam ser seguidas durante seis meses após o tratamento. Esses pacientes foram submetidos à coleta de 1 mL de sangue periférico nos dias 7, 14 e 20 durante o tratamento e 1, 2, 3 e 6 meses após o mesmo. As amostras de sangue foram congeladas a -20°C até o momento da análise. As crianças foram seguidas ambulatorialmente pelo período de seis meses, quando era realizada a última coleta de sangue periférico para a PCR, porém, o seguimento estendeu-se por um ano após o tratamento.

Para a identificação das espécies de *Leishmania*, o produto obtido pela PCR em sangue medular e/ou periférico foi analisado pela técnica de RFPL.

4.1 Microscopia direta

Para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* foram confeccionadas lâminas de esfregaço delgado a partir do aspirado de medula óssea, fixadas com metanol e coradas pela técnica de Giemsa.

4.2 Cultura

Amostras de tecido medular foram cultivadas em meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) com fase líquida de meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino, incubadas a 24°C e examinadas semanalmente para a detecção da presença do parasito.

4.3 PCR

4.3.1 Extração do DNA: para o isolamento do DNA do sangue medular e periférico, utilizou-se o *kit* comercial GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit (GE Healthcare).

Foram pipetados 900 µl de RBC *Lysis Solution* em tubos eppendorf de 1,5ml contendo 300 µl sangue total ou tecido medular e incubados por 10 minutos e posteriormente centrifugados a 14K por 20 segundos. Em seguida foram adicionados 300 µl de *Cell Lysis Solution* e incubados a 37°C para homogeneização da solução. Depois foram acrescentados 1,5 µl de *RNAse Solution* e incubados a 37°C por 15 minutos e em seguida adicionou-se 100 µl de *Protein Precipitation Solution* e centrifugados a 14 K por 3 minutos, onde o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para outro tubo eppendorf contendo 300 µl de isopropanol 100%. Em seguida a solução foi centrifugada a 14K por um minuto, onde se desprezou o sobrenadante e adicionou-se 300 µl de Etanol 70% para a lavagem do DNA e posteriormente centrifugados a 14K por um minuto e em seguida desprezando o sobrenadante cuidadosamente para não deslocar o DNA e para finalizar acrescentou-se 100 µl de *DNA Hydration Solution* e deixar hidratando *overnight* entre 20 a 30 °C ou alternativamente 65°C por uma hora.

4.3.2 Reação: a reação foi realizada de acordo com procedimentos previamente descritos (PIRMEZ et al., 1999; SCHUBACH et al., 1998). Em tubos *ependorf* (Perkin-Elmer, EUA), adicionou-se uma solução contendo 200 mM de dNTP (mistura de desoxinucleotídeos dCTP, dATP, dGTP, dTTP, Pharmacia, Upsalla, Suécia), tampão Perkin Elmer 1x (10x PE *buffer*: 10 mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM KCl e 1,5 mM de MgCl₂), 2,5 U de Ampli Taq polimerase® (PE), 200 ng dos oligonucleotídios iniciadores (Gibco, São Paulo, SP), água tridestilada e 1 µl do DNA da amostra, completando um volume de 25 µl.

Os oligonucleotídeos utilizados flanqueiam a região conservada do minicírculo de todas as espécies do gênero *Leishmania*, correspondendo à origem de replicação de ambas as fitas de DNA (PASSOS et al., 1996) e contêm as seguintes sequências:

Primer HM1: 5'- CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC-3'

Primer HM2: 5'- GGG GAG GGG GCG TTC TGC GAA -3'

Primer HM3: 5'- GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC -3'

A cada teste foi incluído um controle positivo constituído por um tubo contendo DNA isolado de *Leishmania* (MHOM/BR/75/2903) e um controle negativo, onde foi adicionado água ao invés de DNA.

A reação foi realizada ao longo de 30 ciclos térmicos, cada um com 30 segundos, consistindo de desnaturação a 94°C, anelamento a 54°C e extensão a 72°C. Foi utilizado aparelho termociclador automático Perkin-Elmer 2400 (Perkin-Elmer, Roche, Branchburg, NJ, EUA). A reação foi concluída com um ciclo de 72° C por sete minutos, permanecendo por tempo indeterminado a 4° C.

Todas as reações foram realizadas em ambiente exclusivo para PCR, previamente irradiado por 20 minutos com luz ultravioleta, utilizando-se ponteiras com barreira de algodão e pipetas exclusivas para o teste. Para evitar contaminação no momento do isolamento pela constante manipulação de amostras de pacientes, foram processadas somente dez amostras de cada vez.

4.3.3 Eletroforese em gel de agarose: 10 µl do produto amplificado foram aplicados em gel de agarose 2% e submetidos a uma voltagem constante de 70V por 60 minutos em tampão 0,5x TBE (5xTBE: 45mM Tris-borato, 0,5 M EDTA pH 8.0). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (5mg/mL) por três minutos, lavado em água corrente, visualizado sob luz ultravioleta (UV) e fotografado em aparelho UVP® (*Gel Documentation System*, Upland, CA, EUA). As amostras foram consideradas positivas quando um produto de 120 pb podia ser detectado.

4.4 PCR-RFLP

A PCR-RFLP do kDNA de *Leishmania* foi realizada de acordo com protocolo proposto por Volpini et al. (2004). Resumidamente, 5 µl do produto de PCR obtido com os iniciadores A e B foram digeridos através da adição de 1U da enzima de restrição Hae III e o seu tampão apropriado (1x). A mistura foi incubada a 37°C por 3 horas. Os fragmentos de restrição foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e visualizados após coloração por nitrato de prata. Os fragmentos de restrição obtidos pela digestão do DNA das amostras clínicas foram comparados com o perfil gerado após a digestão de DNA das cepas referência para cada espécie de *Leishmania*: *L. amazonensis* (PH8), *L. braziliensis* (M2903) e *L. infantum chagasi* (PP75).

4.5 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocolo número 1146.

4.6 Análise estatística

Os programas Epi-Info 3.4.1 e Bioestat 5.0 foram empregados para a análise dos dados. Para a comparação dos resultados, utilizou-se o teste de qui-quadrado de McNemar. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

No período de março de 2008 a março de 2009, 45 crianças portadoras de LV procedentes do Estado de Mato Grosso do Sul foram admitidas no Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul para tratamento, e participaram da primeira fase do estudo. Comparou-se a PCR em sangue periférico com outras técnicas que exigem coleta de material através de procedimentos invasivos, como PCR em sangue medular, microscopia direta e cultura de aspirado medular.

A sorologia foi utilizada apenas para diagnóstico de inclusão dos casos, pois frequentemente foram obtidos resultados negativos na admissão, que só se tornaram positivos na primeira ou segunda semana de tratamento.

Das 45 crianças participantes do estudo, 39 apresentaram microscopia direta de aspirado medular e/ou cultura e/ou sorologia por RIFI positivas; seis crianças mostraram métodos convencionais de diagnóstico negativos, porém foram incluídas devido à prova terapêutica favorável.

Vinte e três pacientes eram do sexo masculino (51,1%) e 22 do feminino (48,9 %). A idade variou de cinco meses a 13 anos (média= 3 anos e 11 meses).

A Tabela 1 compara os métodos utilizados para o diagnóstico da LV nas crianças do estudo.

Tabela 1 – Distribuição de crianças com leishmaniose visceral segundo tipo de procedimento invasivo e não invasivo, Pediatria do NHU-UFMS - março de 2008 a março de 2009 (n=45)

Tipo de procedimento	%	Positivos
Invasivo		
Aspirado medular		
PCR	91,1	41
Microscopia direta	80,0	36
Cultura	26,7	12
Não invasivo		
Sangue periferico		
PCR	95,6	43

A indicação do uso de antimoniato de meglumina ou de anfotericina B para tratamento seguiu as recomendações de técnicos do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006). Trinta e oito crianças (84,4 %) foram tratadas com antimoniato de meglumina por 20 dias e sete (15,5 %) receberam anfotericina B, 1mg/kg/dia durante 20 dias (total= 20mg/kg).

