

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E DA CARGA PARASITÁRIA EM
SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS HOSPITALIZADAS
POR LEISHMANIOSE VISCERAL**

Maria Vitória Assumpção Mourão

por

Belo Horizonte
Fevereiro/2012

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E DA CARGA PARASITÁRIA EM
SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS HOSPITALIZADAS
POR LEISHMANIOSE VISCERAL**

Maria Vitória Assumpção Mourão

por

Dissertação apresentada com vistas à obtenção
de título de Mestre em Ciências na área de
concentração de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientação: Dra. Ana Lúcia Teles Rabello

Belo Horizonte
Fevereiro/2012

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M929e Mourão, Maria Vitória Assumpção.
2012

Evolução de parâmetros clínicos e da carga parasitária em sangue periférico de crianças hospitalizadas por leishmaniose visceral / Maria Vitória Assumpção Mourão. – Belo Horizonte, 2012.

XVI, 111 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 112 - 127

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose visceral/sangue 2. *Leishmania donovani*/parasitologia 3. Criança 4. Reação em Cadeia da Polimerase/instrumentação. III. Rabello, Ana Lúcia Teles (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E DA CARGA PARASITÁRIA EM
SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS HOSPITALIZADAS
POR LEISHMANIOSE VISCERAL**

por

Maria Vitória Assumpção Mourão

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Ana Lúcia Teles Rabello (Presidente)

Profa. Dra. Roberta Maia de Castro Romanelli

Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

Suplente: Profa. Dra. Lilian Martins Oliveira Diniz

Dissertação defendida e aprovada em: 29/02/2012

Equipe colaboradora:

Dr. Antônio Carlos de Castro Toledo Júnior - Universidade José do Rosário Vellano (Belo Horizonte).

Dra. Luciana Inácia Gomes - Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou.

Dra. Vanessa Perhuype Magalhães Pascoal - Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou.

Financiamento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ - 02819/10).

Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

“Si na parte geral do nosso trabalho alguma coisa existe nouva, não é nossa, confessamos...” (trecho da tese “Das osteomyelites em geral”, de 1913, cujo autor é Dr. Annibal de Paiva Assumpção, meu bisavô materno, de quem sou a primeira descendente a seguir a Medicina). O presente estudo também é resultado não do esforço de uma só pessoa, mas sim da colaboração de muitos, a quem agradeço sinceramente!

Ao curso de pós-graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade.

À Dra. Ana Rabello, pela abertura das portas neste novo caminho, pela partilha de uma visão crítica maior, pelo aprendizado do trabalho com liberdade.

Ao Dr. Antônio Toledo, pela grande disponibilidade, pelo olhar crítico, muito construtivo.

À Dra. Luciana Gomes, pelos ensinamentos em um campo tão novo, pela tranquillidade.

À Dra. Vanessa Perhuype-Magalhães, pela disposição em colaborar, ainda aguardando o que há de vir.

A Verônica, pela responsabilidade nas atividades.

A todos do Laboratório de Pesquisas Clínicas, pelo acolhimento e colaboração.

Às companheiras de estrada Anna e Érica, pela (re)descoberta da amizade, pelo conforto de compartilhar as alegrias, as dificuldades e, agora, também as realizações.

Aos pacientes, seus pais e responsáveis, pela confiança no estudo, pela participação e doação motivadas pela melhoria da assistência a outros, pela troca de conhecimentos.

A toda a equipe do Hospital Infantil João Paulo II - médicos da DIP e residentes, enfermeiros e secretárias do 2º andar, núcleos de pesquisa e de epidemiologia, laboratório, arquivo, coordenação médica -, pela possibilidade de realização e dedicação a este estudo.

Ao grupo de Infectologia Pediátrica, pelo conhecimento compartilhado e pelo incentivo.

À Dra. Andréa L. Carvalho, por me “adotar” na Infectologia Pediátrica, pela valiosa preceptoria na vida.

À Dra. Flávia Campos, pela ajuda gratuita e amizade cultivada na parceria de trabalho.

Ao Luiz, pela bondade e companheirismo, pela disponibilidade constante, pelo carinho.

À minha irmã, agora também colega, pela descontração e graça no dia-a-dia.

Aos meus pais, pelas oportunidades de crescimento, pelo estímulo a ser mais, sempre.

À minha mãe, pela aprendizagem ao longo da vida, pelo carinho e dedicação constantes nos pequenos cuidados que tornam possíveis as minhas realizações.

Ao meu pai, pelo exemplo de busca de conhecimentos.

A Deus, pela luz e força.

