

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado acadêmico em Saúde Pública

ELAINE CRISTINA BOMFIM DE LIMA

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS EXAMES PARASITOLÓGICO E
MOLECULAR EM AMOSTRAS DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA NO
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES COM E SEM O
HIV/Aids**

RECIFE
2012

ELAINE CRISTINA BOMFIM DE LIMA

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS EXAMES PARASITOLÓGICO E
MOLECULAR EM AMOSTRAS DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA NO
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES COM E SEM O
HIV/Aids**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Zulma Maria de Medeiros

Recife

2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- L732c Lima, Elaine Cristina Bomfim de.
Avaliação do desempenho dos exames parasitológico e molecular em amostras do aspirado de medula óssea no diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes com e sem HIV/Aids / Elaine Cristina Bomfim de Lima. - Recife: s.n, 2012.
61, p.: ils.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.
Orientadora: Zulma Maria de Medeiros.
1. Leishmaniose visceral. 2. Síndrome de Imunodeficiência adquirida. 3. Exame de medula óssea. 4. Reação em cadeia da polimerase. I. Medeiros, Zulma Maria de. III. Título.

CDU 616-002.5

ELAINE CRISTINA BOMFIM DE LIMA

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS EXAMES PARASITOLÓGICO E
MOLECULAR EM AMOSTRAS DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA NO
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES COM E SEM O
HIV/Aids**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 27/04/2012

BANCA EXAMINADORA

Dra. Zulma Maria de Medeiros
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Léucio Camara Alves
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado à vida.

Aos pacientes com suspeita de leishmaniose visceral por aceitarem fazer parte deste trabalho.

As equipes dos hospitais envolvidos na pesquisa pelo profissionalismo e colaboração.

Aos meus pais, Teresa e Marcos, pela dedicação, incentivo, cuidado, apoio e amor. Por ter me educado e ter proporcionado condições para que eu alcançasse meus objetivos. Vocês são grandes exemplos na minha vida.

Ao meu irmão, Leo, pela sua eterna paciência, dedicação, incentivo e colaboração na parte estatística.

À minha orientadora, Zulma Medeiros, pela oportunidade e pelo apóio oferecido. Sua orientação, amizade e paciência são muito valiosas para mim.

À minha co-orientadora, Edileuza Brito pelos ensinamentos, sugestões e companheirismo que foram essenciais para a realização deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Doenças Transmissíveis pelos bons momentos e apoio no dia-a-dia. Agradeço, sobretudo, as colaborações de Fábio Melo e Luiz Dias, pela ajuda durante a elaboração da dissertação. Agradeço também a Almerice, pelo apoio nos experimentos envolvendo a PCR.

Aos amigos do Mestrado em Saúde Pública, pelo convívio diário, que tornaram meus dias mais agradáveis.

Ao Aggeu por fornecer a estrutura e todos os equipamentos que foram necessários durante o desenvolvimento desse trabalho e a Pós Graduação do curso de Saúde Pública pela oportunidade.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente participaram da realização desse trabalho.

Muito obrigada!

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luis Fernando Veríssimo

LIMA, E.C.B. **Avaliação do desempenho dos exames parasitológico e molecular em amostras do aspirado de medula óssea no diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes com e sem HIV/Aids.** 2012. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

RESUMO

Os casos suspeitos de leishmaniose visceral têm como suporte diagnóstico o exame direto da *Leishmania* sp., que é o padrão ouro, mas apresenta sensibilidade variando de 60% a 85%. A mielocultura é indicada para aumentar a sensibilidade do diagnóstico parasitológico. Já o uso da técnica da PCR vem se mostrando promissora, entretanto, ainda não há um sistema validado para o diagnóstico dessa parasitose. Assim, não se dispõe de exame rápido, sensível e que dispense a realização da coleta invasiva. Desta forma, um estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o desempenho dos exames parasitológico e molecular, utilizando amostras do aspirado de medula óssea no diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes com e sem HIV-Aids. Para responder ao objetivo foi desenvolvido um estudo descritivo, com amostra de conveniência dos casos suspeitos de calazar, internos nos hospitais em Recife, Pernambuco. Com o aspirado de medula óssea foi realizado diagnóstico parasitológico (exame direto, cultura NNN e caracterização do parasito) e o molecular, baseado na PCR, utilizando os *primers* RV1 e RV2. Um total de 22 pacientes com suspeita clínica de calazar foi incluído no estudo, com idade variando de 8 meses a 63 anos, sendo 59% do sexo masculino. Estes indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com a presença (Grupo I) ou ausência (Grupo II) de HIV/Aids. Nove pacientes realizaram a comparação das três técnicas. O exame direto conseguiu diagnosticar dois casos, sendo apenas um positivo na cultura. Um caso de co-infecção teve resultado positivo nas duas técnicas parasitológicas. Já a PCR identificou cinco casos, três que não foram diagnosticados pelo exame parasitológico. O parasito isolado do caso de co-infecção procedente de Santa Cruz do Capibaribe, foi caracterizado como *L. infantum* (sin. *L. chagasi*). Sugerimos que caso haja a indicação clínica da punção externa para coleta do aspirado de medula óssea, a PCR deva ser utilizada em conjunto com os exames parasitológicos para facilitar o diagnóstico e a condução clínica desses pacientes.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, Síndrome de Imunodeficiência adquirida, Exame de medula óssea, Reação em cadeia da polimerase.

LIMA, E.C.B. **Performance avaluation by parasitological and molecular tests on samples of bone marrow aspirate in the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with and without HIV/Aids.** 2012. Dissertation (Academic Master in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

ABSTRACT

Suspected cases of visceral leishmaniasis diagnosis are supported by direct examination of *Leishmania* sp., which is the gold test, but has a sensitivity ranging from 60% to 85%. The mielocultura is indicated to increase the sensitivity of parasitological diagnosis. But the use of PCR has proven to be promising, however, there is still no validated system for the diagnosis of the disease. Thus, there are no exam rapid, sensitive and that does not invasive blood sampling. Thus, a study was conducted in order to compare the performance of parasitological and molecular tests, using samples of bone marrow aspirate in the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with and without HIV-AIDS. To meet the objective was to develop a descriptive study with a convenience sample of suspected cases of leishmaniasis, built hospitals in Recife, Pernambuco. With the bone marrow aspirate was performed parasitological diagnosis (direct examination, culture and characterization of parasite NNN) and molecular-based PCR by using the *primers* RV1 and RV2. A total of 22 patients with clinical suspicion of kalazar was included in the study, ranging in age from 8 months to 63 years, 59% were male. These individuals were divided into two groups according to the presence (Group I) or absence (Group II), HIV / Aids. Nine patients underwent a comparison of three techniques. Direct examination could diagnose two cases, only one positive culture. A case of co-infection was positive in both parasitological techniques. Have PCR identified five cases, three who were not diagnosed by stool examination. The parasite isolated from the case of co-infection coming from the Santa Cruz Capibaribe, was characterized as *L. infantum* (syn. *L. chagasi*). We suggest that if there is clinical indication of external puncture for collection of bone marrow aspirate, PCR should be used in conjunction with parasitological examinations to facilitate the clinical management of these patients.

Keywords: Leishmaniasis visceral; Acquired Immunodeficiency Syndrome, Bone marrow examination, Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fêmea de <i>Lutzomya longipalpis</i> , principal vetor da LV no Novo Mundo.....	16
Figura 2 – Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i>	17
Figura 3 – Distribuição geográfica da leishmaniose visceral humana nos países do Velho e Novo Mundo.....	18
Quadro 1 – Perfil epidemiológico dos pacientes com suspeita de leishmaniose visceral atendidos hospitais do Recife, PE, em 2011.....	39
Quadro 2 – Procedência e resultado da presença de HIV/Aids nos pacientes investigados nos hospitais do Recife, PE, em 2011.....	40
Figura 4 - Forma promastigota de <i>Leishmania</i> em meio de cultura de paciente com co-infecção LV/HIV-Aids, no período de 2011-2012, em Pernambuco.....	44
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) utilizando algumas amostras de medula óssea através da PCR com os <i>primers</i> RV1 e RV2, no período de 2011-2012, em Pernambuco.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis relacionadas ao sexo, faixa etária, mesorregiões de Pernambuco, clínica e aspectos hematológicos dos pacientes com e sem HIV/Aids, durante o período de 2011-2012 em Pernambuco.....	41
Tabela 2 – Frequência absoluta e relativa dos exames parasitológico e molecular entre os grupos com e sem HIV/Aids, no período de 2011-2012, em Pernambuco.....	43
Tabela 3 – Comparação dos resultados das técnicas diagnósticas entre os indivíduos pesquisados no período de 2011-2012, em Pernambuco.....	45
Tabela 4 - Avaliação do desempenho da PCR em relação ao exame direto e mielocultura no Grupo I e II no período de 2011-2012, em Pernambuco.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CDC	Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CN	Controle negativo
CNS	Comitê Nacional de Saúde
CP	Controle positivo
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DAT	Teste de aglutinação direta
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HAM	Hospital Agamenon Magalhães
HBL	Hospital Barão de Lucena
HC	Hospital das Clínicas
HCP	Hospital Correia Picanço
HGOF	Hospital Geral Otávio de Freitas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência indireta
IL	Interleucina
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
KAtex	Teste de aglutinação do látex
kDNA	Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto
LV	Leishmaniose visceral
MLEE	Eletroforese enzimática
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
OMS	Organização mundial de saúde

PA	Pará
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmols	Picomoles
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SES	Secretaria de Saúde
SRL	Serviço de Referência em leishmaniose
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
μl	Microlitro

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	15
1.1 Aspectos taxonômicos, epidemiológicos e clínicos da leishmaniose visceral	15
1.2 Co-infecção LV/HIV-Aids	20
1.3 Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose visceral	22
1.3.1 Diagnóstico sorológico.....	23
1.3.2 Diagnóstico antigênico.....	24
1.3.3 Diagnóstico parasitológico.....	25
1.3.3.1 Exame direto.....	25
1.3.3.2 Mielocultura.....	25
1.3.4 Diagnóstico molecular.....	26
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4 PERGUNTA CONDUTORA	30
5 MATERIAL E MÉTODO	31
5.1 Tipo de estudo	31
5.2 Local do estudo	31
5.3 População de estudo e período de referência	31
5.4 Definição de caso	32
5.5 Amostras biológicas	32
5.5.1 Exame direto.....	33
5.5.2 Mielocultura.....	33
5.5.2.1 Identificação e caracterização das amostras.....	34
5.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
5.5.3.1 Extração e purificação de DNA.....	35
5.5.3.2 Amplificação do DNA do cinetoplasto de <i>Leishmania sp.</i>	35
5.5.3.3 Análise dos produtos da PCR.....	36
5.6 Considerações éticas	36
5.7 Processamento e análise dos dados	36
6 RESULTADOS	38

6.1 Perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes com suspeita de leishmaniose visceral.....	38
6.2 Caracterização dos pacientes com e sem HIV/Aids.....	40
6.3 Descrição do desempenho dos exames parasitológico e molecular entre os grupos estudados.....	42
6.3.1 Descrição dos resultados do exame direto.....	43
6.3.2 Descrição dos resultados da cultura.....	43
6.4 Descrição do desempenho do exame molecular baseado na PCR entre os grupos estudados.....	44
6.5 Avaliação do desempenho da PCR em relação ao exame direto e a mielocultura nos grupos estudados.....	45
7 DISCUSSÃO.....	47
8 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CPqAM/FIOCRUZ/PE.....	61

1 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

1.1 Aspectos taxonômicos, epidemiológicos e clínicos da leishmaniose visceral

A Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma doença negligenciada que tem os seguintes parasitos responsáveis pela doença: *Leishmania (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani*. A espécie responsável pela doença nas Américas é a *Leishmania (L.) chagasi* e no Velho mundo a *L. (L.) donovani* (DOURADO *et al.*, 2007; GONTIJO; MELO, 2004;).