Das seis crianças incluídas devido à resposta terapêutica e que apresentavam microscopia direta/cultura de aspirado medular e sorologia por RIFI negativas, PCR em sangue periférico foi positiva em todas e no sangue medular em quatro.

As figuras 3, 4 e 5 mostram resultados positivos de PCR em sangue periférico e medular de alguns pacientes do estudo.

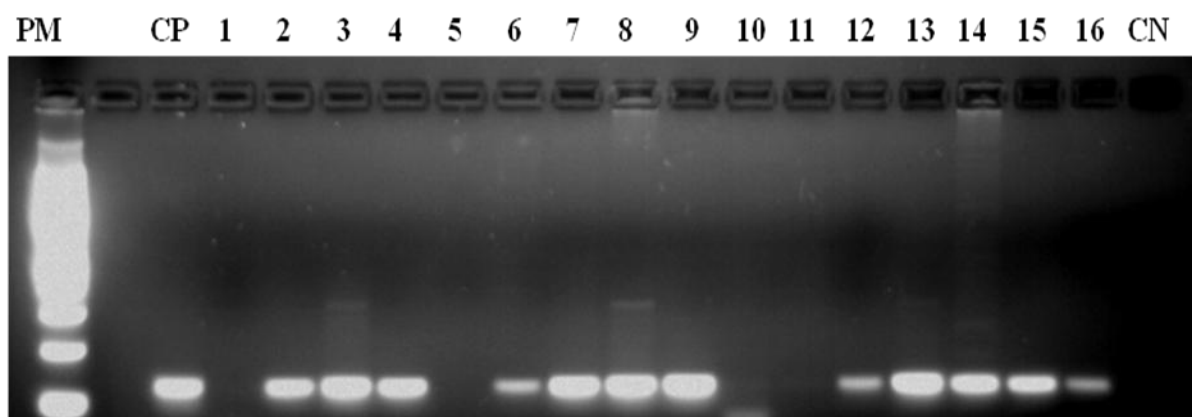


Figura 3 - Produtos amplificados por PCR. Amostras com PCR positivo: 2, 6, 12, 15 e 16 (sangue periférico) 3, 4, 7, 8, 9, 13 e 14 (sangue medular); PM= Peso molecular (100 pb); CP= Controle positivo; CN= Controle negativo

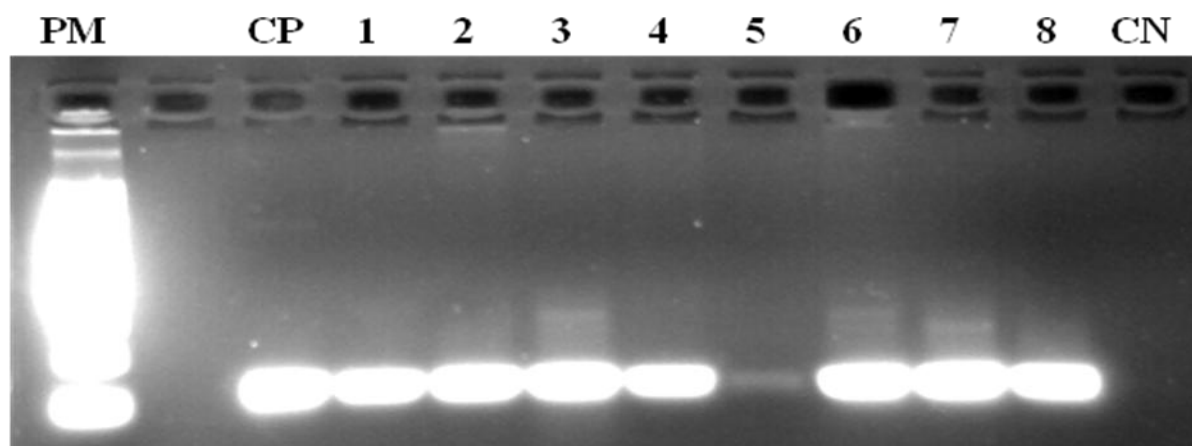


Figura 4 - Reações positivas por PCR em amostras de sangue medular. PM= Peso molecular (100 pb); CP= Controle positivo; CN= Controle negativo

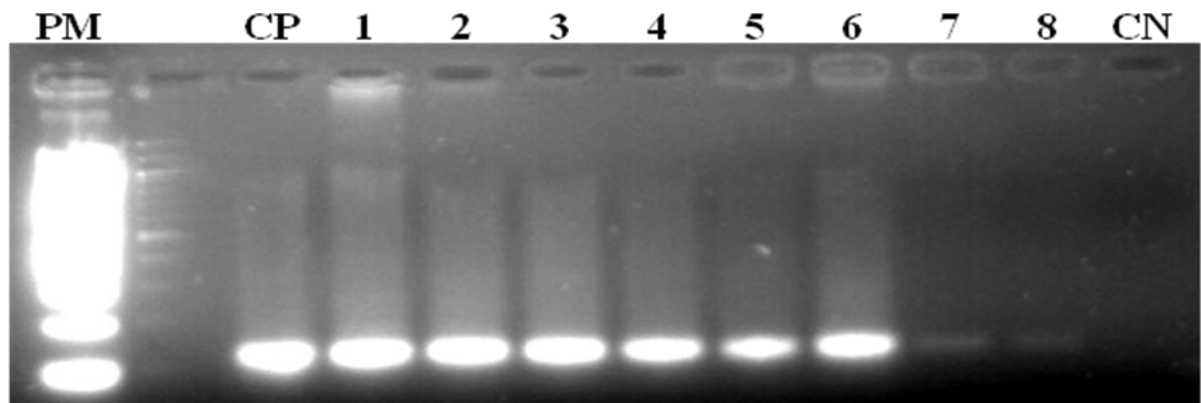


Figura 5 - Reações positivas por PCR em amostras de sangue periférico. PM= Peso molecular (100 pb); CP= Controle positivo; CN= Controle negativo

5.1 Comparação de PCR no sangue periférico com métodos invasivos

5.1.1 PCR em sangue periférico x microscopia direta de sangue medular: 35 crianças apresentaram resultados positivos pelos dois métodos (77,7%); de nove crianças com microscopia direta negativa, oito tiveram PCR em sangue periférico positiva. PCR em sangue periférico detectou resultados positivos de maneira estatisticamente significativa em relação à microscopia direta de aspirado medular ($p=0,0455$).

5.1.2 PCR em sangue periférico x PCR em aspirado medular: 39 dos 45 resultados foram positivos pelos dois métodos (86,6%); quatro crianças com PCR em aspirado medular negativa tiveram PCR em sangue periférico positiva. A diferença entre as duas técnicas não foi estatisticamente significativa ($p=6,831$).

5.1.3 PCR em sangue periférico x cultura de sangue medular: 11 pacientes apresentaram reações positivas aos dois métodos (24,4%); PCR em sangue periférico demonstrou ser extremamente significativa em relação à cultura: de 33 crianças com cultura negativa, 32 tiveram PCR de sangue periférico positivo ($p<0,0001$).

Todas as cepas foram identificadas como *Leishmania infantum chagasi*, através de RFLP (Figura 6).