Sumário

Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XI
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XIII
Resumo	XV
Abstract	XVI
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Agentes etiológicos, reservatórios e vetores	18
1.2 Epidemiologia	18
1.3 Aspectos clínicos e laboratoriais.....	21
1.4 Métodos diagnósticos laboratoriais.....	22
1.5 Tratamento específico	27
1.6 Fatores preditores de prognóstico	29
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 PACIENTES E MÉTODOS	35
3.1 Local do estudo	36
3.2 Delineamento do estudo	36
3.3 Critérios e definições	36
3.3.1 Casos suspeitos e confirmados.....	36
3.3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	37
3.3.3 Definições clínicas e laboratoriais	37
3.3.4 Critérios de gravidade e escores preditores de óbito	40
3.3.5 Definição de evolução grave	42
3.3.6 Fatores de risco para evolução grave	42
3.4 Propedêutica e tratamento específico.....	43
3.5 Projeto de pesquisa LV Brasil	43
3.6 Acompanhamento clínico, exames laboratoriais e coleta de amostras para quantificação da carga parasitária	44
3.7 Cálculo da amostra	45
3.8 Análises estatísticas	46
3.9 Aspectos éticos.....	47
3.10 Técnicas laboratoriais	47
3.10.1 Teste imunocromatográfico DiaMed-IT Leish®.....	47

3.10.2 Extração de DNA para qPCR	48
3.10.3 Fragmento alvo e iniciadores para qPCR.....	48
3.10.4 Construção da curva padrão para q PCR	49
3.10.5 Reação da qPCR	49
4 RESULTADOS	52
4.1 Características clínicas e laboratoriais na primeira avaliação.....	53
4.2 Diagnóstico laboratorial	56
4.3 Tratamento específico	57
4.4 Características clínicas na segunda e terceira avaliações.....	58
4.5 Evolução dos exames laboratoriais	61
4.6 Intercorrências e tratamento de suporte durante a internação hospitalar	62
4.7 Quantificação do material genético de Leishmania	63
4.7.1 Confiabilidade dos ensaios quantitativos	63
4.7.2 Número de cópias de SSU rRNA nas três avaliações.....	64
4.7.3 Número de cópias de SSU rRNA e características clínicas e laboratoriais na primeira avaliação	67
4.7.4 Número de cópias de SSU rRNA e medicação utilizada.....	69
4.8 Avaliação de gravidade.....	71
4.8.1 Avaliação de critérios de gravidade e escores preditores de óbito à admissão hospitalar	71
4.8.2 Tratamento específico em pacientes com critérios de gravidade ou pontuação preditora de óbito à admissão	72
4.8.3 Evolução grave: definição e aplicação de critérios de gravidade e escores preditores de óbito	72
4.8.4 Número de cópias de SSU rRNA, critérios de gravidade e escores preditores de óbito à admissão hospitalar e evolução grave durante a internação	74
4.8.5 Fatores de risco para evolução grave	75
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	98
7 ANEXOS	100
7.1 Métodos e valores de referência de exames laboratoriais do HIJPII	101
7.2 Ficha de acompanhamento clínico e laboratorial.....	102
7.3 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	102
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

Lista de Figuras

- Figura 1 - Percentual de sinais observados em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.60
- Figura 2 - Média do tamanho de vísceras ajustadas por SC, em cm, observadas em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.61
- Figura 3 - Número de cópias de SSU rRNA (em $\log_{10} + 1$) em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de 48 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.65
- Figura 4 - Número de cópias de SSU rRNA (em $\log_{10} + 1$) em T0 (admissão hospitalar) e T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) de 46 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.66
- Figura 5 - Número de cópias de SSU rRNA (em $\log_{10} + 1$) em T0 (admissão hospitalar), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de 43 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.....67
- Figura 6 - Número de cópias de SSU rRNA (em $\log_{10} + 1$) em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011, de acordo com tratamento efetivo.....70
- Figura 7 - Negativação do número de cópias de SSU rRNA ao longo do tratamento efetivo com diferentes medicações em pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.71
- Figura 8 - Distribuição, de acordo com intervenções instituídas, dos 16 pacientes internados por LV que evoluíram graves no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.73

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Limites de normalidade de frequência respiratória por faixa etária	38
Tabela 2 - Escore preditor de óbito proposto pelo MS (MS-2011) para pessoas com idade acima de dois anos.....	41
Tabela 3 - Escore preditor de óbito proposto pelo MS (MS-2011) para lactentes com idade menor de dois anos	41
Tabela 4 - Escore preditor de óbito proposto por Sampaio et al. para crianças menores de 15 anos.....	42
Tabela 5 - Sintomas e sinais observados em T0 (antes do início do tratamento) de 48 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011	54
Tabela 6 - Exames hematológicos e bioquímicos à admissão hospitalar de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011	55
Tabela 7 - Frequência de alterações laboratoriais à admissão hospitalar dos pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011	55
Tabela 8 - Positividade dos métodos diagnósticos para LV em 48 pacientes internados no HIJPII não incluídos e incluídos no estudo LV Brasil, de junho de 2010 a junho de 2011	57
Tabela 9 - Percentual de sinais observados em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011	60
Tabela 10 - Médias dos valores de exames hematológicos e bioquímicos à admissão e alta hospitalares de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.....	62
Tabela 11 - Número de cópias de DNA do plasmídeo contendo o fragmento de 67pb do gene SSU rRNA e coeficientes de variação (CV), em percentual, dos pontos da curva padrão.....	64
Tabela 12 - Cópias de SSU rRNA em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) dos pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.....	65