Existem duas correntes científicas em relação à taxonomia do gênero *Leishmania*. Através de dados genéticos e enzimáticos, a primeira corrente considera que *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* representam a mesma espécie (LUKES *et al.*, 2007; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000) e, por isso, devem ser utilizadas como sinônimas. A segunda defende que esses parasitos são espécies diferentes, e decidiram separá-los em duas subespécies, atribuindo os nomes *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005), estando esta nomenclatura correta (SHAW, 2006).

Esta separação de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* em duas subespécies é em parte aceitável, contudo, estas devem ser consideradas sinônimas até que uma nova classificação para o gênero *Leishmania* seja proposta (DANTAS-TORRES, 2006; LUKES *et al.*, 2007; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000). Por isso, no presente estudo adotaremos a nomenclatura *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) como o agente causador da LV nas Américas.

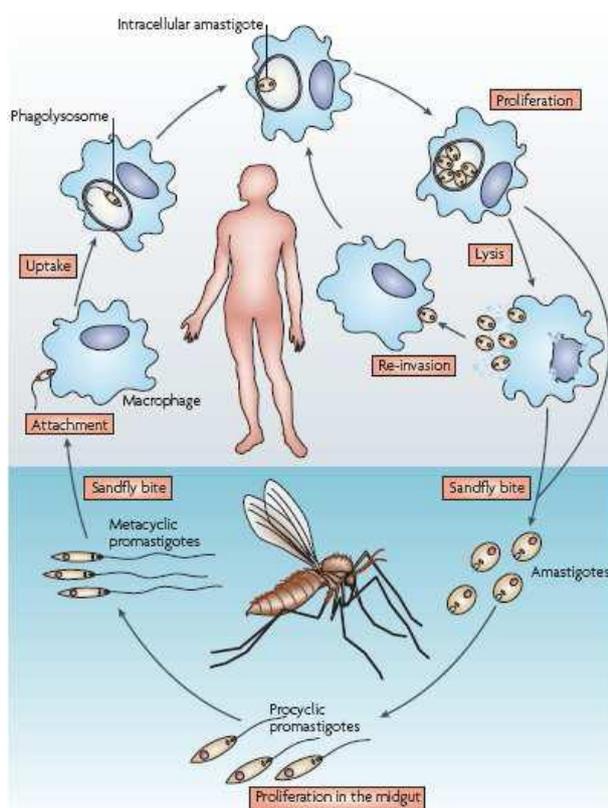
A principal forma de transmissão da LV ocorre por intermédio de um reservatório animal, principalmente canídeo, para humanos através da picada das fêmeas de diversas espécies de pequenos dípteros da família Psychodidae, dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho mundo e da *Lutzomyia*, no Novo mundo (GONTIJO; MELO, 2004) (Figura 1). Outras formas de transmissão relatadas são: congênita, transfusional, através de transplantes de órgãos (ANTINORI *et al.*, 2008) e pelo compartilhamento de agulhas/seringas contaminadas para uso de drogas ilícitas injetáveis. Esta última vem sendo a principal forma de transmissão de LV em países do Mediterrâneo (ALVAR *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2006). Na Índia o ciclo de transmissão principal é através da antroponose, ocorrendo de forma direta pessoa a pessoa (BORA, 1999).

Figura 1: Fêmea de *Lutzomya longipalpis*, principal vetor, da leishmaniose visceral no Novo Mundo



Fonte: Brasil (2006)

A infecção do vetor ocorre quando este, ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania* sp. No interior do inseto, estas se diferenciam em formas promastigotas, e se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária (BRASIL, 2006). Ao realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, o inseto vetor libera as formas promastigotas, que serão fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro. No interior dos macrófagos ocorre a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, que irão se multiplicar intensamente até o rompimento dos macrófagos, levando à liberação das formas amastigotas que poderão se disseminar para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea ou ser ingeridas por novos insetos vetores (Figura 2) (MICHALICK; GENARO, 2005).

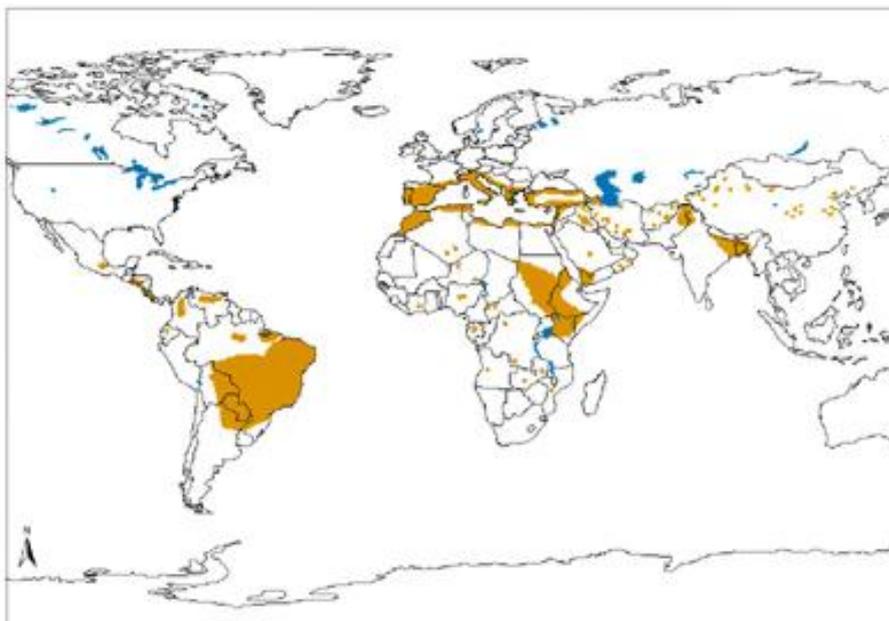
Figura 2: Ciclo de vida do gênero *Leishmania*

Fonte: Chappuis *et al.* (2007).

Nota: A forma promastigota do parasito é transmitida por uma fêmea de flebótomo. Após a transmissão, os parasitas são internalizados pelos macrófagos, mudando para a forma amastigota. As formas amastigotas se multiplicam, destroem a célula hospedeira e infectam outras células fagocíticas, se disseminando nos sistemas linfático e vascular ou re-infectando o inseto vetor.

Esta parasitose apresenta uma distribuição mundial, principalmente nas zonas tropicais e subtropicais e no mediterrâneo. É uma doença considerada negligenciada com uma incidência anual de 500.000 e 59.000 mortes por ano, sendo considerada nível três de prioridade para Organização Mundial de Saúde (2007) e por Faucher e Piarroux (2010). Na figura 3 observa-se que aproximadamente 90% dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (DESJEUX, 2004; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). O número de pessoas expostas à infecção ou infectadas sem sintomas é em algumas áreas muito maior do que o número de casos detectados (MORENO *et al.*, 2002). A doença é mais freqüente em menores de 10 anos e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (GONTIJO; MELO, 2004). A importância da LV reside não somente nesta alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes (DESJEUX, 2004).

Figura 3: Distribuição geográfica da leishmaniose visceral humana nos países do Velho e Novo mundo



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2010)

A LV vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou um crescente problema de saúde pública no Brasil e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (BRASIL, 2010). A mudança do tipo de espaços endêmicos, ou seja, de transmissão da *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) de áreas rurais para urbanas e periurbanas tem ocorrido ao longo do tempo. Vários fatores podem ter contribuído para essa mudança de distribuição geográfica, como a migração e as alterações ambientais. Períodos cíclicos de estiagem associados ao fenômeno climático *El Niño* também estão envolvidos no impacto ecológico do desmatamento e da ocupação das margens fluviais para fins de habitação. Associado a esses fatores, a *Lutzomya* adaptou-se às moradias urbanas e às condições de superpovoamento em conglomerados urbanos, aumentando sua eficiência como vetor (COSTA *et al.*, 2000).

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma doença endêmica. Está distribuída em 21 unidades da federação, atingindo as quatro regiões brasileiras. Em um levantamento no período de dez anos, 1999 a 2009, foi observado que a média anual de casos foi de 3.379 casos e a incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes. A letalidade aumentou de 3,4%, em 1994, para 5,5%, em 2008, o que representou um incremento de 61,8%. A letalidade média de 2005 a 2009 foi de 6,3% (ALVARENGA *et al.*, 2010). A primeira grande epidemia urbana registrada no país ocorreu em Teresina, seguida posteriormente, por epidemias em Natal e São

Luís, e subseqüentemente registrou-se o mesmo comportamento epidemiológico em outras regiões do país (WERNECK, 2010).

Das regiões brasileiras, o Nordeste representa uma grande preocupação, principalmente, pela questão das condições favoráveis do clima na proliferação do vetor conhecido como mosquito palha e transmissão da doença. As capitais dessa região em sua maioria localizam-se no litoral, caracterizadas por um clima úmido e com temperaturas elevadas, condições climáticas favoráveis ao vetor de transmissão (SPYRIDES *et al.*, 2011). Atualmente, a região é responsável por 48% dos casos confirmados do país (BRASIL, 2010).

Em Pernambuco a LV encontra-se amplamente distribuída em todas as regiões geográficas, atingindo em maior número as crianças (DANTAS-TORRES, 2006). Foi descrito a evolução da distribuição geográfica da LV no estado, entre 1990 e 2000. Nesse período, 119 municípios registraram casos, indicando a presença da doença em praticamente todo território pernambucano. Além da histórica concentração de casos no Sertão, observa-se, o registro de 1.190 casos no Agreste e na Região Metropolitana de Recife (DANTAS-TORRES, 2006). Atualmente a distribuição geográfica da LV em Pernambuco ratifica a superação do paradigma da doença tipicamente da zona rural. Neste Estado, o ciclo zoonótico encontra-se claramente estabelecido em áreas urbanas e periurbanas, como nos municípios de Petrolina (CESSE, *et al.*, 2001) e Paulista (DANTAS-TORRES; ALMEIDA; BRANDÃO-FILHO, 2005).

A apresentação clínica da LV caracteriza-se por um amplo espectro, que pode variar desde as manifestações discretas (oligossintomáticas), moderadas e graves que pode levar o paciente à óbito (BRASIL, 2010). É indicado a realização do diagnóstico laboratorial para leishmaniose visceral em pacientes com procedência de área endêmica, com histórico de febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia (SILVA *et al.*, 2011). O primeiro sinal de visceralização é febre baixa recorrente, com dois ou três picos diários, que persiste com remissões durante toda infecção. Esplenomegalia é o achado mais importante e comum no calazar e em geral a dimensão do órgão tem relação proporcional com o tempo de doença. Em pacientes não tratados, ocorre progressiva desnutrição multifatorial devido à inapetência, presença de vômitos, diarreia e o próprio catabolismo decorrente da doença, sendo causa importante do aumento da susceptibilidade as infecções secundárias (BERN, 2010; SEAMAN *et al.*, 1996).

Devido a apresentação do quadro clínico da LV não ser bem definido, testes de confirmação são necessários para decidir quais pacientes devem ser tratados. Esses testes

devem ser sensíveis (> 95%) e específicos, pois os medicamentos para o tratamento da LV são tóxicos (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Para o tratamento da LV no Brasil, o antimoniato-N-metil glucamina e a Anfotericina B são as drogas de escolha primária e secundária, respectivamente, sendo a primeira distribuída gratuitamente pelo Ministério da Saúde na rede pública de saúde (BRASIL, 2006). Todo esse tratamento é garantido a todos os portadores de LV ou da co-infecção LV-HIV/AIDS se enquadrando nas recomendações terapêuticas vigentes no Brasil e só deve ser administrado em hospitais de referência (BRASIL, 2004).

1.2 Co-infecção LV-HIV/Aids

A pandemia do HIV/Aids tem modificado a história natural da leishmaniose visceral no mundo. Até o momento, a maior prevalência de LV/HIV-Aids tem sido relatada no Mediterrâneo (CRUZ *et al.*, 2006). Na Etiópia, a taxa de co-infecção em pacientes é de 15 a 30% (LYONS; VEEKEN; LONG, 2003). A situação é alarmante no sudoeste da Europa, no sul da Ásia, no sudeste e no sudoeste da África e nas Américas (BRASIL, 2006).