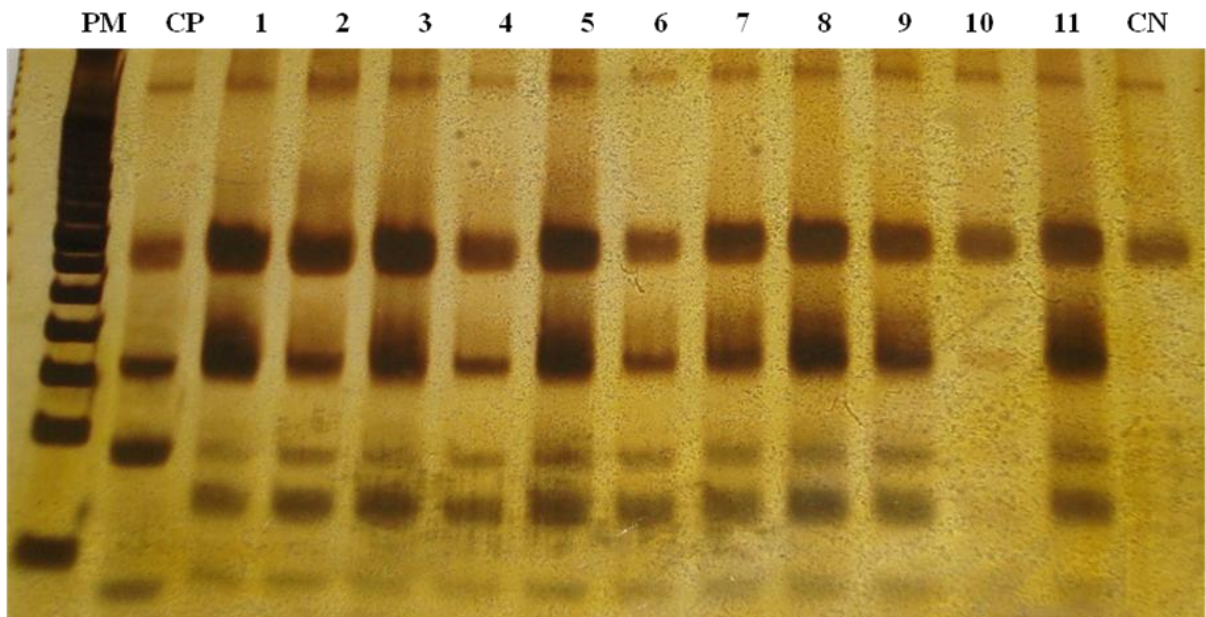


Figura 6 – Amostras de sangue periférico digeridas com a enzima HAE III pela técnica de PCR-RFLP, visualizada após coloração pela prata em gel de poliacrilamida 10%

A segunda fase do estudo foi realizada com amostras de 29 crianças que apresentaram PCR positiva no sangue periférico e foram seguidas durante o tratamento (1^a, 2^a, e 3^a semana) e após o mesmo (1^o, 2^o, 3^o e 6^o mês). Dezesesseis eram do sexo masculino (55,2%) e 13 do sexo feminino (44,8%). A idade variou de cinco meses a 11 anos (média=46,2 ± 34,9; mediana= 35 meses). Vinte e quatro crianças (82,7%) foram tratadas com antimoniato-N-metilglucamina (Glucantime®) e cinco (17,2%) receberam anfotericina B. Um paciente apresentava recidiva de processo tratado anteriormente e todos os outros estavam recebendo tratamento pela primeira vez.

PCR no sangue periférico foi realizada em 231 amostras durante o tratamento e a avaliação sequencial. Os resultados dos exames parasitológicos e PCR realizados na admissão, durante o tratamento e seguimento estão apresentadas na tabela 2. Antes do tratamento, a PCR em sangue medular foi positiva em 25 (86%) dos 29 pacientes.

Tabela 2 – Características clínicas e laboratoriais de crianças com LV monitoradas durante e após o tratamento usando a PCR, Pediatria do NHU-UFMS - março de 2008 a março de 2009 (n=29)

Paciente	Sexo	Idade (meses)	Tratamento	Microscopia		PCR Medular	PCR em sangue periférico								RFLP	
							antes tratamento	durante tratamento			após tratamento					
				Direta	Cultura		admissão	1 sem	2 sem	3 sem	1 m	2 m	3 m	6 m		
1	M	96	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
5	M	24	GLU	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
15	M	96	GLU	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
17	F	39	GLU	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
26	F	50	GLU	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
36	F	13	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
9	F	63	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
28	F	52	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
3	M	38	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
4	F	28	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
19	F	28	GLU	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
29	F	73	GLU	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
30	F	14	ANFO B	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
33	M	14	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
6	M	132	GLU	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
12	M	30	GLU	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
42	M	121	GLU	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
7	M	27	ANFO B	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
13	F	84	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
21	M	96	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
22	F	5	ANFO B	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
23	M	50	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
27	M	21	GLU	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
31	M	6	GLU	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
8	F	34	GLU	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
32	M	35	GLU	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
35	M	26	GLU	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
34	F	40	ANFO B	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>L. chagasi</i>
24	M	6	ANFO B	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	recidiva	Neg	<i>L. chagasi</i>

Nota - M. Masculino; F. Feminino; Glu. Glucantime; Anfo B. Anfotericina B; Pos. Positivo; Neg. Negativo; PCR. Reação em cadeia da Polimerase; RFLP. Polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição; Sem. Semana; M. mês; *L. chagasi*. *Leishmania chagasi*

A tabela 3 mostra o número de reações que se tornaram negativas por PCR em sangue periférico durante e após o tratamento. Na maioria dos pacientes, a PCR tornou-se negativa na segunda semana de tratamento.

Tabela 3 – Distribuição de crianças com leishmaniose visceral e negatificação da PCR em sangue periférico de acordo com o tempo de tratamento, Pediatria do NHU-UFMS, 2008-2009 (n=29)

Tempo de tratamento	Nº.	%	% acumulada
1ª semana	8	27,6	27,6
2ª semana	19	65,5	93,1
3ª semana	2	6,9	100,0

Das oito crianças que apresentaram reação negativa já na primeira semana de tratamento, duas mostraram reações novamente positivas posteriormente, uma na terceira semana e outra no terceiro mês, sendo que voltaram a apresentar resultados negativos até o final do seguimento. Dos 19 pacientes que negativaram na segunda semana, dez voltaram a apresentar reação positiva (três na terceira semana de tratamento, um no primeiro mês pós-tratamento, cinco no segundo e um no terceiro). No entanto, essas reações que eram negativas e voltaram a positivar apresentavam bandas de fraca intensidade pela PCR (Figura 7), diferentemente da intensidade demonstrada quando antes do tratamento (Figura 5). No sexto mês de seguimento, todas as reações encontravam-se negativas.

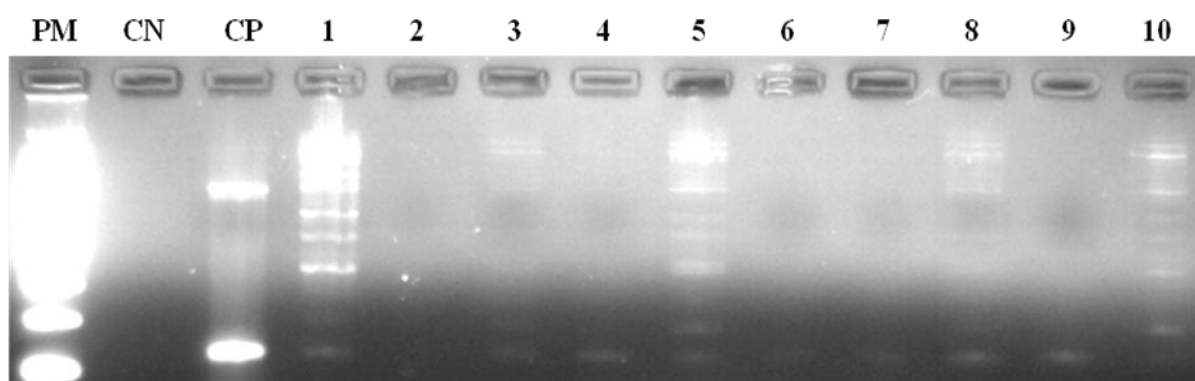


Figura 7 – Bandas de fraca intensidade em pacientes que já apresentavam resultados negativos anteriormente e que voltaram a positivar-se no segundo e terceiro mês após o tratamento. 1-10 = pacientes; PM = Peso molecular (100 pb); CP = Controle positivo; CN = Controle negativo

Um único paciente do estudo apresentou recidiva clínica e laboratorial após o tratamento. O mesmo mostrava reações positivas até a segunda semana do tratamento (que foi feito com anfotericina B, 1mg/kg/dia durante 20 dias); na terceira semana e um mês após, apresentou reações negativas. No segundo mês após a alta, a PCR novamente positivou, no entanto, o paciente mostrou-se sem clínica; no terceiro mês houve reaparecimento dos sintomas, retornando a febre, detectando-se crescimento do baço e apresentando outra vez microscopia positiva e PCR em sangue medular e periférico positivas (Figura 8). O paciente foi tratado novamente com anfotericina B, 1mg/kg/dia, durante 40 dias, e encontra-se atualmente em seguimento.