Tabela 13 - Correlação entre número de cópias de SSU rRNA e características demográficas, clínicas e laboratoriais em T0 (antes do início do tratamento), em pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011	68
Tabela 14 - Comparação entre número de cópias de SSU rRNA e características demográficas e alterações clínicas em T0 (antes do início do tratamento), em pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011	68
Tabela 15 - Cópias de SSU rRNA em T0 (antes do início do tratamento) dos pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011, de acordo com tratamento efetivo	69
Tabela 16 - Negativação da carga parasitária dos pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011, de acordo com tratamento efetivo.....	70
Tabela 17 - Médias, DP e medianas do número de cópias de SSU rRNA em T0 (antes do início do tratamento) dos 48 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011, de acordo com o critério de gravidade do MS-2006, o escore preditor de óbito de Sampaio et al. e a classificação de evolução grave proposta pelo presente estudo	75
Tabela 18 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais como fatores de risco para evolução grave em pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011	77
Tabela 19 - Valores de referência para hemograma, por faixa etária (limite mínimo - limite máximo)	101
Tabela 20 - Métodos e valores de referência de atividade de protrombina e exames bioquímicos (limite mínimo - limite máximo).....	101

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- Aids – Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês, *acquired immunodeficiency syndrome*)
- ALT – Alanina aminotransferase
- AST – Aspartato aminotransferase
- BH - Belo Horizonte
- CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou
- Ct - do inglês, *cycle threshold*
- CV - Coeficiente de variação
- DALY - Ano de vida perdido ajustado por incapacidade (do inglês, *disability-adjusted life year*)
- DAT - Teste de aglutinação direta (do inglês, *direct agglutination test*)
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DP - Desvio-padrão
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA - Ensaio imunoenzimático (do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay*)
- FHEMIG - Fundação Hospitalar do estado de Minas Gerais
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- FUNED - Fundação Ezequiel Dias
- HAART - Terapia antiretroviral altamente potente (do inglês, *highly active anti-retroviral therapy*)
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *human immunodeficiency virus*)
- HIJPII - Hospital Infantil João Paulo II
- IC - Intervalo de confiança
- IL - Interleucina
- IMC - Índice de massa corporal
- ITU - Infecção do trato urinário
- IVAS - Infecções de vias aéreas superiores
- kDNA - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto
- LACEN - Laboratório Central
- LPC - Laboratório de Pesquisas Clínicas
- LV - Leishmaniose visceral
- MO - Medula óssea

MG - Minas Gerais
medRNA - Ácido ribonucléico de mini-exon
MS - Ministério da Saúde
MS-2006 - Classificação de gravidade proposta pelo Manual do MS de 2006
MS-2011 – Escore preditor de óbito proposto pelo Manual do MS de 2011
OMS - Organização Mundial de Saúde
pb - Pares de bases
PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)
qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RCD - Rebordo costal direito
RCE - Rebordo costal esquerdo
RIFI - Reação de imunofluorescência indireta
RNA - Ácido ribonucléico
rRNA - Ácido ribonucléico ribossomal
RNI - Razão normalizada internacional
RR - Risco relativo
R² - Coeficiente de correlação linear
SC - Superfície corporal
SISLAB - Sistema Nacional de Laboratórios
SSU rRNA - Pequena subunidade de RNA ribossomal (do inglês, *small subunit rRNA*)
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido
UTI - Unidade de terapia intensiva
UNG - Uracil-DNA glicosilase
VM - Ventilação mecânica
VPN - Valor preditivo negativo
VPP - Valor preditivo positivo

Resumo

No Brasil, observa-se aumento dos casos de leishmaniose visceral (LV) nos últimos anos, associado à alta letalidade. É necessária a identificação de indicadores sensíveis e específicos que reconheçam precocemente a gravidade e possibilitem intervenção imediata e adequada. O objetivo do presente estudo prospectivo foi correlacionar parâmetros clínicos e laboratoriais e carga parasitária à evolução da LV em crianças. Foram incluídas 48 crianças com diagnóstico de LV, internadas no Hospital Infantil João Paulo II, em Belo Horizonte, de junho de 2010 a junho de 2011. Os pacientes foram avaliados clinicamente e tiveram amostras de sangue periférico coletadas antes (T0), entre 10 e 15 dias (T1) e entre 40 e 60 dias (T2) após início do tratamento. Nestas amostras, a carga parasitária foi quantificada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), sendo o gene alvo a SSU rRNA de *Leishmania*. Evolução grave foi definida como internação em UTI ou administração de amina vasoativa, ventilação mecânica ou hemotransfusão. As manifestações clínicas mais observadas à admissão foram febre, palidez e hepatosplenomegalia, associado à pancitopenia, elevação das aminotransferases hepáticas e hipoalbuminemia. A positividade da RIFI e dos testes rápidos Kalazar Detect® e Diamed-IT Leish® foi de 66,7%, 85,4% e 100%, respectivamente. Observou-se elevada positividade (100%) em exames de PCR convencional em sangue periférico e aspirado de medula óssea. Como tratamento específico, administrou-se Glucantime® em 45,8%, anfotericina B desoxicolato em 35,5%, anfotericina B lipossomal em 8,3% e associação de anfotericina B lipossomal e Glucantime® em 10,4% dos pacientes. Considerou-se que 56,2% das crianças apresentaram evolução grave, mas sem nenhum óbito. Em T2, todos apresentavam melhora clínica. A classificação por critérios de gravidade proposta pelo Ministério da Saúde em 2006 foi aplicada à admissão, não apresentando boa acurácia para detecção de casos com evolução grave. O qPCR apresentou bom desempenho e foi positivo em todas as crianças em T0. Observou-se variação ampla da carga parasitária em T0, não correlacionada a características clínicas e laboratoriais, a critérios de gravidade e escores preditores de óbito à admissão e à evolução grave durante a internação. Redução significativa do número de cópias do fragmento gênico foi constatada em T1 e T2, que não variou de acordo com a medicação usada. Identificaram-se como fatores de risco para evolução grave idade menor do que 12 meses, taquidispneia, infecção, hepatomegalia volumosa, anemia, plaquetopenia e hipoalbuminemia à admissão.