Em 2006, o Ministério da Saúde realizou o levantamento dos casos de LV/Aids. Foram relacionados 16.210 casos de LV, relacionamento aos bancos de dados da leishmaniose e da Aids foi possível identificar 176 casos com co-infecção LV/Aids, o que representa 1,1% dos casos de LV. Apesar da não disponibilidade de um banco de dados com as informações sobre a infecção pelo HIV, esta avaliação permitiu conhecer a magnitude da LV/Aids no Brasil, apontando para a necessidade e aprimoramento da vigilância (BRASIL, 2011).

Nos indivíduos imunossuprimidos a LV é considerada uma infecção oportunista, e apresenta como fator de risco recidiva de LV com a contagem de CD4⁺ inicial <100 cél/μL (ALVAR *et al.*, 1997; HORST *et al.*, 2008). A avaliação do conjunto de manifestações clínicas da LV em pacientes portadores de HIV indica que não existe um perfil definido que possa ser indiscutivelmente associado com a co-infecção. A doença pode se apresentar com surtos irregulares de febre, perda de peso substancial, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e anemia de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2007). As drogas para o tratamento de LV nos casos de co-infecção são as mesmas utilizadas em pacientes imunocompetentes (BRASIL, 2010).

No Brasil, o número de casos de LV aumentou nitidamente e invadiu áreas urbanas, onde coexistem outras endemias inicialmente urbanas, como HIV/Aids (MAIA-ELKHOURY,

2008). Um aumento dos relatos dessa co-infecção vem ocorrendo desde a primeira descrição em 1999 (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010; BERMAN, 2006; BORGES *et al.*, 1999; CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2012; DAHER *et al.*, 2009; RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003; ORSINI *et al.*, 2002; PINTADO *et al.*, 2001). Mudanças epidemiológicas, tais como o aumento da população em zonas suburbanas, onde o vetor e o reservatório são abundantes, aumentaram esta sobreposição (CRUZ *et al.*, 2006).

No período de 2001 a 2005, 16.210 casos de LV foram identificados no Brasil, e desses, 315 (2%) apresentavam co-infecção pelo HIV. Entre os co-infectados, 78% pertenciam ao sexo masculino, com idade média de 38 anos e 56,3% da infecção pelo HIV foi atribuída a transmissão heterossexual (ALVAR *et al.*, 2008). Uma avaliação de 83 casos de pacientes com LV no Brasil, registrados em 12 estados da federação, no ano de 2004 mostrou que 37,3% apresentaram a LV/HIV. Em 18% dos pacientes o diagnóstico de leishmaniose antecedeu o de HIV, e em 41% o diagnóstico das duas infecções foi simultâneo (BRASIL, 2004).

Em relação à confirmação do diagnóstico em pacientes co-infectados brasileiros, um estudo apresenta o enfoque na avaliação das técnicas de exame direto e cultura, na identificação de um novo caso, relacionando com as principais manifestações clínicas apresentadas pelo paciente (PINTADO *et al.*, 2001). No entanto, outros dois estudos no mundo utilizando amostras de medula óssea e sangue, realizaram a PCR utilizando os *primers* RV1 e RV2 como ferramenta para detecção de casos e demonstraram que esta técnica apresentou uma maior sensibilidade em amostras de medula óssea (CAKAN *et al.*, 2010; FAUCHER; PIARROUX, 2010).

Borges *et al.*, 1999 avaliaram a concomitância de leishmanioses e infecção pelo HIV/Aids em um relato de quatro casos no Brasil, em que dois foram confirmados com LV/HIV-Aids, através da realização do exame direto. Já Pintado *et al.*, 2001 realizaram um estudo comparativo entre pacientes com e sem co-infecção, descrevendo características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, onde apresentaram resultados semelhantes para os dois grupos em relação aos sintomas clínicos e ao diagnóstico através do exame direto e cultura do aspirado da medula óssea. Em outros dois levantamentos, foi observado a ocorrência da co-infecção da LV/HIV-Aids no Brasil (DEDET; PRATLONG, 2000; RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003).

Em Brasília foi identificado uma alta frequência da co-infecção LV/HIV-Aids, em que 16% dos 163 indivíduos investigados foram confirmados, através de uma das técnicas testadas (IFI, ELISA e PCR de sangue) reforçando a importância do diagnóstico precoce da

LV neste grupo de pacientes, devido a alta letalidade encontrada (CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2009). Já em Campo Grande-Mato Grosso, foi realizado um estudo descritivo de 23 casos com LV/HIV-Aids, sendo 20 confirmados através do exame direto e 23 pela cultura NNN. Os pacientes co-infectados apresentaram um quadro clínico semelhante aqueles encontrados em outras regiões endêmicas, com uma contagem das células T-CD4⁺ baixa, além da febre e hepatoesplenomegalia (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Orsini, *et al.*, (2002), descreveram um caso de co-infecção *Leishmania*/HIV com manifestações cutâneas e visceral, que foi diagnosticada pelo encontro do parasito através de amostras de medula óssea utilizando cultura e exame direto, bem como por meio da PCR através dos *primers* 13A e 13B. Um estudo de série de casos descreveu a ocorrência da co-infecção em 15 pacientes no Brasil, realizando um levantamento dos aspectos clínicos e epidemiológicos (DAHER *et al.*, 2009). Outro estudo realizado durante 2007 e 2008 em todas as regiões do Brasil, demonstrou que de 7.556 casos de LV, 3,7% eram co-infectados com HIV. Este levantamento possuiu um enfoque epidemiológico, clínico e laboratorial descrevendo que o perfil desses pacientes não difere daqueles com LV clássica, à exceção da letalidade (BERN, 2010).

Uma série de 10 casos HIV/Aids foram examinados em Pernambuco, utilizando como ferramentas diagnósticas: o exame direto, DAT, IFI, rk39, PCR e KAtex. Cinco dos 10 casos foram diagnosticados co-infectados. Dentre esses exames, o KAtex foi positivo em todos os casos de co-infecção testados. Já o DAT foi reativo nos cinco casos de co-infecção e em quatro de HIV/AIDS (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

Apesar da LV ser conhecida há algum tempo, o arsenal terapêutico é limitado. As drogas utilizadas como primeira escolha para o tratamento da LV no Brasil são os antimoniais. Em pacientes co-infectados, a droga de escolha é a anfotericina B lipossomal. Em decorrência da toxicidade dessas drogas utilizadas, recomenda-se a avaliação eletrocardiográfica, hepática, pancreática e renal, antes de se instituir a terapêutica (BRASIL, 2011).

1.3 Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose visceral

O diagnóstico laboratorial da LV é conduzido quando existem indicativos clínicos e/ou epidemiológicos. Existem vários métodos diagnósticos para a LV, porém nenhum deles apresenta 100% de sensibilidade. O diagnóstico definitivo de rotina requer a detecção das formas amastigotas em esfregaços preparados a partir de amostras biológicas (GONTIJO;

MELO, 2004). Para o diagnóstico se disponibiliza os seguintes exames laboratoriais: sorológico, antigênico, parasitológico e molecular. Na Rede de Atenção no Brasil, o diagnóstico é baseado em exames imunológicos: Reação da Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste Imunocromatográfico Rápido (rk39-ICT) e parasitológicos (exame direto) (BRASIL, 2010).

1.3.1 Diagnóstico sorológico

Os principais exames sorológicos utilizados para a detecção de anticorpos circulantes anti-leishmania são os seguintes: ensaio imunoenzimático (ELISA), RIFI, teste de aglutinação direta (DAT) e rK39-ICT.

No diagnóstico de LV o ensaio imunoenzimático é uma técnica sensível, mas a sua especificidade depende do antígeno empregado (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Apresenta uma sensibilidade de 90% e uma especificidade bastante variada entre 71% a 90%, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos. O método é pouco preciso na detecção dos casos inaparentes e dos oligossintomáticos, como é o caso dos co-infectados (CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2009).

A RIFI, utilizada a partir da década de 1960 (DUXBURY; SADUN, 1964) é um teste indireto que detecta anticorpos circulantes. No Brasil é um dos exames utilizados para o diagnóstico pela Rede de Laboratórios do SUS (BRASIL, 2006). Este método possui limitações em termo de especificidade e reprodutibilidade, podendo apresentar diversas reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (DOURADO *et al.*, 2007) e sua sensibilidade e especificidade variam entre 82% a 95% e 78% a 92% respectivamente (ASSIS *et al.*, 2008). Porém, em pacientes co-infectados, a sensibilidade varia de 50 a 60%. (BRASIL, 2004).

O teste de aglutinação direta foi primeiramente descrito por Allain e Kagan e adaptado por El Harith *et al* na década de 1980 (ALLAIN; KAGAN,1975; HARITH *et al.*, 1986) e desde então vem mostrando-se eficaz para o diagnóstico de LV. Estudos demonstraram que o DAT apresenta em torno de 100% de sensibilidade, sendo mais específicos que a IFI e ELISA (DOURADO *et al.*, 2007). Estudos comprovam a alta sensibilidade (97,1%) conhecida e uma especificidade de 93,7% (BOELAERT *et al.*, 1999; BOELAERT *et al.*, 2004). Entretanto foram observados alguns resultados falso-negativos através do DAT, em pacientes co-infectados quando comparados ao exame direto e PCR em amostras de sangue (HAILU; BEHER, 2002; SUNDAR *et al.*, 2011).

A baixa especificidade é a desvantagem mais comum nos métodos que utilizam antígenos não purificados, causada pela reatividade cruzada e persistência de anticorpos após a cura. Para tentar minimizar esse problema, alguns antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido identificados, entre eles, a proteína recombinante K39. A presença de IgG anti-rk39 através do rk39, caracteriza um resultado positivo. Através deste método têm sido observada uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 97%, em indivíduos com LV (ASSIS *et al.*, 2008). Foi observado que o teste de rk39-ICT apresentou o mesmo resultado do exame direto em todos os casos investigados com recorrência de co-infecção em uma série de casos de Pernambuco (CAVALCANTI *et al.*, 2012). Entretanto, O rk39-ICT ainda não foi validado no contexto da co-infecção (BRASIL, 2004).

Em geral, encontram-se títulos baixos de anticorpos para *Leishmania sp.* em pacientes com co-infecção, uma vez que a infecção pelo HIV é associada com distúrbios pronunciados do sistema imune, incluindo a ativação de células B policlonais e comprometimento da apresentação de antígenos (ALVAR *et al.*, 2008; DENIAU *et al.*, 2003). Entre estes pacientes, mais de 50% não têm níveis detectáveis de anticorpos para *Leishmania sp.* (ALVAR *et al.*, 1997; MEDRANO *et al.*, 1998).

1.3.2 Diagnóstico antigênico

O exame de urina para detecção do antígeno de *Leishmania sp.*, que é denominado de teste de aglutinação do látex (KAtex), é um procedimento não invasivo, no qual a ausência de aglutinação define o resultado negativo do teste. Esta ferramenta tem sido indicada como promissora, mesmo nas difíceis condições de campo (GAVGANI; KHADEM VATAN; GHAZANCHAEI, 2008).

Foi observado em estudos com amostras de pacientes co-infectados na Espanha que o KAtex apresentou uma sensibilidade variando de 85,7% a 100%, quando a carga parasitária era alta (RIERA *et al.*, 2004; VILAPLANA *et al.*, 2004). O uso do KAtex em amostras de pacientes co-infectados LV/HIV-Aids em Pernambuco demonstrou que todos foram diagnosticados por este exame (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

1.3.3 Diagnóstico parasitológico

1.3.3.1 Exame direto

O exame microscópico direto revela a forma amastigota, normalmente encontrada dentro de células fagocíticas. O parasito caracteriza-se pela presença simultânea de núcleo redondo ou oval e cinetoplasto puntiforme ou alongado (FAUCHER; PIARROUX, 2010). A busca microscópica do parasito permanece como método de referência no diagnóstico da LV, embora necessite de procedimento invasivo, requeira laboratorista experiente, seja laborioso e não apresente sensibilidade ideal (ASSIS *et al.*, 2008). Foi observado que o exame direto, não é suficiente como única ferramenta para confirmação de LV (CAKAN *et al.*, 2010). Vários motivos são relatados para limitação de sensibilidade do exame direto, tais como: O pequeno número de células infectadas por *Leishmania* sp. como consequência da pancitopenia; amostra hemodiluída devido a coleta inadequada, ou à baixa carga parasitária quando o paciente recebe tratamento (LACHAUD *et al.*, 2009).