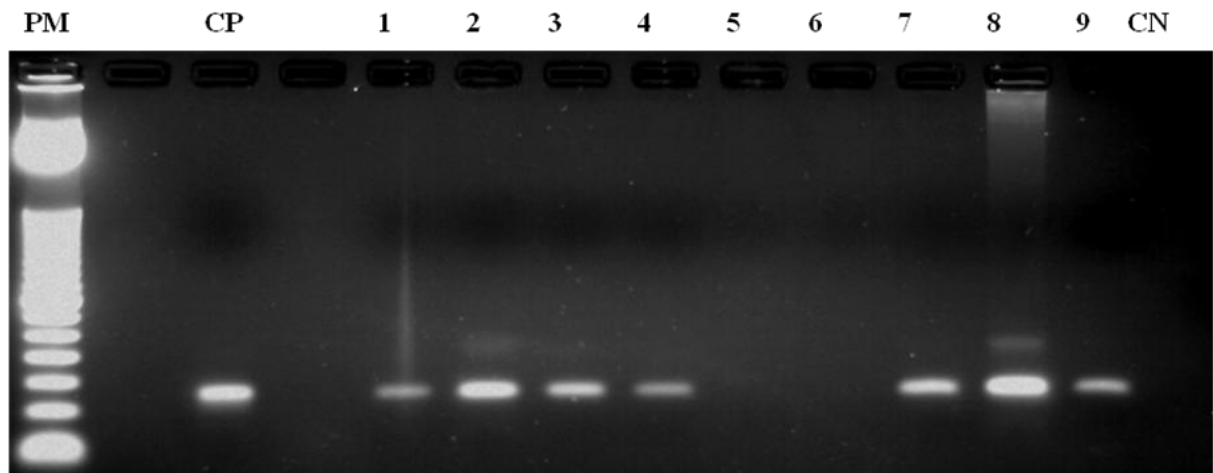


Figura 8 - Produto amplificado por PCR de um paciente que apresentou recidiva clínica e laboratorial após um curso de tratamento. 1 = aspirado medular antes do tratamento; 2, 3, 4 = sangue periférico antes e na primeira e segunda semana do tratamento; 5 e 6 = sangue periférico na terceira semana e um mês após tratamento. 7 e 9: sangue periférico 2 e 3 meses após o tratamento = recidiva. 8 = sangue medular positivo por ocasião da recidiva

6 DISCUSSÃO

A coleta de tecidos parasitados através de punção esplênica para a realização do diagnóstico parasitológico da LV pode resultar em complicações hemorrágicas fatais (SIDDIG et al., 1988; ZIJLSTRA et al., 1992), demandando do profissional que a realiza uma grande experiência, o que é difícil de ser encontrado fora de um centro especializado. Isso faz do aspirado de medula óssea o material mais utilizado para o diagnóstico da LV na infância (KAFETZIS; MALTEZOU, 2002). No entanto, a aspiração medular é dolorosa e incômoda e o emprego de um procedimento não invasivo na obtenção de material orgânico é altamente desejável na faixa etária pediátrica.

Durante muito tempo acreditou-se que nenhum ou poucos parasitos circulantes no sangue estivessem presentes na LV (LACHAUD et al., 2000). No entanto, o advento da biologia molecular possibilitou a detecção de DNA de *Leishmania* no sangue periférico (ADHYA et al., 1995; SCHAEFER et al., 1995), o que já tinha sido possível com a utilização de aspirado medular no início da década de 90 (RODGERS; POPPER, WIRTH, 1990; SMITH et al., 1992).

Uma das dificuldades referentes às técnicas parasitológicas diz respeito à baixa sensibilidade, muitas vezes devido à escassez de parasitos presentes nas amostras clínicas. A PCR é um método que tem se mostrado útil no diagnóstico da LV devido à possibilidade do DNA alvo estar presente em quantidades mínimas nos espécimes biológicos, demonstrando elevada sensibilidade e especificidade (PANDEY et al., 2009).

Apesar da LV ser uma doença comum na faixa etária pediátrica, poucas pesquisas têm explorado o uso da PCR no diagnóstico da doença em crianças, especialmente utilizando sangue periférico. Só mais recentemente há estudos que avaliam o uso da PCR exclusivamente em crianças (CASCIO et al., 2002, CRUZ et al., 2006; KAOUECH et al., 2008); a maioria deles relata experiências em casuísticas que incluem adultos e crianças em uma mesma amostra, além do que, o número de crianças na maioria das vezes é pequeno (ANTINORI et al., 2007; DISCH et al., 2006; KATAKURA et al., 1998).

O alto nível de sensibilidade da PCR no sangue periférico no presente estudo foi demonstrado por sua habilidade em detectar DNA de parasitos em 95,6% das amostras.

Outros autores que avaliaram o uso da PCR utilizando esse tipo de material biológico exclusivamente em crianças relataram sensibilidade variando de 79% a 100% (CASCIO et al., 2002; CRUZ et al., 2006; KAOUECH et al., 2008).

Alguns pesquisadores relataram positividade de PCR no sangue medular maior do que a de sangue periférico. Martín-Sánchez et al. (2002) avaliaram a PCR em adultos e crianças empregando oligonucleotídeos iniciadores diferentes dos que foram utilizados no presente estudo e verificaram uma sensibilidade de 100% em aspirado de medula óssea e de 67% em sangue periférico. Cruz et al. (2006) para avaliar o diagnóstico em 25 crianças, verificaram 100% de positividade em sangue medular e 79% em sangue periférico.

Recentemente, outros pesquisadores têm descrito resultados semelhantes aos observados no presente estudo, relatando igual eficácia quando se emprega aspirado medular ou sangue periférico em técnicas de PCR para o diagnóstico da LV. Deborggraeve et al. (2008) relataram 92,1% de resultados positivos no sangue periférico e 92,9% na medula óssea; Antinori et al. (2007) também detectaram sensibilidade de 98,5% para sangue periférico e 95,7% para aspirados de medula óssea.

Vários outros autores encontraram resultados similares (CASCIO et al., 2002; COSTA et al., 1996; CRUZ et al., 2002; FISA et al., 2002; PIZZUTO et al., 2001), o que confirma que a PCR em sangue periférico é tão confiável quanto a PCR em sangue medular e pode ser utilizada para o diagnóstico na infância, evitando a dolorosa coleta de aspirado de medula óssea.