Abstract

In Brazil, there is an increasing number of cases of visceral leishmaniasis (VL) in recent years, associated to a high case-fatality rate. It is necessary to identify sensitive and specific clinical factors that may prompt to adequate and immediate intervention. The purpose of this prospective study was to correlate clinical and laboratory parameters and parasite load with clinical outcome in children with VL. Forty-eight children diagnosed with VL and hospitalized in Hospital Infantil João Paulo II, in Belo Horizonte, Brazil, were included from June 2010 to June 2011. The patients were assessed clinically and peripheral blood samples were obtained before (T0), from 10 to 15 (T1) and from 40 to 60 days (T2) after starting treatment. In these samples, the parasite load was quantified by real-time quantitative PCR (qPCR) using as molecular target the SSU rRNA gene of *Leishmania*. Severe outcome was defined as admission in intensive care unit, administration of vasoactive amines, mechanical ventilation or blood transfusion. The most frequently observed features were fever, pallor and hepatosplenomegaly associated with pancytopenia, elevated liver aminotransferases and hypoalbuminemia. The positivity of IFAT and of the rapid tests Kalazar Detect® and Diamed-IT Leish® was 66,7%, 85,4% e 100%, respectively. There was a high positive rate (100%) in conventional PCR in peripheral blood and bone marrow aspirates. The drugs used for specific therapy were Glucantime® in 45,8%, amphotericin B deoxycholate in 35,5%, liposomal amphotericin B in 8,3% and combination of liposomal amphotericin B and Glucantime® in 10,4% of the patients. It was considered that 56,2% of the children presented severe outcome but no deaths occurred. At T2, all patients had clinical improvement. The classification of severity proposed by the Ministry of Health in 2006, applied at admission, showed low accuracy for detection of severe cases. The quantitative PCR assay presented high performance and was positive in all children in T0. There was a wide variation in parasite load at T0 and no correlation was observed with clinical and laboratory features, with severity at admission and with severe outcome. Significant decrease in the number of copies of the gene fragment was found in T1 and T2, which did not vary according to the drug used. The identified risk factors for severe outcome were children younger than 12 months and the presence of tachydyspnea, infection, hepatomegaly, anemia, thrombocytopenia and hypoalbuminemia at admission.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agentes etiológicos, reservatórios e vetores

A leishmaniose visceral (LV) é doença causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, complexo *donovani*, que possui duas espécies - *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, sinônimo de *L. (L.) chagasi*. A *L. (L.) donovani* é o agente etiológico da LV no leste da África e subcontinente indiano (Índia, Nepal e Bangladesh). Nestes locais, a doença é antroponótica e pacientes com LV não tratada e com leishmaniose dérmica pós-calazar são os principais reservatórios do parasito (Desjeux, 2001).

Na América Latina, região do Mar Mediterrâneo e Ásia central, a LV é uma zoonose causada pela *L. (L.) infantum*. Na área urbana, os principais reservatórios são os cães e, no ciclo silvestre, raposas e marsupiais detêm este papel (Desjeux, 2001). No Brasil, os vetores da LV são flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* e a principal espécie transmissora é a *Lu. longipalpis*, que apresenta ampla distribuição no país (Brasil, 2006a).

1.2 Epidemiologia

Cerca de 500 mil novos casos de LV ocorrem anualmente e a doença apresenta grande importância médica e social devido à sua gravidade e à taxa de letalidade muito alta. Em todo o mundo, 90% dos casos estão concentrados em apenas cinco países: Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (World Health Organization, 2011a).

No subcontinente indiano, onde ocorrem mais de 60% dos casos mundiais, a doença acomete principalmente a população de comunidades rurais, habitantes de casas de barro próximas a coleções de água, tendo a pobreza como fator associado importante (Bern et al., 2010). O número de casos é de aproximadamente 40.000, com 200 a 300 óbitos anuais. Contudo, tais números parecem ser subestimados, com incidência de LV real de 21 casos/10.000 habitantes e perda de 400.000 anos de vida ajustados por incapacidade - do inglês, *disability-adjusted life years* (DALYs) - a cada ano (Joshi et al., 2008).

No leste do continente africano, a LV responde por cerca de 4.000 óbitos e perda de 385.000 DALYs anualmente. Conflitos armados na região contribuíram

tanto para desestruturação dos serviços de saúde quanto para migração de grandes populações, culminando com aumento significativo do número de casos da doença nas últimas décadas (Reithinger et al., 2007). Ressalta-se a importância da desnutrição, agravada pelos períodos de seca, e da coinfeção com o vírus HIV, esta especialmente frequente na Etiópia, como fatores de risco para evolução grave da parasitose (Berman, 2006).

A LV é a única doença tropical endêmica na Europa, inicialmente acometendo crianças ao sul do continente e, na atualidade, presente também em adultos de regiões mais ao norte. A incidência é relativamente pequena, variando de 0,02 a 8,53 casos/100.000 habitantes, com cerca de 700 casos anuais. Importância crescente à zoonose passou a ser dada após a epidemia de aids, devido à gravidade dos casos de coinfeção. Contudo, a introdução da terapia antiretroviral altamente potente - do inglês, *highly active anti-retroviral therapy* (HAART) - a partir da década de 90 levou a decréscimo destes casos (Dujardin et al., 2008).