Para a confirmação do diagnóstico é realizado o isolamento do agente etiológico com o material de aspirado de medula óssea, sendo considerado o padrão ouro com uma especificidade de 100% e uma sensibilidade variando entre 60% a 85% (DOURADO *et al.*, 2007). A sensibilidade no grupo sem a co-infecção é maior (79,4%) que com a co-infecção (67,1%) (PINTADO *et al.*, 2001). No Brasil há relato da falha em diagnosticar a LV através do exame direto em indivíduos com LV/HIV-Aids, sendo a cultura NNN capaz de diagnosticar 100% dos casos investigados (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

1.3.3.2 Mielocultura

Essa técnica aumenta a sensibilidade para identificação da espécie no aspirado de medula óssea, utilizando a cultura Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) (DENIAU *et al.*, 2003). Ademais, possibilita um estudo detalhado das espécies de *Leishmania* sp. (em termos de identificação, epidemiologia, filogenia, suscetibilidade às drogas, biologia molecular e bioquímica) bem como permite a realização da criopreservação dos isolados para futuras comparações e experimentos (DENIAU *et al.*, 2003; SUNDAR *et al.*, 2011). Alguns autores recomendam a sua realização rotineira em aspirado de medula óssea para o diagnóstico de *Leishmania* sp. (BERENGUER *et al.*, 1989; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997). A sensibilidade demonstrada para medula óssea e aspirados de linfonodos são

estimadas em 70-80% e 60-70%, respectivamente (MAURYA *et al.*, 2010). Em pacientes co-infectados por *Leishmania*/HIV-AIDS, a cultura apresentou uma sensibilidade de 67% de acordo com López-Vélez *et al.* (1998).

Um estudo realizado em pacientes com e sem co-infecção HIV/Aids na Espanha, demonstrou que a cultura foi capaz de detectar a doença em 62,9% dos pacientes co-infectados e em 66,6% naqueles sem a co-infecção em relação ao diagnóstico através do exame direto (PINTADO *et al.*, 2001). No Brasil, um estudo realizado no Mato Grosso do Sul realizou o isolamento por meio da cultura, mas não realizou a caracterização (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, *et al.* 2010). Já em outro estudo, foi realizado o isolamento e caracterização da *L. (L.) chagasi* através das seguintes técnicas bioquímica: análise de isoenzimática, análise de restrição do DNA de cinetoplasto (kDNA) e hibridização molecular (SILVA *et al.*, 2001).

1.3.4 Diagnóstico molecular

Devido às dificuldades existentes no diagnóstico sorológico, antigênico e parasitológico de LV, nos últimos anos, têm-se buscado testes sensíveis e específicos, como aqueles baseados em métodos moleculares. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta que tem sido utilizada para a detecção do DNA da *Leishmania* sp. em uma variedade de amostras clínicas (SILVA *et al.*, 2010; OSMAN *et al.*, 1997; CAKAN *et al.*, 2010). Devido à ampla variedade de alvos e iniciadores disponíveis no diagnóstico molecular, ainda não há um procedimento padrão ouro, o que dificulta a inserção desse ensaio na rotina dos serviços de saúde (CAKAN *et al.*, 2010).

O diagnóstico molecular utilizando a PCR apresenta-se promissor para os portadores de LV, utilizando *primers* com alvos em uma diversidade de genes, por exemplo, genes de rRNA e o DNA do cinetoplasto (kDNA) (ATTAR *et al.*, 2001). Diversos estudos consideram o uso do kDNA como uma boa estratégia para o diagnóstico da LV (GOMES *et al.*, 2008; SINGH; PANDEY; SUNDAR, 2006), e este já foi testado em uma variedade de amostras biológicas tais como aspirados de medula óssea, baço e linfonodos, em sangue periférico e em urina, apresentando ótimos resultados (DOURADO *et al.*, 2007; MOADDEB; BEHZAD-BEHBAHANI, 2008). Já foram publicados diversos estudos (ANDRESEN *et al.*, 1997; ATTAR *et al.*, 2001; BARKER *et al.*, 1991; DOURADO *et al.*, 2007; FAKHAR *et al.*, 2008; FISA *et al.*, 2008; FISSORE *et al.*, 2004; KAZEMI *et al.*, 2008; KONGKAEW *et al.*, 2007; LIMA JUNIOR *et al.*, 2009; MARY *et al.*, 2004; MOADDEB; BEHZAD-BEHBAHANI,

2008; MOTAZEDIAN *et al.*, 2008; ONUMA *et al.*, 2001) utilizando iniciadores desenhados a partir do kDNA, dentre eles os iniciadores RV1 e RV2, desenhados por Ravel *et al.* (1995), e adaptados por Le Fichoux *et al.* (1999), tendo como alvo a região conservada dos minicírculos do kDNA de *L. (L.) chagasi* e que têm apresentado uma sensibilidade variando de 88% a 100%, sendo bastante utilizado para o diagnóstico da LV

A PCR de amostras sangue da Turquia, utilizando os *primers* 13A e 13B, mostrou-se melhor que a microscopia direta, cultura, e os testes sorológicos, particularmente em amostras com baixas cargas parasitárias para o diagnóstico da LV (KOLTAS *et al.*, 2009). No Brasil, esta técnica, utilizando amostras de aspirado de medula óssea vem se mostrando promissora na detecção de novos casos, particularmente em pacientes co-infectados (DAHER *et al.*, 2009). Ademais, há relato na literatura da utilização de um sistema de detecção da infecção por *L. infantum* utilizando os sistemas Linf 1A, Linf 1B e Linf 2, no qual foi observado que o desempenho do sistema Linf 1B em amostra de sangue de cães, apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 83,33% (CAVALCANTI, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é endêmica em várias localidades do país, sendo mais prevalente no Nordeste brasileiro. Para que esta doença possa ser devidamente controlada e monitorada, é essencial que se disponha de métodos diagnósticos cada vez mais acurados. Devido a elevada casuística e letalidade dessa endemia é necessário o desenvolvimento de novos testes diagnósticos, assim como o aprimoramento dos já existentes.

Os casos suspeitos de leishmaniose visceral têm como suporte diagnóstico o aspirado de medula óssea, utilizando o exame direto da *Leishmania* sp., que é o padrão ouro, mas que apresenta limitações devido as falhas na coleta, baixa carga parasitária ou uso prévio de drogas. A mielocultura é indicada como diagnóstico parasitológico de calazar. Já o uso da técnica de PCR vem se mostrando promissor para a detecção de casos de infecção e doença, entretanto, ainda não há um sistema validado para o diagnóstico dessa parasitose. Ademais, um grande obstáculo enfrentado é o diagnóstico da doença em pacientes infectados por HIV/Aids. Desta forma, não se dispõe de exame rápido, sensível e que dispense a realização do procedimento invasivo para seu diagnóstico. Diante desse cenário, defende-se aqui que o material obtido do aspirado de medula óssea deva ser utilizado num conjunto de testes como forma de aperfeiçoar o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes imunocompetentes e nos imunossuprimidos. Por isso a importância do desenvolvimento de um estudo de avaliação do desempenho entre os exames parasitológicos e molecular utilizando amostras do aspirados de medula óssea no diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes com e sem HIV/Aids.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o desempenho dos exames parasitológico e molecular utilizando amostras do aspirado de medula óssea no diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes com e sem HIV/Aids.

3.2 Específicos

- a) Identificar o perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes em estudo;
- b) Caracterizar os pacientes com e sem a infecção por HIV/Aids;
- c) Descrever o desempenho dos exames parasitológicos em amostra de aspirado de medula óssea em pacientes com e sem co-infecção leishmaniose visceral/HIV-Aids;
- d) Descrever o desempenho do exame molecular baseado em PCR em amostras de aspirados de medula ósseas em pacientes com e sem co-infecção leishmaniose visceral/HIV-Aids.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o desempenho dos exames parasitológico e molecular utilizando amostras do aspirado de medula óssea no diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes com e sem HIV/Aids?

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo

O estudo é do tipo descritivo.

5.2 Local do estudo

A procedência dos pacientes internos foi do estado de Pernambuco, tendo como hospitais de referência localizados em Recife (vide detalhe no item 5.3). Os exames foram realizados nos próprios hospitais (exame direto, vide detalhe no item 5.3.1); Laboratório de Imunoparasitologia - LIMP, Departamento de Imunologia, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –, CPqAM/FIOCRUZ-PE (mielocultura, vide detalhe no item 5.3.2); Instituto Evandro Chagas – IEC, Belém – PA (identificação do parasito, vide detalhe no item 5.3.2.1.b); Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz-RJ (caracterização do parasito, vide detalhe no item 5.3.2.1.c), e Laboratório de Doenças Transmissíveis - LDT, Departamento de Parasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/Fiocruz-PE (reação de cadeia de polimerase, vide detalhe no item 5.3.3).

5.3 População de estudo e período de referência

A população de estudo foram os pacientes com suspeita clínica e/ou epidemiológica de leishmaniose visceral internos nos hospitais localizados em Recife. A amostra de conveniência (não probabilística) foi composta pelo universo dos casos suspeitos de LV, através da demanda espontânea hospitalar no período de 2011-2012. Foram compostos dois grupos:

a) Grupo I-Pacientes HIV positivo com suspeita clínica e/ou epidemiológica para LV:

Composto por pacientes com HIV/Aids, hospitalizados, com idade igual ou superior a 18 anos, com suspeita clínica e/ou epidemiológica de LV e com indicação do médico assistente para realizar punção esternal. Estes casos foram acompanhados em cinco serviços localizados em Recife – Pernambuco: o Hospital Universitário Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), Hospital Correia Picanço que é vinculado ao

SUS (HCP/SUS-PE), o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), Hospital Geral Otávio de Freitas, vinculado ao SUS (HGOF/SUS-PE) e Hospital Barão de Lucena, vinculado ao SUS (HBL/SUS-PE).

b) Grupo II - Pacientes HIV negativo com suspeita clínica e/ou epidemiológica para LV:

Foi realizada nos pacientes com exame de HIV/Aids negativo, hospitalizados, com suspeita clínica e/ou epidemiológica de LV e com indicação do médico assistente para realizar punção esternal. Estes casos eram internos nos seguintes hospitais de referência: Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC/UPE), Hospital das Clínicas (HC/UFPE), Hospital Geral Otávio de Freitas (HGOF/SUS-PE), Hospital Agamenon Magalhães, vinculado ao SUS (HAM/SUS-PE), Hospital Barão de Lucena (HBL/SUS-PE) e Hospital Correia Picanço (HCP/SUS-PE).

5.4 Definição de caso

A identificação das formas amastigotas de *Leishmania* sp. em aspirado de medula óssea foi o exame que definiu um caso de LV. Este método, também denominado de exame direto, é o considerado referência na identificação de caso (BRASIL, 2010). Este diagnóstico foi realizado pelo médico responsável vinculado ao hospital no qual o paciente estava interno.

Para a definição de caso com HIV foi utilizado como critério a presença de dois testes de triagem reagentes ou um confirmatório para detecção de anticorpos anti-HIV (BRASIL, 2007). São considerados testes de triagem para detecção de anticorpos anti-HIV: várias gerações de ensaio por imunoblot ligado à enzima (ELISA). Os testes confirmatórios são: imunofluorescência indireta; imunoblot; Western Blot; teste de amplificação de ácidos nucleicos como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a amplificação sequencial de ácidos nucleicos-Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA (BRASIL, 2010).