Avaliou-se também a presença de amastigotas na microscopia direta e o cultivo de promastigotas na cultura (NNN), técnicas consideradas “padrão-ouro” para o diagnóstico da LV. A PCR em sangue periférico mostrou-se mais sensível que a microscopia de aspirado medular (95,6% x 80%). Outras pesquisas em crianças reafirmam esses dados, Cruz et al. (2006) estudando 25 delas, encontraram 67% de positividade na microscopia direta e 79% na PCR em sangue periférico. Kaouech et al. (2008) avaliando a utilidade da PCR em sangue periférico de 53 crianças na Tunísia, obtiveram positividade de 100% no emprego deste método e de 79% na microscopia direta de sangue medular. Piarroux et al. (1994) também registraram sensibilidade mais alta na PCR em sangue periférico (82%) quando comparado com a microscopia direta (55%) e cultura (55%).

No presente estudo, a cultura apresentou baixa sensibilidade na detecção de promastigotas e pode ter tido seu valor de diagnóstico reduzido devido à frequência de contaminação das amostras. Cruz et al. (2006) também verificaram positividade pouco elevada na cultura: 44% de 25 crianças. Além de laboriosa, esses dados explicam porque a cultura é realizada atualmente em poucos laboratórios.

Os resultados encontrados sugerem que a PCR em sangue periférico pode substituir com vantagem a microscopia direta e a cultura, tradicionais métodos de diagnóstico, e que também pode ser utilizada no lugar da PCR em sangue medular, teste altamente sensível no diagnóstico da LV na infância, evitando a coleta de material por meio dos dolorosos e às vezes arriscados procedimentos invasivos.

Acreditando na possibilidade de que a PCR em sangue periférico pode ser usada como marcador de cura parasitológica, diversos autores têm buscado realizar o seguimento dos pacientes durante e após o tratamento. No entanto, a maioria deles utilizou pacientes HIV positivos e/ou adultos, ou adultos e crianças na mesma amostra (ANTINORI et al., 2007; DISCH et al., 2004; FISA et al., 2002; LACHAUD et al., 2000; MAURYA et al., 2005; PIZZUTO et al., 2001).

Somente mais recentemente alguns pesquisadores relatam o monitoramento do tratamento através de PCR no sangue periférico utilizando apenas crianças em suas casuísticas (CASCIO et al., 2002; CRUZ et al., 2006). No entanto, o número delas ainda é limitado (10 e 25, respectivamente).

Os períodos de seguimento nos estudos acima citados foram diversos. Optou-se por seguir as crianças por até seis meses após o tratamento, pois é nesse intervalo de tempo que a maioria das recidivas geralmente ocorre (THAKUR et al., 1988; THAKUR et al., 2008; ZIJLSTRA et al., 1993).

Todos os pacientes monitorados apresentaram boa evolução clínica e laboratorial, com redução de baço e fígado e normalização dos exames hematológicos ao final do tratamento. Usando-se a PCR sequencial, verificou-se que a maioria (93,1%) apresentou negatificação da reação até o 14 dia da terapêutica. Cascio et al., (2002), seguindo dez crianças, também verificaram que houve *clearance* da parasitemia 14 dias da utilização de antimoniato-N-metilglucamina, e de seis dias quando os pacientes foram tratados com anfotericina B lipossomal. Dish et al. (2004), trabalhando com 17 pacientes tratados com antimoniato-N-metilglucamina, também verificaram negatificação

da PCR no sangue periférico em 76,4% dos casos durante os primeiros 15 dias de tratamento.

Apesar da maioria das crianças haver apresentado clareamento das bandas até 14 dias de tratamento, 12 pacientes seguidos na presente pesquisa voltaram a apresentar reações positivas na PCR após reações negativas, até 3 meses após o tratamento; 11 delas voltaram a mostrar reações negativas até o 6º mês e todas permaneceram assintomáticas; uma criança voltou a apresentar reação positiva, seguida de recidiva clínica e laboratorial do quadro de LV.

Outros autores detectaram reações positivas alguns meses após ou por tempo prolongado após o tratamento. Maurya et al. (2005), seguindo 60 pacientes imunocompetentes por seis meses, também verificaram que 25% apresentavam reações positivas no primeiro mês após tratamento e no terceiro mês ainda havia presença de bandas em 3,3%, sendo que somente no sexto mês todos apresentavam PCR em sangue periférico negativa. Disch et al. (2004), do mesmo modo, utilizaram a detecção de DNA de *Leishmania* no sangue periférico para a avaliação da cura na LV e verificaram que 16/17 (94,1%) dos pacientes com PCR positiva antes do tratamento apresentaram resultados negativos até 37 dias após o início do mesmo, permanecendo negativos até três meses após; no entanto, um paciente apresentou DNA detectável até 145 dias após o tratamento, negativando-se somente oito meses após.

Na atualidade discute-se se a presença de reações positivas em PCR após tratamento da LV se deve à presença de DNA livre ou de parasitos viáveis. A presença de DNA livre seria justificada levando-se em conta que este pode ser detectado pela PCR durante semanas após a morte de bactérias (JOSEPHSON; GERBA, PEPPER, 1993); no entanto, Osman et al. (1998) e Lachaud et al. (2000) detectaram a presença de reações positivas durante o seguimento de pacientes portadores de HIV que apresentaram recidivas, sugerindo que, no caso da leishmaniose, esse resultado indica a presença de leishmânias viáveis ao invés de ácido nucléico livre.

No presente estudo foram avaliadas apenas crianças imunocompetentes. Acredita-se que o reaparecimento de bandas positivas pode significar que o tratamento, mesmo com o medicamento leishmanicida mais potente, anfotericina B, não consegue erradicar a totalidade dos parasitos e microorganismos viáveis voltam a circular, permanecendo quiescentes ou não, conforme a imunocompetência do hospedeiro.

Mesmo indivíduos imunocompetentes podem apresentar recidivas, geralmente associadas a tratamentos incompletos (BERHE et al., 1994; MALTEZOU et al., 2000), pois o tempo de tratamento ideal na LV é difícil de ser avaliado; a única criança que recidivou durante o estudo havia utilizado anfotericina B na dose total de 20mg/kg; foi retratada com 40mg/kg e continua em seguimento, aparentemente bem.

Assim sendo, o reaparecimento ou a manutenção de reações positivas na PCR após o tratamento determina a necessidade de uma atenção redobrada aos pacientes que apresentarem esse tipo de resposta.

Nas 11 crianças que voltaram a apresentar reações positivas e que permaneceram assintomáticas, todas as bandas encontradas eram de fraca intensidade e tornaram-se negativas após 6 meses. A criança que apresentou recidiva também voltou a apresentar reação positiva, porém, ao final do tratamento a PCR foi negativa. No entanto, a intensidade da banda apresentada no segundo mês de seguimento era de forte intensidade. Como o paciente encontrava-se assintomático, permaneceu em acompanhamento e no mês seguinte retornou com febre, esplenomegalia e provas parasitológicas positivas.

A reação positiva pela PCR, portanto, foi detectada antes do paciente apresentar reaparecimento de sintomatologia sugestiva. Os resultados sugerem que, além da vigilância redobrada aos pacientes que apresentam bandas detectáveis após tratamento, a verificação da intensidade das mesmas deve ser analisada com atenção.

A capacidade da PCR no sangue periférico de prever recidivas antes do reaparecimento dos sinais clínicos é bem caracterizada em pacientes HIV positivos, confirmando a utilidade dessa reação no controle de cura desse tipo de pacientes, imunossuprimidos e sujeitos frequentemente a recorrência da doença (BOSSOLASCO et al., 2003; CRUZ et al., 2002; FISA et al., 2002; LACHAUD et al. 2000; PIZZUTO et al., 2001). Cruz et al. (2002) seguindo pacientes co-infectados com HIV e *Leishmania*, relataram que as recidivas foram previstas em média cinco meses antes do que quando se utilizaram as técnicas parasitológicas clássicas. Fisa et al. (2002) também descrevem a persistência de PCR positiva em pacientes portadores de HIV, predizendo relapso mesmo na ausência de sinais clínicos e antes das culturas tornarem-se positivas.