No continente americano, 90% dos casos de LV ocorrem no Brasil, com cerca de 65.000 doentes entre 1990 e 2010. Observa-se aumento do número de notificações pela doença nas últimas décadas, com média anual de casos de 1.601 entre 1985 e 1989, 2.662 entre 1990 e 1999 e 3.484 entre 2000 e 2010 (Werneck, 2010; Brasil, 2011a).

Concomitante a este aumento, houve mudanças significativas na epidemiologia da LV. Antes considerada endemia rural presente principalmente no Nordeste, constata-se dispersão da doença para todas as outras regiões, principalmente para o Centro-Oeste e Sudeste, com número crescente de casos em áreas urbanas. Explicações possíveis para tais mudanças são as migrações do interior do país para subúrbios de grandes cidades, destruição de áreas verdes periurbanas favorecendo ligação entre ciclos silvestres e urbanos, participação de outros animais além do cão como reservatórios do parasito e mudança no comportamento e infectividade do flebotomíneo (Costa, 2008; Dantas-Torres, Brandão-Filho, 2006; World Health Organization, 2002).

Comparativamente às outras áreas endêmicas, em especial subcontinente indiano e leste africano, a população acometida por LV no Brasil é mais jovem e apresenta menores percentuais de mulheres em idade fértil e de desnutridos graves. As condições sócio-econômicas distintas das regiões, incluindo acesso a serviços de saúde e exposição a fatores de risco, e também a existência de espécies de parasitos e padrões de transmissão diferentes são possíveis justificativas para estas

diferenças (Harhay et al., 2011). É relatado que, em locais onde a ocorrência da LV é recente, há acometimento de maior proporção de adultos e, com intensificação e cronicidade da transmissão, a faixa etária mais prevalente passa a ser a pediátrica, possivelmente devido à imunidade adquirida ao longo da vida naqueles indivíduos com maior idade (Costa, 2008).

A coinfeção HIV-LV é relevante no Brasil, pois há sobreposição de áreas com ambas as doenças devido à urbanização da LV e à interiorização da epidemia de HIV (Rabello et al., 2003). Observa-se maior número de homens coinfectados, geralmente com imunossupressão avançada. Diante da maior chance de evolução desfavorável da LV em pacientes com HIV, o Ministério da Saúde (MS), atualmente, sugere que seja realizada sorologia para esta infecção viral em todos os pacientes com a parasitose (Brasil, 2011b).

A letalidade por LV variou de 3,2% a 8,4% nos últimos dez anos no Brasil. As taxas das regiões Centro-Oeste (9,4%) e Sudeste (8,8%), apesar do número menor de casos, foram superiores à média nacional neste período (Brasil, 2011c). Em Minas Gerais (MG), ocorreram de 27 a 63 óbitos anuais por LV entre 2007 e 2010, sendo o estado com maior número absoluto de casos com evolução fatal neste período (Brasil, 2011d).

Em Belo Horizonte (BH), observou-se aumento importante na incidência de LV, com média anual de 38 casos no período de 1994 e 1999, de 83 casos entre 2000 e 2004 e de 132 casos entre 2005 e 2010. No período de 2006 a 2011, a letalidade da doença neste município foi superior à do país, com variação da taxa anual de 8,1% a 23,0%, sem tendência de queda nos últimos anos. Apesar de o maior percentual de casos se concentrar em crianças e adolescentes até 14 anos (36,8%), apenas 7,6% do total de óbitos ocorreu nesta faixa etária (Prefeitura de Belo Horizonte, 2011). Esta tendência também está presente na região metropolitana desta cidade, onde, de 2007 a 2011, observou-se taxa de letalidade de 2,4% em menores de 14 anos e de 13,9% naqueles com mais de 15 anos (Camila Freitas, Superintendência Regional de Saúde de Belo Horizonte, Secretaria Estadual de Saúde – comunicação pessoal).

Em 2001, estudo evidenciou expansão das leishmanioses na região metropolitana de BH e apontou necessidade de capacitação dos profissionais e melhor estrutura para atendimento destes pacientes (Luz et al., 2001). Este panorama persiste ainda hoje.

1.3 Aspectos clínicos e laboratoriais

A infecção pela *L. (L.) infantum* apresenta espectro clínico muito amplo, incluindo desde formas assintomáticas a quadros muito graves, com potencial de evolução fatal (Badaro et al., 1986a).

Os pacientes assintomáticos não apresentam manifestações clínicas ou alterações em exames hematológicos ou bioquímicos. Constituem a maior parte dos infectados pela *L. (L.) infantum* e, em áreas endêmicas, sua prevalência varia de 0,5 a 73% (Michel et al., 2011). O diagnóstico é realizado por meio de exames laboratoriais e geralmente estes pacientes apresentam teste de hipersensibilidade tardia (reação de Montenegro) positivo (Badaro et al., 1986a). Mais recentemente, técnicas de biologia molecular têm se mostrado bastante sensíveis para detecção do parasito nestes portadores assintomáticos, levantando a hipótese de sua participação no ciclo da doença como reservatórios humanos (Costa et al., 2002; Moreno et al., 2005; Marques, 2010; Fakhar et al., 2008; Michel et al., 2011).