5.5 Amostras Biológicas

A punção esternal para coleta do aspirado da medula óssea foi realizada nos hospitais que os pacientes estavam internos. Com o aspirado de medula óssea foi realizado o diagnóstico

parasitológico e o molecular. O diagnóstico parasitológico envolveu duas técnicas: o exame direto, buscando visualizar as formas amastigotas de *Leishmania* sp. (BRASIL, 2006) e o cultivo em meio de cultura específico NNN (BRASIL, 2006). O diagnóstico molecular foi realizado com a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* RV1 e RV2 (LE FICHOUX *et al.*, 1999; RAVEL *et al.*, 1995).

5.5.1 Exame direto

Este método diagnóstico foi o padrão ouro, servindo como referência para o estudo comparativo e para a definição de caso. Para realização do exame direto utilizou-se uma gota (50 µl) por lâmina do sangue proveniente da punção para realizar um esfregaço ou impressão sobre três lâminas de vidro, sendo então fixado com metanol, por três minutos, e corado pela solução de Giemsa ou Leishman (BRASIL, 2006). Em seguida, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico com óleo de imersão, objetiva de 100x para a visualização das formas amastigotas do parasito. Esse exame foi realizado pelo médico hematologista do hospital, sendo o resultado disponibilizado posteriormente para o nosso estudo.

5.5.2 Mielocultura

O material coletado da punção esternal foi utilizado para o exame parasitológico indireto, que consiste na inoculação em meios de cultura NNN. Formas amastigotas do parasita quando inoculadas em meios de cultura especiais, contendo agar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. Os 200µl da amostra foram inoculados no meio NNN e foi adicionado 500 µl de meio bi-fásico NNN/Schneider, com a finalidade de aumentar e acelerar a positividade da cultura. As culturas foram mantidas a temperatura entre 24-26°C em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio) e a visualização da forma promastigota foi feita através da microscopia óptica utilizando 10 µl da cultura, examinadas entre lâmina e lamínula, após cinco dias da incubação e acompanhadas por 21 dias, sendo observadas em intervalos de três a cinco dias (BRASIL, 2010). Após esse período, as culturas com resultado negativo foram desprezadas, e as positivas seguiram para identificação e caracterização do parasito. Esse exame foi realizado no Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunoparasitologia – LIMP, do CPqAM/FIOCRUZ-PE.

5.5.2.1 Identificação e caracterização do parasito

a) Obtenção de parasitos

Os promastigotas cresceram em meio Schneider's, até atingir a fase exponencial, as culturas foram examinadas em microscópio bifásico e em seguida foram transferidas duas alíquotas de 200µl da cultura para tubos estéreis, ambos foram identificados e datados. Esse procedimento foi realizado em fluxo laminar. As referidas amostras foram enviadas via sedex ao Instituto Evandro Chagas - IEC, Belém-PA para ser identificada por anticorpos monoclonais específicos e para IOC/FIOCRZ- RJ para a caracterização por eletroforese enzimática.

b) Anticorpos monoclonais

As amostras foram caracterizadas através do teste de imunofluorescência indireta com fluorocromo conjugado com avidina/biotina utilizando um painel de 23 anticorpos monoclonais específicos anti-leishmania (B2, B5, B12, B11, B13, B18, B19, CO1, CO2, CO3, D13, L1, LA2, M2, N2, N3, V1, WA2, W1, W2, WH1, WIC e T3), de acordo com Shaw *et al.* (1987).

c) Eletroforese enzimática (MLEE).

Os métodos utilizados para preparar as amostras e estudar a mobilidade eletroforética de algumas enzimas em géis de agarose, foi padronizado e descrito por Cupolillo *et al.* (1994). A identificação da variação alélica de cada cepa foi testada através de um painel de quatro enzimas: Glucose-fosfato isomerase (GPI, E.C.5.3.1.9), glucose-6-fosfato dehidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), isocitrato dehidrogenase com NAD e NADP (IDHNAD & IDHNADP, E.C.1.1.1.42) e (6PGDH, E.C.1.1.1.43). Cada isolado foi testado e comparado com as cepa de referência de diferentes espécies do Instituto Oswaldo Cruz, *Leishmania donovani* (MHOM/ET/1967/HU3) e *Leishmania infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1).

5.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

5.5.3.1 Extração e purificação de DNA

Para a realização da PCR foi utilizado como material biológico, 200 µl do aspirado da medula óssea. A extração e purificação do DNA dos organismos foram realizadas com o kit comercial de extração “illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as recomendações do fabricante. Em um microtubo contendo a amostra, foram adicionados 100µl da solução de lise tipo 1 e 10µl de proteinase K. Em seguida esse conteúdo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria à 60°C, por 1h. Após esse período, o material foi submetido a uma centrifugação rápida (spin). Foram adicionados 5µl de RNase A, incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 500µl de solução de lise tipo 2, e esperou mais 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se o material por 10 segundos a 11.000 rpm. Após esta etapa, o conteúdo do microtubo foi transferido para a coluna do kit, montada juntamente com o tubo coletor. Submeteu-se a uma centrifugação por um minuto a 11.000 rpm, sendo o líquido desprezado. Adicionaram-se 500µl de solução de lise tipo 2, e novamente este foi submetido à centrifugação nas mesmas condições, sendo o sobrenadante novamente descartado. Após isso, foram adicionados 500µl de solução de lavagem, centrifugando por três minutos a 11.000 rpm. O tubo coletor foi descartado, e a coluna foi transferida para um microtubo. Adicionou-se na coluna 200µl de solução de eluição pré-aquecido à 70°C, e incubou-se por um minuto em temperatura ambiente, e submeteu-se à centrifugação por um minuto a 11.000 rpm, e a coluna foi descartada, ficando com o microtubo contendo o DNA. Este tubo foi armazenado à -20°C. Esse protocolo foi baseado em RAVEL *et al.*, 1995 e LE FICHOUX *et al.*, 1999. A reação de cadeia da polimerase foi realizada nas dependências no Laboratório de Doenças Transmissíveis - LDT, Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ-PE.

5.5.3.2 Amplificação do kDNA da *Leishmania* sp.

A amostra de DNA extraído foi amplificado para *Leishmania* sp. Foram utilizados 1,5 mM de MgCl₂, KCl 50mM, Tris – HCl 10 mM, pH 8,3, 2mM de dNTPs, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase e 25 pmols de cada *primer*, em um volume final de 25µl. Como controle negativo, em todas as reações foram utilizados os reagentes sem adição de amostra de DNA.

A PCR foi realizada de acordo com as condições descritas por Le Fichoux et al. 1999, com desnaturação inicial 94° C por cinco minutos e 35 ciclos: 94° C por 30s; 67° C por um minuto; 72° C 30s e uma extensão final a 72° C por cinco minutos. Utilizou os *primers* RV1 (senso; 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (anti-senso; 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'), cujo alvo é uma região conservada do kDNA de *L. chagasi*. Esses oligonucleotídeos iniciadores produzem um fragmento de aproximadamente 145 pares de base (pb) (LACHAUD *et al.*, 2002; LE FICHOUX *et al.*, 1999; RAVEL *et al.*, 1995).

5.5.3.3 Análise dos produtos da PCR

Dez microlitros do produto amplificado foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 2mM), e corados com blue Green. Esses produtos amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Polaroid MP4+ SystemTM (Sigma St. Louis, MA, USA).

5.6 Considerações éticas

O estudo foi realizado dentro dos padrões de ética em seres humanos, sendo a coleta do material biológico realizada após a concordância verbal e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do sujeito da pesquisa (Anexo A). Cada indivíduo recebeu os resultados dos exames em formulário próprio, sendo outra cópia anexada ao prontuário do mesmo no Serviço de Saúde, como informação aos médicos assistentes.

Com a identificação de novos casos de LV ou LV/Aids, todo o tratamento e assistência foram prestados no Serviço de Saúde a que o paciente estava vinculado, sendo fomentado pela rede do SUS-PE. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa (CEP). – CAEE 0091.0.095.000-10 (Apêndice A).

5.7 Processamento e análise dos dados

Foi utilizado o Microsoft Excel 2003 produzido pela Microsoft Corporation para tabulação dos dados. Com o objetivo de verificar se havia diferença entre as idades dos grupos HIV positivo e HIV negativo, realizamos o teste estatístico de Wilcoxon, onde

testamos a Hipótese nula (H_0) = A média de idade dos grupos HIV positivo e HIV negativo é a mesma contra a Hipótese alternativa (H_1) = Há diferença na média de idade entre os grupos. Para analisar a comparação do desempenho da PCR em relação ao exame direto e a mielocultura nos grupos investigados calculamos o indicador de kappa (k), considerando a PCR como o teste de referência para o diagnóstico de LV. Adicionalmente, foi testada a significância de cada coeficiente k . Para tanto foi utilizado o programa SPSS versão 11.5. Em que temos como H_0 ($k=0$) = Não há concordância nenhuma entre os exames; e a H_1 ($k>0$) = Existe a concordância entre os exames. Foi adotado como nível de significância estatística o valor convencional de 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes com suspeita de leishmaniose visceral

Foram investigados 22 pacientes com suspeita clínica de LV, oriundos dos seguintes hospitais: Hospital das Clínicas (HC/UFPE), Hospital Agamenon Magalhães (HAM/SUS-PE), Hospital Barão de Lucena (HBL/SUS-PE), Hospital Geral Otávio de Freitas (HGOF/SUS-PE) e Hospital Correia Picanço (HCP/SUS-PE) e Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC/SUS-PE). Os casos foram procedentes dos municípios de Bom Conselho, Buenos Aires, Canhotinho, Feira Nova, Garanhuns, Glória do Goitá, Igarassu, Jaboatão dos Guararapes, Recife, Santa Cruz do Capibaribe, Serra Talhada, Surubim, Ouricuri, Timbaúba, Vicência e Vitória de Santo Antão (Quadro 1).

Quanto as mesorregiões, os casos suspeitos distribuíram-se da seguinte forma: Região metropolitana do Recife, Sertão, Agreste e Zona da Mata. A faixa etária foi compreendida entre 8 meses a 63 anos. ($X = 37,4$; $DP \pm 17,3$ e mediana de 22,3 anos). Treze casos (59%) foram do sexo masculino e nove (41%) feminino (Quadro 1).

Quadro 1: Perfil epidemiológico dos pacientes com suspeita de leishmaniose visceral atendidos nos hospitais do Recife, PE, em 2011.

Paciente	Procedência	Idade	Sexo	Hospital	Setor
1	Recife	52	F	HC	Clínica médica
2	Serra Talhada	30	F	HC	Clínica médica
3	Surubim	27	M	HGOF	Infecto-parasitária
4	Vicência	8 meses	F	HAM	Pediatria
5	Buenos Aires	51	M	HBL	Clínica médica
6	Garanhuns	61	F	HUOC	Infecto-parasitária
7	Santa Cruz do Capibaribe	21	F	HBL	Infecto-parasitária
8	Recife	36	M	HC	Infecto-parasitária
9	Recife	31	M	HC	Clínica médica
10	Bom Conselho	35	M	HUOC	Infecto-parasitária
11	Serra Talhada	63	M	HCP	Infecto-parasitária
12	Ouricuri	24	F	HC	Infecto-parasitária
13	Jaboatão dos Guararapes	58	M	HC	Infecto-parasitária
14	Jaboatão dos Guararapes	39	F	HC	Clínica médica
15	Feira Nova	18	M	HUOC	Infecto-parasitária
16	Recife	34	F	HCP	Infecto-parasitária
17	Recife	04	F	HBL	Pediatria
18	Vitória de Santo Antão	58	M	HC	Clínica médica
19	Canhotinho	63	M	HC	Infecto-parasitária
20	Timbaúba	24	M	HC	Infecto-parasitária
21	Glória do Goitá	43	M	HGOF	Infecto-parasitária
22	Igarassu	44	M	HGOF	Infecto-parasitária

Fonte: Elaborado pela autora

Notas: HAM – Hospital Agamenon Magalhães; HC – Hospital das Clínicas; HGOF – Hospital Geral Otávio de Freitas; HUOC – Hospital Universitário Oswaldo Cruz; HCP – Hospital Correia Picanço; HBL – Hospital Barão de Lucena

Em relação às manifestações clínicas foi observado a presença de pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas: febre, hepatomegalia, esplenomegalia, palidez cutânea, astenia e pancitopenia. Do grupo total investigado, obtivemos as seguintes proporções para cada apresentação clínica a seguir: febre (90,9%), esplenomegalia (81,8%), astenia (63,6%), hepatomegalia (59%) e palidez cutânea (50%). Em relação as alterações hematológicas

obtivemos os seguintes valores: eritropenia (81,8%), leucopenia (59%) e trombocitopenia (22,7%).