O papel do seguimento de pacientes imunocompetentes pela PCR em sangue periférico tem sido menos abordado na literatura. Cascio et al. (2002) estudaram um pequeno número de crianças (seguiram dez durante e após tratamento), e também

detectaram rápido reaparecimento de PCR positiva no sangue periférico no caso de uma recidiva. Esses resultados reforçam a necessidade da realização de outras experiências no seguimento de pacientes imunocompetentes tratados para LV, com um número maior de pacientes assim como na presente casuística. Os resultados indicam que a PCR em sangue periférico pode detectar a presença de parasitemia antes do retorno dos sintomas, reafirmando a utilidade do método também no controle de cura de crianças imunocompetentes.

Segundo Lachaud et al. (2000), a monitorização sistemática pela PCR no sangue periférico deve ser realizada numa frequência de um teste a cada trimestre durante o primeiro ano após o tratamento. Com o presente estudo, sugere-se que este controle deva ser feito pelo menos nos três primeiros meses após o término da terapêutica e que os pacientes que persistirem apresentando reações positivas após este período continuem sendo submetidos a monitoramento de intervalos mais curtos.

No presente trabalho a PCR-RFPL foi usada para identificar a espécie de *Leishmania* nas crianças da região, tendo em vista que o Estado é área endêmica também para LT, comprovando assim a etiologia dos casos por *Leishmania infantum chagasi* (SCHALLIG; OSKAM, 2002). Além de esclarecer sobre a epidemiologia da doença, o conhecimento das espécies pode ajudar no planejamento de estratégias de controle.

A PCR em sangue periférico mostrou-se útil tanto para o diagnóstico como para o seguimento após a terapêutica dos casos de LV em crianças. Sugere-se que este método deva ser considerado para utilização na infância, pois é de fácil realização, menos invasivo, o que permite coletas frequentes de amostras, melhor aceito pelos pacientes do que a punção medular, mais sensível e mais rápido do que os tradicionais métodos parasitológicos e pode constituir um marcador útil para a detecção de possíveis recidivas.

7 CONCLUSÕES

A PCR em amostras de sangue periférico mostrou-se uma ferramenta de elevada sensibilidade para o diagnóstico da LV em crianças.

A PCR em sangue periférico detectou um maior número de crianças infectadas por *Leishmania* do que a microscopia direta e a cultura, métodos tradicionalmente utilizados no diagnóstico da LV.

A PCR no sangue periférico mostrou-se tão sensível quanto à realizada em aspirado medular para o diagnóstico da LV em crianças.

PCR em sangue periférico pode ser útil no controle de cura após tratamento, pois torna-se negativa na maioria dos pacientes eficazmente tratados, podendo voltar a positivar-se anteriormente ao reaparecimento dos sintomas, em casos de recidiva.

A PCR-RFLP utilizada para a identificação específica, demonstrou que *Leishmania infantum chagasi* foi o agente etiológico da LV nas crianças deste estudo.

Os resultados apontam para o emprego da PCR em sangue periférico tanto para o diagnóstico da LV na infância como para o seguimento dos casos após o tratamento, por ser este um método mais sensível e específico com procedimento de coleta menos invasivo, podendo substituir com vantagem, os tradicionais procedimentos invasivos.

REFERÊNCIAS

- ABE, A.; INOUE, K.; TANAKA, T.; KATO, J.; KAJIYAMA, N.; KAWAGUCHI, R.; TANAKA, S.; YOSHIBA, M.; KOHARA, M. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2899- 2903, Sep. 1999.
- ADHYA, S.; CHATTERJEE, M.; HASSAN, M. Q.; MUKHERJEE, S.; SEN, S. Detection of *Leishmania* in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 622-624, Nov./Dec. 1995.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR, B.; JIMENEZ, M.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 298-319, Apr. 1997.
- AMRO, A.; AZMI, K.; SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; ALSHARABATI, M. B.; SAWALHA, S.; HAMARSHEH, O.; EREQAT, S.; ABDEEN, Z. Epidemiology of paediatric visceral leishmaniasis in Hebron district, Palestine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 329-333, Nov. 2008.
- ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; DOS SANTOS, S. L.; VOLPINI, A. C.; MARQUES, J. M.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 10, p. 231-238, Sep. 2006.
- 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 and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 12, p. 1602-1610, Mar. 2007.
- ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 145-146, Apr./June. 1996.
- ÁVILA, H.; GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 175-187, Sep./Oct. 1990.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds). Tratado de Infectologia. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.
- BASSLER, H. A.; FLOOD, S. J.; LIVAK, K. J.; MARMARO, J.; KNORR, R.; BATT, C. A. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3724-3728, Oct. 1995.

BAUZER, L. G. S. R.; SOUZA, N. A., MAIGON, R. D. C; PEIXOTO, A. A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p.11-12, Feb. 2007.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUROUX, D.; DUNAN, S. Canine Leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273–277, Sept. 1996.

BERHE, N.; ALI, A.; HAILU, A.; YENENEH, H. Relapse in Ethiopian visceral leishmaniasis (VL) patients after therapy with pentavalent antimonials: a ten year observation. **Acta Tropica**, v, 57, n. 1, p. 83-90, June 1994.

BORST, P.; HOEIJMAKERS, J. H. Kinetoplast DNA. **Plasmid**, v. 2, n. 1, p. 20-40, Jan. 1979.

BOSSOLASCO, S.; GAIERA, G.; OLCHINI, D.; GULLETTA, M.; MARTELLO, L.; BESTETTI, A.; BOSSI, L.; GERMAGNOLI, L.; LAZZARIN, L.; UBERTI-FOPPA.; CINQUE, P. Real-Time PCR Assay for Clinical Management of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5080-5084, Nov. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento, de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J. F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 828-831, July 2001.

BREWSTER, S.; ASLETT, M.; BARKER; D. C. Kinetoplast DNA minicircle database. **Parasitology Today**, v. 14, n. 11, p. 437-438, Nov. 1998.

BRUÑA-ROMERO, O.; HAFALLA, J. C. R.; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; SANO, G.; TSUJI, M.; ZAVALA, F. Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single Anopheles mosquito using a highly sensitive real-time PCR. **International Journal of Parasitology**, v.31, n. 13, p. 1499-1502, 2001.

BRUSTOLONI, Y. M.; PIRMEZ, C.; CUNHA, R. V.; DORVAL, M. E.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L.; LIMA, R. B. Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children of the Center-West Region of Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 106-109, Feb. 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. A leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**. 6, 2004. Disponível em: < http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa48_lva.htm >. Acesso em: 7 maio 2009.

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.

CHOCHOLOVÁ, E.; JIRKŮ, M.; LUKES, J. A diagnostic assay based on variable intergenic region distinguishes between *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. **Folia Parasitologica**, v. 55, n. 1, p. 75-78, Mar. 2008.

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, Apr. 2002.

COOPER, A. DNA from museum specimens. In: Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. **Springer Verlag**, p. 149-165. 1994.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.- specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12-17, Jan. 2004.

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

COSTA FILHO, A. V.; ÍRIS CAMPOS, L. S.; NONATA RIBEIRO, R. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424-427, July./Aug. 2008.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* sp previous note. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-9, 1937.

CUPOLILLO E; GRIMALDI JR. G.; MOMEN, H. A General Classification of New World *Leishmania* Using Numerical Zymotaxonomy. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 296-311, 1994.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR. G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S. M. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 1-2, p. 145-55, Jul. 1995a.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR. G.; MOMEN, H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 17-23, Feb. 1995b.

CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; RUBIO, J. M.; MORALES, M. A.; CHICHARRO, C.; LAGUNA, F.; JIMÉNEZ-MEJÍAS, M.; SIRERA, G.; VIDELA, S.; ALVAR, J. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 185-189, April 2002.