Fatores associados a maior risco de evolução para doença após infecção pelo parasito já foram descritos. É possível que haja uma susceptibilidade genética que, juntamente com características demográficas e individuais, como baixa idade, desnutrição e condição socioeconômica precária, culmine com o aparecimento do quadro manifesto da LV (Badaró et al., 1986b; Kolaczinski et al., 2008; Blackwell et al., 2009). A positividade de testes imunológicos parece não predizer evolução para doença (Silva et al., 2011).

O período de incubação da LV varia de 10 dias a 24 meses (Brasil, 2006a). A forma clássica da doença caracteriza-se por febre prolongada e esplenomegalia, critérios para suspeição clínica de quadro, de acordo com o MS (Brasil, 2006a). Contudo, é possível que a doença se manifeste na ausência destes dois sinais (Silva et al., 2001). Observa-se, também, acometimento importante do estado geral, hepatomegalia, palidez, emagrecimento, diarreia e vômitos. Pancitopenia, diminuição da albumina sérica e aumento da globulina são alterações marcantes da LV, que pode levar também a elevação das aminotransferases hepáticas e hiperbilirrubinemia. Linfadenomegalia, apesar de frequente em casos de calazar no subcontinente indiano e África, não é achado comum na América e na Europa (Zijlstra et al., 1992; Campos, 1995; Bhattacharya, et al., 2006; Petrela et al., 2010; Rocha et al., 2011).

Estudos identificaram maior percentual de palidez e níveis de hemoglobina mais baixos em crianças com LV, quando comparadas a adultos com a doença. Visceromegalias também foram descritas mais frequentemente na população pediátrica (Zijlstra et al., 1992; Caldas et al., 2006).

Infecções e sangramentos são as duas principais complicações da doença, estando associadas à evolução fatal muito frequentemente (Lyons et al., 2003; Collin et al., 2004; Rey et al., 2005; Sampaio et al., 2010; Costa et al., 2010). Há relato de incidência 4,8 vezes maior de quadros infecciosos em crianças com LV do que em desnutridos hospitalizados por outras causas (Andrade et al., 1990). Muito provavelmente, esta tendência é secundária a fatores múltiplos, sendo relevante a imunossupressão pela própria LV (Barati et al., 2008). Os sangramentos nestes pacientes também têm origem multifatorial, com participação da produção hepática inadequada de fatores de coagulação, plaquetopenia e, em alguns casos, ativação inflamatória, com instalação de quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD) (Costa, 2009).

1.4 Métodos diagnósticos laboratoriais

Diante do quadro clínico inespecífico da LV, são necessários exames laboratoriais para confirmação diagnóstica.

Os testes parasitológicos são os mais específicos e, por este motivo, ainda hoje considerados padrão-ouro para diagnóstico da LV. Podem ser realizados a partir de aspirados de baço, linfonodo ou medula óssea (MO). O exame realizado com amostra obtida da punção esplênica é o mais sensível (93-99%), porém o procedimento apresenta risco significativo de hemorragia (World Health Organization, 2010; Srivastava et al., 2011; Singh, 2006). No Brasil, indica-se a punção de MO para realização de exame direto, por meio de esfregaço em lâmina, e de cultura em meio específico (Brasil, 2006a). Deve-se ressaltar a sensibilidade variável dos testes parasitológicos, cuja positividade pode variar de 40,2 a 95,4% em avaliação de esfregaços de MO (Silva et al., 2005). A acurácia dos exames parasitológicos depende do tipo de amostra avaliada, da experiência e técnica dos coletores e examinadores e do tempo gasto na observação das lâminas (Srivastava et al., 2011; Silva et al., 2005).

Para confirmação do diagnóstico de LV, os exames de detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* são os utilizados mais frequentemente. No

Brasil, o teste mais realizado é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), considerada positiva na presença de títulos iguais ou superiores a 1:80 (Brasil, 2006a). Há, também, disponibilidade de ensaio imunoenzimático - do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay* - (ELISA). A produção nacional da RIFI e do ELISA é feita por Biomanguinhos, Fiocruz, e os kits são disponibilizados pelo MS ao Sistema Nacional de Laboratórios (SISLAB). Contudo, ambos exigem aparelhagem sofisticada e pessoal especializado, tornando-os mais caros e de realização restrita a alguns laboratórios (Srivastava et al., 2011). Além disso, a RIFI mostrou eficiência diagnóstica inferior à de outros testes diagnósticos em estudo brasileiro e também em metanálise recente (Pedras et al., 2008; Maia et al., 2012).

Devido a estas limitações, foram desenvolvidos outros dois métodos de detecção de anticorpos mais baratos e simples: o teste de aglutinação direta – do inglês, *direct agglutination test* (DAT) - e os testes imunocromatográficos com o antígeno recombinante rK39, conhecidos como testes rápidos. A utilização do primeiro é recomendada pela OMS em hospitais regionais e centros terciários e os testes rápidos devem ser utilizados também em centros de atenção primária (World Health Organization, 2010).