6.2 Caracterização dos pacientes com e sem HIV/Aids

Dos 22 casos avaliados, nove foram confirmados HIV/Aids (Quadro 3).

Quadro 2: Procedência e resultado da presença de HIV/Aids nos pacientes investigados nos hospitais do Recife, PE, em 2011.

Paciente	HIV/Aids	Procedência	Mesorregião
1	+	Recife	RMR
2	-	Serra Talhada	Sertão
3	-	Surubim	Agreste
4	-	Vicência	Mata
5	-	Buenos Aires	Mata
6	-	Garanhuns	Agreste
7	+	Santa Cruz do Capibaribe	Agreste
8	+	Recife	RMR
9	+	Recife	RMR
10	-	Bom Conselho	Agreste
11	-	Serra Talhada	Sertão
12	-	Ouricuri	Sertão
13	+	Jaboatão dos Guararapes	RMR
14	+	Jaboatão dos Guararapes	RMR
15	-	Feira Nova	Agreste
16	+	Recife	RMR
17	-	Recife	RMR
18	-	Vitória de Santo Antão	Mata
19	-	Canhotinho	Agreste
20	-	Timbaúba	Mata
21	+	Glória do Goitá	Mata
22	+	Igarassu	RMR

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: RMR = Região Metropolitana de Recife

Para melhor caracterização, a partir desse ponto serão abordados os dois grupos de estudo (Tabela 1): O Grupo I (HIV/Aids positivo) que apresentou média de idade de 39,8 anos (DP±10,5) e o Grupo II (HIV/Aids negativo) com média de 35,8 anos (DP±14,5). A análise das médias das idades dos indivíduos para os dois grupos mantiveram-se muito semelhantes entre si, não havendo significância estatística entre os grupos ($p > 0,01$).

Tabela 1: Variáveis relacionadas ao sexo, faixa etária, mesorregiões de Pernambuco, clínica e aspectos hematológicos dos pacientes com e sem HIV/Aids, durante o período de 2011-2012 em Pernambuco.

Variáveis	HIV/Aids				Total	
	Grupo I (positivo)		Grupo II (negativo)		N	%
	N	%	N	%		
<i>Sexo</i>						
Masculino	5	55,5	8	61,5	13	59
Feminino	4	44,5	5	38,5	9	41
Total	9	100	13	100	22	100
<i>Faixa etária (anos)</i>						
0-10	0	0	2	15,5	2	9
11-20	0	0	1	7,7	1	4,5
21-30	1	11,1	4	30,7	5	22,7
31-40	4	44,5	1	7,7	5	22,7
41-50	2	22,2	0	0	2	9
51-60	2	11,1	2	15,5	4	18,1
61-70	0	0	3	22,9	3	14
Total	9	100	13	100	22	100
<i>Mesorregiões de Pernambuco</i>						
Agreste	1	11,1	5	38,5	6	27,2
Mata	1	11,1	4	30,8	5	22,8
RMR	7	77,8	1	7,7	8	36,4
Sertão	0	0	3	23	3	13,6
Total	9	100	13	100	22	100
<i>Clínica</i>						
Pacientes investigados	9	100	13	100	22	100
Febre	8	88,8	12	92	20	90,9
Hepatomegalia	4	44,4	9	69,2	13	59
Esplenomegalia	7	77,7	10	76,9	17	77,2
Palidez cutânea	3	33,3	8	61,5	11	50
Astenia	7	77,7	7	53,8	14	63,6
<i>Aspectos hematológicos</i>						
Pacientes investigados	9	100	13	100	22	100
Leucopenia	3	33,3	10	76,9	13	59
Eritropenia	6	66,6	12	92,3	18	81,8
Trombocitopenia	1	11,1	4	30,7	5	22,7

Fonte: Elaborado pela autora

Foi observada a predominância do sexo masculino em ambos os grupos (Tabela 1). Obteve-se no Grupo I um maior número de pacientes com a faixa etária maior que 30 anos. Já no Grupo II a maior frequência foi até 30 anos.

Em relação as mesorregiões de origem dos investigados, a maioria dos casos suspeitos foi da RMR com 36,4%. Em relação a cada grupo investigado, no Grupo I o maior número de casos suspeitos foi da RMR e no Grupo II do Agreste (Tabela 1).

Do total de pacientes investigados, o percentual de indivíduos com suspeita clínica de LV sem HIV-Aids foi maior. Em relação aos aspectos clínicos, no Grupo I os pacientes apresentaram: 8 (88,8%) febre, 7 (77,7%) astenia e esplenomegalia, 4 (44,4%) hepatomegalia e 3 (33,3) palidez cutânea. Já no Grupo II os pacientes apresentaram: 12 (92%) febre, 9 (69,2%) hepatomegalia, 10 (76,9%) esplenomegalia, 8 (61,5%) palidez cutânea e 7 (53,8%) astenia (Tabela 1). A análise dos aspectos hematológicos demonstrou que a eritropenia foi a característica mais encontrada em ambos os grupos, sendo maior para o Grupo II (92,3%).

6.3 Descrição do desempenho dos exames parasitológico e molecular entre os grupos estudados

O exame direto foi realizado nos 22 pacientes que foram investigados com suspeita clínica de LV. A PCR foi positiva em dois pacientes com HIV/Aids e em quatro sem HIV-Aids (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência absoluta e relativa dos exames parasitológico e molecular entre os grupos com e sem HIV/Aids, no período de 2011-2012, em Pernambuco.

Variáveis	HIV/Aids				Total
	Grupo I (positivo)		Grupo II (negativo)		
	N	%	N	%	
Exame direto					
<i>Leishmania sp.</i>					
Positivo	2	22,2	4	30,7	6
Negativo	7	77,8	9	69,3	16
Total	9	100	13	100	22
Mielocultura					
<i>Leishmania sp.</i>					
Positivo	1	25	0	0	1
Negativo	3	75	5	100	8
Total	4	100	5	100	9
PCR					
<i>Leishmania sp.</i>					
Positivo	2	50	4	57,2	6
Negativo	2	50	3	42,8	5
Total	4	100	7	100	11

Fonte: Elaborado pela autora

6.3.1 Descrição dos resultados do exame direto

Do total de 22 casos suspeitos, seis (27,2%) foram confirmados com LV através do exame direto. Em relação a cada grupo analisado isoladamente, no Grupo I foram 2 (22,2%) casos positivos e no Grupo II 4 (30,8%) casos. A visualização da forma amastigota do parasita na medula óssea em objetiva com aumento de 1000x.

6.3.2 Descrição dos resultados da cultura

A técnica da mielocultura foi realizada em 11 dos 22 pacientes estudados. Entretanto, em dois desses 11 exames ocorreu contaminação do material durante o período de incubação. Foram realizados nove exames, sendo 1 (9%) positivo para LV através desta técnica. A figura 5 mostra a forma promastigota da *Leishmania* do paciente que apresentava a co-infecção LV/HIV. A mesma foi caracterizada como *L. infantum* – sin. *L. chagasi* através de isoenzimas e confirmada através de anticorpos monoclonais específicos.

Figura 4 : Forma promastigota de *Leishmania* em meio de cultura de paciente com co-infecção LV/HIV-Aids, no período de 2011-2012, em Pernambuco.

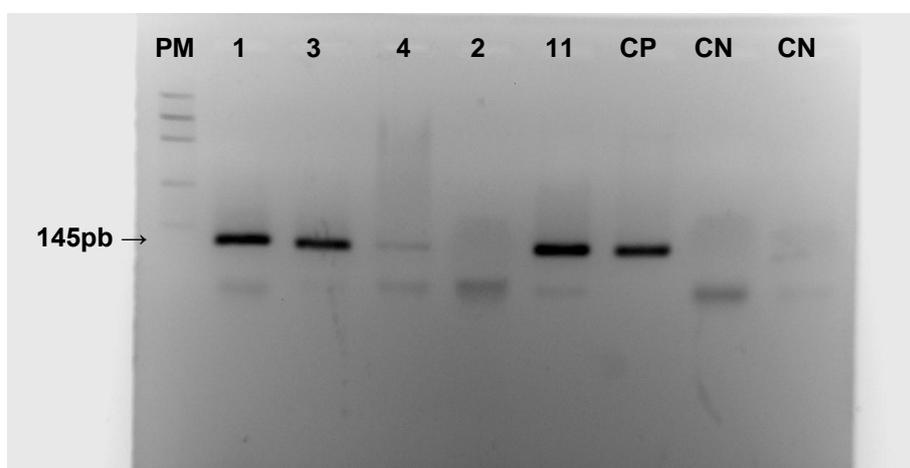


Fonte: Elaborado pela autora

6.4 Descrição do desempenho do exame molecular baseado na PCR entre os grupos estudados

A técnica da PCR foi realizada em 11 dos 22 pacientes investigados, possibilitando o diagnóstico de seis casos. A figura 6 ilustra a eletroforese em gel de algumas das amostras investigadas, demonstrando em 1, 3, 4 e 11 os pacientes que foram positivos e em 2 o resultado negativo. O tamanho do fragmento amplificado foi de 145pb.

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) utilizando algumas amostras de medula óssea através da PCR com os *primers* RV1 e RV2, no período de 2011-2012, em Pernambuco.



Fonte: Elaborado pela autora

Notas: Faixas de 1 a 11 demonstram os pacientes investigados. CP corresponde ao controle positivo e CN o controle negativo da reação. PM - Peso Molecular.

6.5 Avaliação do desempenho da PCR em relação ao exame direto e a mielocultura nos grupos estudados

Comparando o exame direto com as demais técnicas testadas foi observado que houve discordância com o resultado da PCR em três (33,3%) pacientes. E em um caso houve a concordância de resultado positivo e quatro com resultado negativo nas três técnicas testadas (Tabela 3).

Em relação a mielocultura houve a discordância de resultado com a PCR em quatro casos, sendo um no Grupo I e três no Grupo II. Desta forma, a PCR detectou três casos, que foram negativos para o exame direto e quatro para a mielocultura. No diagnóstico de LV nos indivíduos com e sem HIV-Aids foi vista a importância do uso das três técnicas (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação dos resultados das técnicas diagnósticas entre os indivíduos pesquisados no período de 2011-2012 em Pernambuco.

	Paciente	Procedência	Sexo	Idade	Exame direto	PCR	Mielocultura
<i>Grupo I</i>	1	Recife	F	52	-	+	-
	7	Santa Cruz do Capibaribe	F	21	+	+	+
	8	Recife	M	36	-	-	-
	9	Recife	M	31	-	-	-
<i>Grupo II</i>	3	Surubim	M	27	-	+	-
	4	Vicência	F	8 meses	+	+	-
	6	Garanhuns	F	61	-	-	-
	10	Bom Conselho	M	35	-	-	-
	11	Serra Talhada	M	63	-	+	-

Fonte: Elaborado pela autora

Notas: PCR = Reação em cadeia da Polimerase

Para o Grupo I, ao nível de 5%, aceitamos a hipótese de não haver concordância ($k=0$) entre os testes PCR e exame direto/ PCR e mielocultura (p valor = 0,0091). Da mesma forma, para o Grupo II, ao nível de 5%, aceitamos a hipótese de não haver concordância ($k=0$) entre os testes PCR e exame direto (p valor = 0,148) (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação do desempenho da PCR em relação ao exame direto e mielocultura no Grupo I e II no período de 2011-2012, em Pernambuco.