CRUZ, I.; CHICHARRO, C.; NIETO, J.; BAILO, B.; CAÑAVATE, C.; FIGUERAS, M. C.; ALVAR, J. Comparison of New Diagnostic Tools for Management of Pediatric Mediterranean Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2343-2347, July 2006.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117-118, Feb. 2006.

DA SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. D. A. S.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 2, p. 251-257, Mar. 2004.

DA SILVA, M. R.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. Sensivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 8111-8114, Nov. 2005.

DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposas (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectadas pela *Leishmania donovani*. **O Hospital**, v. 46, p. 651-653, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p. 61-76, 1955.

DEBORGGRAEVE, S.; BOELAERT, M.; RIJAL, S.; DE DONCKER.; DUJARDIN, JEAN-CLAUDE.; HERDEWIJN, PIET.; BUSCHER, P. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, n. 11, p. 1378-1383, Nov. 2008.

DE BRUIJN, M. H.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52, n. 1, p. 45-58, Sept. 1992.

DE LA CRUZ, V. F., NECKELMANN, N.; SIMPSON, L. Sequences of six genes and several open reading frames in kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 24, p. 15136-15147, Dec. 1984.

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

DISCH, J.; OLIVEIRA, M. C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 92, n. 3, p. 279-283, Nov./Dec. 2004.

DISCH, J.; CALIGIOME, R.; MACIEL, F.; OLIVEIRA, M.; ORSINI, M.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, n. 4, p. 395-400, July 2006.

DONOVAN, J. W.; LADETTO, M.; ZOU, G.; NEUBERG, D.; POOR, C.; BOWERS, D.; GRIBBEN, J. G. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 15, n. 95, p. 2651-2658, Apr. 2000.

ELLIS, J. T.; CRAMPTON, J. M. Differences between *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *L. (L.) infantum* and *L. (L.) donovani* as shown by DNA fingerprinting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 479-481, Oct./Dec. 1991.

ENGLUND, P. T. The molecular biology of Trypanosomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 51, p. 695-726, July 1982.

ERESH, S.; MCCALLUM, S. M.; BARKER, D. C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**, v. 109, n. 4, p. 423-433, Nov. 1994.

FERNANDES, O., MURTHY, V. K., KURATH, U., DEGRAVE, W. M., CAMPBELL, D. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 66, n. 2, p. 261-271, Aug. 1994.

FERREIRA, E. C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S.; SCHALLIG, H., GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 235-241, May 2007.

FERROGLIO, E.; ROMANO, A.; TRISCIUOGLIO, A.; POGGI, M.; GHIGGI, E.; SACCHI, P.; BIGLINO, A. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 7, p. 636-41, July 2006.

FISA, R.; RIERA, C.; RIBERA, E.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 191-194, Apr. 2002.

FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. New Horizons in the identification and taxonomy of the *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 1, p. 122-132, 2008.

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. 338-347, Sept. 2004.

GRAMICCIA, M.; SMITH, D. F.; ANGELICI, M. C.; READY P. D.; GRADONI, L. A. Kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 29-34, Aug. 1992.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELART, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, Aug. 2002.

HERMSEN, C. C.; TELGT, D. S.; LINDERS, E. H.; VAN DE LOCHT, L. A.; ELING, W. M.; MENSINK, E. J.; SAUERWEIN, R. W. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 247-251, Dec. 2001.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, July 1993.

JAUREGUI, L. H.; HIGGINS, J.; ZARLENGA, D.; DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. **American Society for Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2065-2071, June 2001.

JOSEPHSON, K. L.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3513-3515, Oct. 1993.

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

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, June 2008.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 23-152, 1995.

KATAKURA, K.; KAWAZU, S.; NAYA, T.; NAGAKURA, K.; ITO, M.; AIKAWA, M.; QU, J. Q.; GUAN, L. R.; ZUO, X. P.; CHAI, J. J.; CHANG, K. P.; MATSUMOTO, Y. Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2173-2177, Aug. 1998.

KENNEDY, W. P. Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of *Leishmania* isolates by recombinant DNA techniques and in situ hybridisation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 12, n. 3, p. 313-325, Jul. 1984.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. **Bull Society Pathology Exotic Filiales**, v. 78, n. 5, p. 747-755, 1985.

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

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, Fev. 2001.

LACHAUD, L.; HAMMAMI, S. M.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, Jan. 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R., ed. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London, Academic Press, v. 1, p. 1-121, 1987.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias Instituto do Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, Dec. 2005.

LANÚS, E. C.; PIÑERO, J. E.; GONZÁLEZ, A. C.; VALLADARES, B.; DE GROSSO, M. L.; SALOMÓN, O. D. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 187-192, Apr. 2005.

LECLERCQ, V.; LEBASTARD, M.; BELKAID, Y.; LOUIS, J.; MILON, G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: A tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 10, p. 4537-4545, 1996.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of tripanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v. 21, p. 1376-1377, May 1093.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 19-27, Oct. 2002.

LOGAN, J. M. J.; EDWARDS, K. J.; SAUNDERS, N. A.; STANLEY, J. 2001. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of bioprobes in real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2227-2232, 2001.

- LYNCH, J. R.; BROWN, J. M. The polymerase chain reaction: current and future clinical applications. **Journal of Medical Genetics**, v. 27, n. 1, p. 2-7, Jan. 1990.
- MAIA-ELKHOURY, A. N.; ALVES, W. A. ; DE SOUSA-GOMES, M. L.; DE SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, Dec. 2008.
- MALTEZOU, H. C.; SIAFAS, C.; MAVRIKOU, M.; SPYRIDIS, P.; STAVRINADIS, C.; KARPATIOS, T.; KAFETZIS, D. A. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 1139–1143, Jan. 2000.
- MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; PINEDA, J. A.; ANDREU-LOPEZ, M.; DELGADO, J.; MACÍAS, J.; DE LA ROSA, R.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 96, n. 7, p. 669-677, Oct. 2002.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 34-37, 1994.
- MATO GROSSO DO SUL. Governo do Estado do Mato Grosso do Sul. Secretaria do Estado da Saúde. Serviço de Vigilância Epidemiológica. Relatório de Notificações de LV. SINAN. **Leishmanioses**. 2008. Disponível em <
http://www.saude.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=116&id_comp=677&id_reg=4533&voltar=lista&site_reg=116&id_comp_orig=677 > Acesso em: 7 de maio, 2009.
- MATTNER, F.; PADOVA, K.; ALBER. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. **Infection and Imunity**, v. 65, n. 11, p. 4378-4383, Nov. 1997.
- MAURYA, R.; SINGH, R. K.; KUMAR, B.; SALOTRA, P.; RAI, M.; SUNDAR, S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3038-3041, July 2005.
- MELBY, P.C.; YANG, Y.Z.; CHENG, J.; ZHAO, W. Regional defferences in the cellular immune to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. **Infection and Imunity**, v. 66, n. 1, p. 18-27, Jan. 1998.
- MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, July/Aug. 2008.
- MORALES, M.A.; ARES, C.; CANAVATE, C.; BARKER, D.C.; ALVAR, J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 104-107, Jan./Feb. 2001.
- MORRISON, T. B., C. T. Quantification of low copy transcripts by continous SYBR GREEN I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v. 24, n. 6, p. 954-962, June 1998.

MORRISON, T. B.; MA, Y.; WEISS, J. H.; WEIS, J. J. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 987-992, Apr. 1999.

MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 163-167, June 2004.

MULLER, N.; ZIMMERMANN, V.; FORSTER, U.; BIENZ, M.; GOTTSTEIN, B.; WELLE, M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 223-229, June 2003.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, Oct. 2005.

NASEREDDIN, A.; EREGAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C.L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 178-183, Feb. 2006.

NASEREDDIN, A.; AZMI, K.; JAFFE, C. L.; EREQAT, S.; AMRO, A.; SAWALHAH, S.; BANETH, G.; SCHÖNIAN, G.; ABDEEN, Z. Kinetoplast DNA heterogeneity among *Leishmania infantum* strains in central Israel and Palestine. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 126-130, Dec. 2009.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 5, p. 1666-1669, May 2002a.