O DAT utiliza o promastigota inteiro de *L. (L.) donovani* ou *L. (L.) infantum* corado, que atualmente está disponível como antígeno seco, liofilizado, o que dispensa sua refrigeração. O teste apresentou sensibilidade alta, variando de 92,7 a 96,4%, e especificidade entre 72,3 e 93,4% em metanálise envolvendo 30 estudos em diferentes áreas endêmicas (Chappuis et al., 2006). No Brasil, avaliação multicêntrica prospectiva evidenciou boa acurácia do teste, com sensibilidade de 90%, especificidade de 96%, valor preditivo positivo (VPP) de 97% e valor preditivo negativo (VPN) de 84% (de Assis et al., 2011). Outro estudo brasileiro sugeriu superioridade do DAT em relação à RIFI, evidenciando eficiências diagnósticas de 97,4% e de 87,6%, respectivamente (Pedras et al., 2008). Não há produção nacional de kits de DAT e apenas dois produtores europeus (Bélgica e Holanda) disponibilizam o produto, por custo inacessível para a maioria dos países endêmicos.

Os testes imunocromatográficos vêm se tornando populares em todo o mundo, devido à facilidade de seu uso, sendo possível realização de exame com sangue total por punção digital em locais sem maiores recursos e obtenção imediata do resultado. Utilizam antígeno recombinante derivado de sequência de 39 aminoácidos de *Leishmania* (World Health Organization, 2011b). Sua sensibilidade

varia entre 87,7 e 97,1% e sua especificidade entre 66,8 e 97,9%, observando-se heterogeneidade de resultados de acordo com a região avaliada e com os tipos de controles negativos utilizados – indivíduos saudáveis ou com doenças de apresentação clínica semelhante a da LV (Chappuis et al., 2006).

Outra causa de variação de acurácia entre os testes rápidos é a diversidade de marcas disponíveis no mercado. A OMS publicou relatório que avaliou diversas marcas de testes imunocromatográficos. Observou-se que todas as marcas apresentaram melhor desempenho em pacientes do subcontinente indiano. No Brasil, houve diferença importante na sensibilidade dos quatro testes avaliados. O mais sensível foi o Diamed-IT Leish® (Biorads Laboratories), com valores entre 87,8 e 94,8%. A especificidade, por sua vez, foi alta com todas as marcas. Sugeriu-se, deste modo, que, em pacientes brasileiros com clínica compatível com LV, um teste rápido positivo confirmaria o diagnóstico. Contudo, caso o exame fosse negativo, não se poderia afastar com segurança a doença (World Health Organization, 2011b).

Estudo brasileiro multicêntrico que avaliou o teste Diamed-IT Leish® também evidenciou boa acurácia deste, com sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 93, 97, 98 e 89%, respectivamente (de Assis et al., 2011). Diante de tais dados, o MS, em sua publicação mais recente sobre o tema, incluiu o teste rápido como exame confirmatório em casos suspeitos de LV (Brasil, 2011b). Como não há produção nacional de kits de teste rápido, o MS adquiriu kits da marca Kalazar Detect® (InBios International Inc.) por US\$2,00/kit (M. Arruda, MS - comunicação pessoal). O custo de compra do Diamed-IT Leish® fica em torno de R\$15,00/kit (G. Santos, representante Diamed – comunicação pessoal).

Todos os exames de detecção de anticorpos específicos apresentam três limitações com impacto significativo em sua aplicação clínica. A primeira é a positividade destes testes em pacientes assintomáticos residentes em áreas endêmicas, evidenciando contato anterior ou infecção assintomática pelo parasito. A segunda é a persistência de anticorpos após resolução da doença, o que faz com que a sorologia não possa ser utilizada para diagnóstico em suspeita de recidivas. A terceira é sua sensibilidade baixa em imunossuprimidos, população afetada pelas leishmanioses de modo crescente nos últimos anos (Alvar et al., 2008; World Health Organization, 2010).

Devido às limitações dos exames que utilizam anticorpos específicos e visando detectar a presença do parasito por meio de métodos menos invasivos, técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para avaliação da existência de

seu material genético em diferentes amostras biológicas (Antinori et al., 2007; Assis et al., 2009; Vaish et al., 2011).

A reação em cadeia da polimerase - do inglês, *polymerase chain reaction* (PCR) - é o método molecular mais usado. Consiste na amplificação de alvos gênicos a partir da ação de enzima DNA-polimerase termoestável, na presença de par de iniciadores - do inglês, *primers*. Tais iniciadores são oligonucleotídeos com sequência complementar ao alvo gênico e, por meio de sua extensão, pequenas quantidades do DNA do parasito podem ser detectadas (Rodrigues et al., 2006).

Várias sequências são utilizadas como alvo para PCR, como genes do RNA ribossomal (rRNA), de minicírculos do cinetoplasto (kDNA), de RNA derivado de mini-exon (medRNA) e *GP63*. *In vitro*, todos apresentam sensibilidades elevadas, com capacidade de detecção de menos de dez parasitos (Rodgers et al., 1990; van Eys et al., 1992; Hassan et al., 1993; Tupperwar et al., 2008).

Em amostras de pacientes com quadro sugestivo de LV, a PCR em amostras de sangue periférico e de MO apresenta boa acurácia, com sensibilidade superior a dos métodos parasitológicos convencionais nestes mesmos espécimes e especificidade próxima a 100% (Lachaud et al., 2000; Antinori et al., 2007; Fraga et al., 2010).