			PCR		Kappa*	
			N (-)	N (+)	k	p
<i>Grupo I</i>	Exame direto	(-)	1	1	0,5	0,0091
		(+)	0	2		
	Mielocultura	(-)	1	1	0,5	0,0091
		(+)	0	2		
<i>Grupo II</i>	Exame direto	(-)	1	2	0,29	0,148
		(+)	0	2		
	Mielocultura	(-)	0	3	NR	NR
		(+)	0	2		

Fonte: Elaborado pela autora

Notas: N= Quantidade de pacientes, (-) = Resultados do teste negativo, (+) = Resultado do teste positivo, PCR = Reação em cadeia da polimerase, k = coeficiente kappa, p = Valor da probabilidade (Programa SPSS 11.5), * Correlação do kappa e a probabilidade de significância.

7 DISCUSSÃO

As leishmanioses compreendem uma das dez endemias mundiais prioritárias para a Organização Mundial de Saúde sendo considerada uma doença negligenciada. No Brasil o programa de controle da leishmaniose visceral tem vários desafios, como por exemplo, dispor de um diagnóstico rápido, específico e sensível que possibilite o tratamento seguro dos casos (BRASIL, 2006; 2010).

O paciente interno na rede pública com suspeita clínica de calazar tem como suporte diagnóstico o exame parasitológico (exame direto) e os sorológicos, IFI e rk39-ICT (ASSIS *et al.*, 2008; BRASIL, 2004; 2006). O exame direto, que é o mais utilizado na rotina diagnóstica, não é suficiente como única ferramenta para confirmação de leishmaniose visceral (ANTINORI *et al.*, 2008). Sua sensibilidade varia de 60 a 85% (DOURADO *et al.*, 2007), sendo motivada principalmente pelo pequeno número de células infectadas por *Leishmania* sp., como consequência da pancitopenia; amostras hemodiluídas devido a coleta inadequada, ou pela baixa carga parasitária quando o paciente recebe tratamento (LACHAUD *et al.*, 2009; SUNDAR *et al.*, 2011).

Análises comparativas entre métodos diagnósticos utilizando o aspirado de medula óssea ainda são escassos (PIARROUX *et al.*, 1994). Os dados dessa pesquisa demonstraram que o exame direto conseguiu diagnosticar dois casos, desses apenas um foi positivo na cultura. Deniau *et al.* (2003), relatam que a mielocultura aumenta a sensibilidade na identificação da *Leishmania* sp. em aspirado de medula óssea.

Um estudo comparando os resultados da cultura e do exame direto em paciente imunocompetente demonstrou uma sensibilidade de 66,6% e 79,4%, respectivamente (PINTADO *et al.*, 2001). No nosso estudo o exame direto diagnosticou um caso, mas que foi negativo na mielocultura. Romero e Boelaert (2010), realizaram uma revisão sistemática de leishmaniose visceral e identificaram que sete de oito relatos da literatura da América tinham o exame parasitológico com definidor do diagnóstico humano.

Na Espanha um estudo em pacientes LV/HIV-Aids comparando cultura e exame direto mostrou uma sensibilidade de 62,9% e 67,1%, respectivamente (PINTADO *et al.*, 2001). No Brasil, dois grupos utilizaram o exame direto e/ou a cultura para definir caso de co-infecção (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010; CARRANZO-TAMAYO *et al.*, 2009), já outros utilizaram exclusivamente o exame direto como método diagnóstico (BORGES *et al.*, 1999; CAVALCANTI *et al.*, 2012; DAHER *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2011). O caso de co-infecção do presente estudo teve resultado positivo nas duas técnicas

parasitológicas. Uma revisão sistemática relata a ausência de consenso na literatura dos critérios parasitológicos, exame direto ou mielocultura, na definição de caso de co-infecção, também refere à utilização da PCR em sangue periférico e em aspirado de medula óssea como diagnóstico de calazar em pacientes infectados com HIV (COTA, SOUSA, RABELLO, 2011).

O presente estudo mostra que a PCR utilizando o aspirado de medula óssea identificou cinco casos, ou seja, três que não foram diagnosticados pelo exame parasitológico. Esses três casos são dois de LV e um de co-infecção. Uma explicação para esses casos diagnosticados seria a constatação de Reithinger e Dujardim (2007), que relatam que a PCR vem consistentemente se mostrando melhor do que a microscopia e cultura, particularmente em amostras com baixas cargas parasitárias.

A sensibilidade da PCR foi reportada de 82%-100%, quando comparada ao exame direto (PAL *et al.*, 2004; PIARROUX *et al.*, 1994), quando se compara o exame direto e a PCR em sangue, mostra-se a precisão do método molecular no diagnóstico de pacientes com leishmaniose visceral (OSMAN *et al.*, 1997).

Antinori *et al.* (2008) em estudos verificaram que o diagnóstico da leishmaniose visceral pela PCR utilizando sangue parece ser pelo menos equivalente ao aspirado de medula óssea, em amostras de pacientes imunocomprometidos e nos imunocompetentes.

Sugere-se que os casos suspeitos de LV com indicação de punção externa deverão utilizar a PCR associada aos métodos de rotina para o diagnóstico e o acompanhamento da doença. Ademais, a detecção mais fácil e rápida dos casos por PCR pode conduzir a investigações sobre o papel da *Leishmania* sp. em pacientes infectados com HIV que vivem em áreas onde o calazar é endêmico, como o Nordeste do Brasil, e assim facilitar o atendimento ao paciente.

Em relação a avaliação do desempenho dos exames parasitológico e molecular o presente estudo demonstrou que para os grupos investigados, a PCR foi a técnica com a melhor capacidade de diagnosticar um caso ($k=0,29$ e $k=0,5$ e $p<0,001$). Cakan *et al.*, (2010), compararam a PCR com o exame direto e a cultura, confirmando que a técnica molecular apresenta o melhor desempenho.

O Nordeste brasileiro ainda concentra o maior número de casos de leishmaniose visceral no Brasil (ALVARENGA *et al.*, 2010; BRASIL, 2010). No presente estudo os 22 casos com suspeita de leishmaniose visceral foram procedentes de quatro mesorregiões de Pernambuco. As procedências desses corroboram a descrição de casos de leishmaniose visceral no estado (DANTAS-TORRES, 2006). Entre os casos confirmados pelo exame direto

temos um caso de co-infecção LV/HIV-Aids de Santa Cruz do Capibaribe e outro de calazar de Vicência, municípios já reconhecidos como área endêmica no estado (DANTAS-TORRES, 2006).

Entretanto, observando os casos diagnosticados exclusivamente pelo PCR temos como procedência os municípios de Recife, Surubim e Serra Talhada. Dantas-Torres (2006), descrevendo a leishmaniose visceral em Pernambuco, já relatavam casos na Região Metropolitana do Recife, demonstrando que os indivíduos doentes migram para a capital em busca de tratamento especializado. O caso de co-infecção LV/HIV-Aids reside em Recife vem ratificar os achados de Cavalcanti *et al.* (2012), que identificaram dois entre cinco casos residentes na capital pernambucana. Esse achado vem a suscitar os relatos de Dantas-Torres (2006) e de Cesse *et al.* (2001) sobre a expansão da leishmaniose visceral no espaço urbano do estado, trazendo um novo cenário a eco-epidemiologia da co-infecção LV/HIV-Aids em Pernambuco.

Os fatores que influenciam a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral, não estão inteiramente elucidados, mas provavelmente as variações genéticas de ambos, hospedeiro e parasito são importantes neste contexto. Estudos sobre o polimorfismo genético conduz para uma melhor compreensão da estrutura populacional do parasita (GUPTA *et al.*, 1997).

Como o parasito é estruturalmente similar tanto nas formas amastigotas quanto promastigotas, sendo impossível a identificação da espécie por técnicas microscópicas, desta forma, no passado foram utilizados caracteres extrínsecos para nominar espécie ou para a classificação das mesmas dentro do gênero. Somente a partir de 1980 com a utilização de isoenzimas e depois com as técnicas moleculares foi possível usar caracteres intrínsecos na identificação do parasito (MORENO *et al.*, 2002).

A partir das isoenzimas foi possível organizar a classificação para o gênero (THOMAZ-SOCCOL, 1993), permitindo identificar as espécies do parasito. Essa técnica é considerada padrão ouro para a identificação das espécies segundo a Organização Mundial de Saúde (2009). Com base no perfil isoenzimático de cepas do parasito isoladas no Novo e Velho Mundo, demonstrou-se que o parasito é semelhante à *L. infantum* (MORENO *et al.* 2002). Assim, Rioux *et al.* (1990), propuseram uma nova classificação para o gênero e sugerem que *L. chagasi* passe a ser sinonímia de *L. infantum* por respeito às regras de nomenclatura. Thomaz-Soccol *et al.* (1993) em sua classificação geral para leishmanioses do Novo Mundo propuseram a manutenção de sinonímia.

Estudos mais recentes recomendam a revisão da taxonomia de *L. chagasi*. Vários autores propõem que *L. chagasi* seja vista como sinônimo de *L. infantum* (MAURICIO *et al.*,

2000; DANTAS-TORRES, 2006), ou que *L. chagasi* seja considerada como subespécie de *L. infantum* (SHAW, 2006). De acordo com essas propostas adotamos no presente estudo a classificação das espécies como sinônimas, desta forma, o parasito isolado de um caso de co-infecção procedente de Santa Cruz do Capibaribe, Agreste pernambucano, o área endêmica para leishmaniose visceral foi caracterizado como *L. infantum* (sin. *L. chagasi*).

De fato, é imprescindível que mais estudos sejam realizados para padronizar e validar as novas ferramentas moleculares no diagnóstico da leishmaniose, tanto em pacientes imunocompetentes como nos imunodeprimidos. Parece claro que a incorporação da cultura do aspirado de medula óssea aperfeiçoa o diagnóstico dessa parasitose, possibilitando o conhecimento da variabilidade genética interespecífica baseada em análises isoenzimáticas ou com anticorpos monoclonais. Esses fatos não descartam a necessidade de uma investigação mais ampla, envolvendo um número maior de amostras para melhor caracterização das cepas parasitárias circulantes nas Américas e em particular no Brasil.

8 CONCLUSÕES

a) Demonstrou-se a importância da realização de mais de um exame diagnóstico, utilizando o material do aspirado de medula óssea, para a confirmação da doença.

b) A cepa circulante num caso de co-infecção LV/HIV-Aids em Pernambuco foi de *L. chagasi* (sin. *L. infantum*).

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, P. *et al.* HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, p.692-697, 2010.
- ALLAIN, D. S.; KAGAN, I. G. A direct agglutination test for leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.24, p.232-236, 1975.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection: the first 10 years. **Clinical Microbiol Reviews**, Madrid, v.10, p. 298-319, 1997.
- ALVAR, J. *et al.* The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.21, p.334-359, 2008.
- ALVARENGA, D. G. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.43, p.194-197, 2010.
- ANDRESEN, K. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, London, v.2, p.440-444, 1997.
- ANTINORI, S. *et al.* Leishmaniasis among organ transplant recipients. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v.8. p.191-199, 2008.
- ASSIS, T. *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Belo Horizonte, v.17, p.107-116, jun. 2008.
- ATTAR, Z. J. *et al.* Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v.78. p.11-16, 2001.
- BARKER, D., *et al.* Diagnosis of leishmaniasis using PCR on parasite DNA extracted from human biopsy samples, aspirates, sandflies and culture. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, p.73-74, 1991.
- BERENGUER, J. *et al.* Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). **Annals of Internal Medicine**, New Orleans, v.111, p.129-132, 1989.
- BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian Journal Medical Reseach**, New Delhi, v.123, p.289-294, 2006.
- BERN, C. Clinical manifestations and diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious diseases**, Oxford, v.50, p. 16-20, 2010.