NICOLAS, L.; MILON, G.; PRINA, E. Rapid differentiation of world *Leishmania* species by lightcycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, n.3, p. 295-299, Nov. 2002b.

NUNES, V. L. B.; YAMAMOTO, Y. Y.; REGO, JR, F. A.; DORVAL, M. E. C.; GALATI, E. A. B.; OSHIRO, E. T. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1-2, p. 17-21, May./Jun. 1988.

OLIVEIRA, A. L. L. Estudos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2000-2005. Rio de Janeiro. Doutorado [Medicina Tropical]. Instituto Oswaldo Cruz. 2006.

OSMAN, O. F.; KAGER, P. A.; ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M.; OSKAM, L. Use of PCR on lymph-node sample as test of cure of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 91, n. 7, p. 845-850, Oct. 1997.

OSMAN, O. F.; OSKAM, E. E.; ZIJLSTRA, A. M.; EL-HASSAN, D. A.; EL-NAEIM, KAGER, P. A. Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 4, p. 397-400, July/Aug. 1998.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F.; COSTA, P.; PAULOCCI, P. F. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sand flies (Diptera, Psychodidae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 87-94, Jan. 2007.

PALATNIK, C. B.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; BOROJEVIC, R. A. New approach to the phylogeny of *Leishmania*: species specificity of glycoconjugate ligands for promastigote internalization into murine macrophages. **Parasitology Research**, v. 76, n. 4, p. 289-293, Apr. 1990.

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.

PASSOS, V. M. A.; LASMAR, E. B.; GONTIJO, C. M. F.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. I. M. Natural Infection of a Domestic Cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 19-20, Jan./Feb. 1996.

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

PIESMAN, J.; SCHNEIDER, B. S.; ZEIDNER, N. S. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdoferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4145-4148, Nov. 2001.

PIRMEZ, C.; DA SILVA TRAJANO, V.; PAES-OLIVEIRA NETO, M.; DA-CRUZ, A. M.; GONÇALVES-DA-COSTA, S. C.; CATANHO, M.; DEGRAVE, W.; FERNANDES, O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1819-1823, June 1999.

PIZZUTO, M.; PIAZZA, M.; SENESE, D.; SCALAMOGNA, C.; CALATTINI, S.; CORSO, L. 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.

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, v. 17, n. 3, p. 177-190, May 1987.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, Set. 1999.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are with

severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, Aug. 2006.

REITHINGER, R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D. C.; DAVIES, C. R. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 748-751, Feb. 2000.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; COURTENAY, O.; DAVIES, C. R. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1486-1493, Abr. 2003.

RIÇA-CAPELA, M. J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M. C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology Research**, v. 89, n. 3, p. 163-169, Feb. 2003.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, n. 3, p. 111-125, 1990.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, Oct. 1990.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1150-1154, Oct. 2004.

RYAN, K. A. Replication of kinetoplast DNA in trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, p. 339-358, Oct. 1988.

SCHAEFER, K. U.; SCHOONE, G. J.; GACHIHI, G.S.; MULLER, A. S.; KAGER, P.A.; MEREDITH, S. E. Visceral leishmaniasis: use of the polymerase chain reaction in an epidemiological study in Baringo District, Kenya. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 5, p. 492-495, Sep./Oct. 1995.

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

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, Set. 2003.

SCHUBACH, A.; HADDAD, F.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; GRIMALDI, JR. G.; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain

reaction in scars of treated human patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 3, p. 911-914, Sept. 1998.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE MATO GROSSO DO SUL. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmnaiose. **Boletim interno**, Set. 2006.

SERIDI, N.; BELKAID, M.; QUISPE-TINTAYA, W.; ZIDANE, C.; DUJARDIN, J. C. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 6, p. 556-563, Jun. 2008.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 117-143, Oct. 1995.

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 Insituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, Aug. 2006.

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

SIDDIG, M.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, D. C.; PETERSEN, E. A. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 66-68, 1988.

SIMPSON, L.; NECKELMANN, N.; DE LA CRUZ, V. F.; SIMPSON, A. M.; FEAGIN, J. E.; JASMER, D. P.; STUART, J. E. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 13, p. 6182-6196, May. 1987.

SINGH, N.; CURRAN, M. D.; RASTOGIL, A. K.; MIDDLETON, D.; SUNDAR, S. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. **Tropical Medicine & International Health**, v. 4, n. 6, p. 448-453, Jun. 1999.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 5, p. 55-6, Jan./Mar. 2003.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 311-330, Mar. 2006.

SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN, M. Q.; BASU, D.; DE BRUIJN, M. H.; ADHYA, S.; MALLIK, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, n. 105, v. 2, p. 183-192, Oct. 1992.

SOBRINO, R.; FERROGLIO, E.; OLEAGA, A.; ROMANO, A.; MILLAN, J.; REVILLA, M.; ARNAL, M. C.; TRISCIUOGLIO, A.; GORTÁZAR, C. Characterization of widespread

canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 3-4, p. 198-203, Aug. 2008.

STARK, D.; PETT, S.; MARRIOTT, D.; HARKNESS, J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1178-1180, Mar. 2006.

STAUBER, L. A.; FRANCHINO, E. M.; GRUN, J. Na eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamster. **The Journal of Protozoology**, v. 5, n. 4, p. 269-273, 1958.

STEINERT, M.; VAN ASSEL, S. Base composition heterogeneity in kinetoplast DNA from four species of hemoflagellates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 23/61, n. 4, p. 1249-1255, Dec. 1974.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 205-214, Mar. 1989.

STURM, N. R.; SIMPSON, L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. **Cell Press**, v. 61, n. 5, p. 879-884, June 1990.

THAKUR, C. P.; KUMAR, M.; KUMAR, P.; MISHRA, B. N.; PANDEY, A. K. Rationalisation of regimens of treatment of kala-azar with sodium stibogluconate in India: a randomized study. **British Medical Journal**, v. 296, n. 6636, p. 1557-1561, June 1988.

THAKUR, C. P.; THAKUR, S.; NARAYAN, S.; SINHA, A. Comparison of treatment regimens of kala-azar based on culture & sensitivity of amastigotes to sodium antimony gluconate. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, n. 6, p. 582-586, June 2008.

VOLPINI, A. C. PCR-RFLP mkDNA no diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2003.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M. A.; OLIVEIRA, G. O.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 31-37, Mar. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of leishmaniasis. Geneve: WHO, 2006. (**Technical Report Series**, v. 793, p. 50-52).

XIAO-SU, H.; WEN-TIAN, Y.; HONG-GANG, L.; HE-PING, Y.; JIAN-PING, C.; YING, M.; BAO-QIAN, J.; TAO, Z. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 822-826, Aug. 2000.

ZIJLSTRA E. E.; ALI M. S.; EL-HASSAN A. M.; EL-TOUM I. A.; SATTI M.; GHALIB H. W.; KAGER P. A. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct

agglutination test in diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 505-507, Sep./Oct. 1992.

ZIJLSTRA, E. E.; SIDDIG, A. L. I. M.; EL-HASSAN, A. M.; HOFLAND, H. W.; EL-TOUM, I.; SATTI, M.; GHALIB, H. W. The treatment of kala-azar in the Sudan with sodium stibogluconate: a randomized trial of three dosage regimens. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 307-309, May./Jun. 1993.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / CEP / UFMS



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



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1146 do Pesquisador Thiago Leite Fraga intitulado "PCR no sangue periférico como método de diagnóstico e de controle no tratamento de crianças com Leishmaniose Visceral", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião extraordinária no dia 12 de junho de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. ~~Odair Pimentel Martins~~

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 18 de junho de 2008.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187