- BOELAERT, M. *et al.* Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.60, p.129–134, 1999.
- BOELAERT, M. *et al.* A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, p. 72–77, 2004.
- BORA, D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Índia. **The National Medical Journal of Índia**, New Delhi, v.12, p.62-68, 1999.
- BORGES, A. S. *et al.* Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.32, p.713-719, dez.1999.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Dst e AIDS. **Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV**, Brasília, DF, 2004.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Dst e AIDS. **Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV 2007/2008**, Brasília, DF, 2007.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e parasitárias**. 8.ed. Brasília, DF, 2010.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a co-infecção Leishmania-HIV**. Brasília, DF, 2011
- CAKAN, H. *et al.* Patients with suspected visceral leishmaniasis in Istanbul. **African Journal of Microbiology Research**, Istanbul, v.4, p.103-109, Jan. 2010.
- CARRANZA-TAMAYO, C.O. *et al.* Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasília, Federal District, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.103, p. 743-748, 2009.
- CAVALCANTI, M.P. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães**. 2008. Tese (doutorado). Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.
- CAVALCANTI, A. T.A. *et al.* Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case study in Pernambuco, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.54, p.43-47, 2012.

CESSE, E.A.P., *et al.* Organização do espaço urbano e expansão do calazar. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Rio Grande do Sul, v.1, p.167-176, 2001.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, London, v.5, p. 7-16, Nov. 2007.

COSTA, C.H.N. *et al.* Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, São Paulo, v.182:, p.997-1000, 2000.

COTA, G.F; SOUSA, M.R.; RABELLO, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. **Neglectec Tropical Disease**, New York, v.5, p.1149-1153, 2011.

CRUZ, I. *et al.* Leishmania/HIV co-infections in the second decade. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.123, p.357-388, 2006.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 50, p. 296-311, 1994.

DAHER, E. F. *et al.* Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in fifteen patients from Brazil. **International Journal of Parasitology**, New York, v.95, p. 652–655, jun. 2009.

DANTAS-TORRES, F.; ALMEIDA, F.S.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Phlebotomine sandflies of na urban focus of visceral leishmaniosis, Pernambuco state. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.34, p.157-160, 2005.

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

DEDET, J.P.; PRATLONG, F. *Leishmania*, *Trypanosoma* and Monoxenous Trypanosomatids as Emerging Opportunistic Agents. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v.47, p.37–39, 2000.

DENIAU, M. *et al.* The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v.97, p. 15-33, 2003.

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

DOURADO, Z. F. *et al.* Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.36, p.205-214, set/dez 2007.

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

FAKHAR, M. *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.102, p.1–7, 2008.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. **La Revue de médecine interne**, Paris, v. 12, p.1-8, 2010.

FISA, R. *et al.* *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 78, p. 741-744, 2008.

FISSORE, C. *et al.* Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42. p. 5332-5333, 2004.

GAVGANI A. M.; KHADEM VATAN S.; GHAZANCHAEI A. KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral leishmaniasis cases. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, p.852-859, 2008.

GOMES, Y.M. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, New York, v.175, p.45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil, quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, p.338-349, 2004.

GUPTA, S.; FERGUSON, N.M.; ANDERSON, R.M. Vaccination and the population structure of antigenically diverse pathogens that exchange genetic material. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 264, p.435-1443, 1997.

HAILU, A; BERHE, N. The performance of direct agglutination tests (DAT) in the diagnosis of visceral leishmaniasis among Ethiopian patients with HIV coinfection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.96, p.25–30, 2002.

HARITH, E. L. *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p.583–587, 1986.

HORST, R. T. *et al.* Concordant HIV Infection and Visceral Leishmaniasis in Ethiopia: The Influence of Antiretroviral Treatment and Other Factors on Outcome. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v.46, p.1702-1709, 2008.

KAZEMI, B. *et al.* The ability of T2/B4 primers to detect *Leishmania infantum* among peripheral blood of visceral leishmaniasis patients in Iran. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, p. 860-864, 2008.

KOLTAS, S.I. Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. **Parasitol Reseache**, Berlin, v.106, p.197-200, 2009.

KONGKAEW, W. *et al.* Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 38, p.8-12, 2007.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 210-215, 2002.

LACHAUD, L. *et al.* Parasite Susceptibility to Amphotericin B in Failures of Treatment for Visceral Leishmaniasis in Patients Coinfected with HIV Type 1 and *Leishmania infantum*. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v.48, p.16–22, 2009.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 811-827, 2005.

LE FICHOUX, Y. *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, p.1953–1957, 1999.

LIMA JUNIOR, M. S. C. *et al.* Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.42, p. 303-308, 2009.

LÓPEZ-VÉLEZ, R. *et al.* Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v.58, p.436-443, 1998.

LUKES, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 9735-9380, 2007.

LYONS, S.; VEEKEN H.; LONG, LONG J. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. **Tropical Medicine & International Health**, New York, v.8, p.733-739, 2003.

MAIA-ELKHOURY A. N. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, p.2941-2947, 2008.

MARY, C. *et al.* Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 5249–5255, 2004.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 188-189, 2000.

MAURYA, R. *et al.* Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing *Leishmania* parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.48, p.1932-1934, 2010.

MEDRANO F. J. *et al.* The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v.59, p.155-162, 1998.

MICHALICK, M. S.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral. In: NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**, 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 67-83.

MOADDEB, A.; BEHZAD-BEHBAHANI, A. A Simple and Rapid DNA Purification Method for Detection of Leishmania DNA in Peripheral Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Shiraz E-Medical Journal**, Shiraz, v. 9, p.12-15, Apr. 2008.

MORENO, E. *et al.* Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana assintomática em área urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v.11, p.37-39, 2002.

MOTAZEDIAN, M. *et al.* A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 60, p. 151-154, 2008.

NASCIMENTO, *et al.* The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.105, p.298-300, 2011.

ONUMA, H. *et al.* A case of mucosal leishmaniasis: beneficial usage of polymerase chain reaction for diagnosis. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 40, p. 765-767, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmania/HIV co-infection. Epidemiological analysis of 692 retrospective cases. **Wkly Epidemiol Rec**, New York, v.72, p.49-54, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. **Addis Ababa**, Naribi, p.20-22, Mar. 2007.

ORSINI, M. *et al.* Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.35, p.259-262, 2002.

OSMAN, O. F. *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, p.2454-2457, 1997.

PAL, S. *et al.* Diagnosis of symptomatic kala-azar by polymerase chain reaction using patient's blood. **Medice Science Monitory**, New York, v.10, p.1-5, 2004.

PIARROUX, R. *et al.*, 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**, Washington, v. 32, p. 746-749, 1994.

PINTADO, V. *et al.* Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Patients: A Comparative Study. **Medicine**, São Paulo, v.80, p. 54-73, 2001.

- RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. *Leishmania*/HIV coinfection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.97, p.17-28, 2003.
- RAVEL, S. *et al.* A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**, Basel, v.59, p.187-196, 1995.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal Clinical Microbiology**, New York, v.45, p.21–25, 2007.
- RIERA, C., *et al.* Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV/Leishmania coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease**, Bruxelles, v.23, p.899-904, 2004.
- RIOUX, J. A. *et al.* 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v.65, p.111–125, 1990.
- ROMERO, J.; BOELAERT, A. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **Neglected Tropical Diseases**, New York, v.4, p.1-17, 2010.
- SEAMAN, J. *et al.* Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. **Annals of Internal Medicine**, New York, v.124, p. 664-672, 1996.
- SHAW, J.J. *et al.* Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 81, p. 69–72, 1987.
- SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 577-579, 2006.
- SILVA, E. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p. 285-291, 2001.
- SILVA, M. A. L. *et al.* Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Revista eletrônica de farmácia**, Goiânia, v.7, p.1-15, 2010.
- SILVA, S. L. B. *et al.* Visceral leishmaniasis: 20 years of clinical experience in a pediatric population of a reference hospital in Chiapas, Mexico. **Boletín médico del Hospital Infantil de México**, Ciudad de México, v.68, p.83-87, 2011.
- SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral Leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.123, p. 331-344, Mar. 2006.

SPYRIDES, M.H.C. *et al.* A Leishmaniose Visceral no Nordeste: uma análise epidemiológica. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.27, p.224-229, 2011.

SRIVASTAVA, P. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.105, p.1-6, 2011.

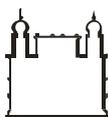
SUNDAR, S. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v.105, p.1-6, 2011.

THOMAZ-SOCCOL, V. **Les *Leishmania* du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Demarche progressive phenetique-cladistique.** 1993. Tese (doutorado). Université Montpellier, Paris, 1993.

VILAPLANA, C., *et al.* Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. **Journal Clinical Microbiology**, New York, v.42, p.1853-1854, 2004.

WERNECK, G. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.26, p.644-645, 2010.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Eu _____, acompanhado no Hospital _____, aceito em participar do projeto de pesquisa COMPARAÇÃO ENTRE O DESEMPENHO DOS EXAMES PARASITOLÓGICO E MOLECULAR EM AMOSTRAS DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA NOS PACIENTES COM E SEM CO-INFEÇÃO POR LEISHMANIOSE VISCERAL/HIV-Aids, coordenado por Elaine Bomfim, cujo objetivo é avaliar se consegue achar o micróbio do calazar (*Leishmania*) através do crescimento no meio no qual ele será colocado, permitindo o diagnóstico da infecção por *Leishmania chagasi*. Informo que será realizada uma punção da região do tórax, onde será coletado 2 ml de sangue, que é equivalente a 1 colher de chá, através de uma agulha estéril (“sem infecção”) e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, e será realizada anestesia no local. Podendo sentir um leve desconforto e dor local após a realização da coleta, podendo algumas vezes causar uma pequena mancha roxa (hematoma) no local da “picada” da agulha que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento. Fui informado que depois da coleta de meu sangue, o mesmo será distribuído em dois tubos como também será feito 3 lâminas para a realização dos exames laboratoriais. Também fui informado que o meu sangue será examinado para a presença do micróbio, através do exame direto, assim como será cultivado em um meio específico para observação do crescimento dele, bem como será realizada a pesquisa do material genético (DNA) – reação em cadeia de polimerase (PCR). Fui informado ainda que, se o micróbio de calazar for encontrado no meu sangue, caracterizando a doença denominada leishmaniose visceral, será de grande auxílio esta identificação para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento. Estou ciente, também que os exames e o tipo de tratamento utilizados na pesquisa são os recomendados (padronizados) pelo Ministério da Saúde e são necessários para o diagnóstico e o tratamento do meu caso. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não receberei nenhuma compensação financeira para participar deste estudo. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de sangue e líquido de medula para exame de laboratório, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas serei contactado para autorização desse uso. Como também autorizo que as informações médicas obtidas de minha pessoa sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Finalmente, assinarei esse termo de consentimento em duas vias, sendo que uma ficará sob a minha guarda e a outra será arquivada pelo CPqAM/FIOCRUZ. Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Recife, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do Paciente

Assinatura do responsável pelo projeto

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Elaine Cristina Bomfim de Lima, bióloga e mestranda do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ. Contato: 2101-2995 / 86044525.

Dra. Zulma Medeiros, biomédica, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Contato: 2101-2662

Médico responsável:

Dr.º Demócrito Miranda Filho, médico infectologista do Hospital Oswaldo Cruz. Contato: 2101-1339/1300

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep



ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CpqAM/FIOCRUZ/PE

PARECER DE RELATÓRIO FINAL

Título do Projeto: Análise comparativa entre metodologias diagnósticas em pacientes com e sem co-infecção por *Leishmania chagasi* / HIV.

Pesquisador Responsável: Elaine Cristina Bonfim Lima

Número do CAEE: 0091.0.095.000-10

Data de Aprovação pelo CEP-CPqAM 02.02.2011

Instituição onde foi realizado o Projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Recife, 09 de março de 2012.

Prezada Sra. Elaine Cristina Bonfim Lima,

Após analisar o relatório final referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 07 de março de 2012, informamos que o **relatório final foi aceito**, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, número 196, de 10 de outubro de 1996 ([HTTP://www.cpqam.fiocruz.br/aggeu/doc/resolucao196-96.doc](http://www.cpqam.fiocruz.br/aggeu/doc/resolucao196-96.doc)).

Atenciosamente,

Gislle Campozana Gouveia

Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