A quantificação da carga parasitária vem sendo realizada por métodos de microscopia e imuno-histoquímica nas últimas décadas, levando-se em consideração sua possível importância na patogenia da LV. Em estudo realizado no Ceará, houve associação positiva entre carga parasitária moderada ou alta, mensurada microscopicamente em aspirado de MO, e neutropenia em sangue periférico (Castro et al., 2011). Por meio desta mesma técnica, observou-se tendência semelhante em pacientes do Piauí, nos quais contagem de neutrófilos acima de 5.000 células/mm³ relacionou-se a menor carga parasitária, enquanto maior número de parasitos associou-se a anemia grave (Costa et al., 2010). Contudo, tais métodos apresentam limitações pela irregularidade da distribuição dos parasitos nas amostras biológicas e pelo tempo excessivo exigido para sua análise (Reis, et al., 2006; Giunchetti et al., 2008).

Neste contexto, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) possibilita a quantificação parasitária de maneira mais fidedigna em diferentes amostras. O monitoramento da amplificação de sequências específicas de DNA ocorre na medida em que a reação procede, fornecendo resultado mais rápido e com menor risco de

falso positivo por contaminação, já que é realizada em sistema fechado (Wortmann et al., 2001; Kubista et al., 2006; Marques, 2010).

Há diferentes sistemas para detecção dos *amplicons* formados na reação. No sistema Taqman, sondas de hidrólise com corantes fluorescentes se anelam aos iniciadores, são clivadas e levam a aumento da intensidade de fluorescência proporcional a quantidade de *amplicon* produzido (Wortmann et al., 2001). Outro sistema é o SYBR® Green I, que utiliza corante de mesmo nome para detectar a formação de fragmentos gênicos. Tem como desvantagem a possibilidade de ligação do corante a qualquer DNA dupla fita, gerando sinais falso positivos (Kubista et al., 2006).

O ciclo em que o sinal de amplificação atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção, geralmente pré-determinado pelo aparelho, é denominado Ct - do inglês, *cycle threshold*. O momento em que o Ct é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de material amplificado, sendo que, em amostras com DNA alvo em maior quantidade, um menor número de ciclos é necessário para se atingir o limiar estipulado (Kubista et al., 2006).

A sensibilidade do ensaio é dependente do alvo escolhido. Utilizando-se a sequência gênica que codifica a DNA polimerase da *Leishmania*, presente em cópia única no genoma, há perda de sensibilidade para diagnóstico inicial. Em técnicas empregando o kDNA, a sensibilidade para diagnóstico inicial parece ser a mais elevada, uma vez este gene está presente em aproximadamente 1.000 cópias por célula. Contudo, sua heterogeneidade pode ser fator limitante à sua quantificação (Antinori et al., 2007; Mary et al., 2004).

A sequência que codifica a pequena subunidade de RNA ribossomal – do inglês, *small subunit rRNA* (SSU rRNA) – é outro alvo que vem sendo utilizado na qPCR. O DNA nuclear da *Leishmania* contém aproximadamente 160 cópias deste gene, o que confere alta sensibilidade aos ensaios. Possui também a vantagem de ser pouco variável, mas não diferencia a espécie da *Leishmania* identificada (van Eys et al., 1992).

Para avaliação da carga parasitária em leishmaniose, a qPCR foi utilizada inicialmente em modelos animais, visando estudos experimentais para drogas (Bretagne et al., 2001).

Em cães, já se evidenciou que cargas parasitárias mais altas, mensuradas através do qPCR, estão relacionadas a quadro clínico mais grave em animais doentes (Rodríguez-Cortés et al., 2007; Manna et al., 2009). Contudo, a relação

entre maiores quantidades de parasitos e evolução para doença em cães infectados inicialmente assintomáticos ainda é controversa. Outros estudos não observaram diferenças significativas entre carga parasitária de animais sintomáticos e assintomáticos, inclusive com descrição de maior número de parasitos na pele daqueles sem sinais de doença (Manna et al., 2006; Quaresma et al., 2009). Foi demonstrada a redução importante da carga parasitária em diversos tecidos de cães após tratamento com droga leishmanicida eficaz, apesar de esta se manter detectável em alguns animais (Manna et al., 2008a; Manna et al., 2008b).

Em humanos, a qPCR vem sendo utilizada para avaliação da dinâmica da infecção em situações diversas. Observa-se grande variação da parasitemia ao diagnóstico inicial da LV. A carga em doentes é superior à dos indivíduos assintomáticos, diferentemente do relatado para cães (Bossolasco et al., 2003; Mary et al., 2006; Aoun et al., 2009; Marques, 2010).

Correlação do número de parasitos com parâmetros imunológicos, principalmente níveis teciduais e séricos de citocinas, também vem sendo estudada nas diferentes apresentações das leishmanioses, no intuito de melhor compreensão da sua patogenia (Kumar et al., 2009; Verma et al., 2010).

Redução significativa do material genético do parasito foi observada após administração de diferentes esquemas terapêuticos para LV (Mary et al., 2006; Antinori et al., 2009; Aoun et al., 2009; Sudarshan et al., 2011). Apesar da necessidade de estudos mais completos, a relevância da quantificação da carga parasitária em pacientes imunossuprimidos é bem descrita. Tal relevância refere-se principalmente ao acompanhamento após tratamento da doença, uma vez que se observa aumento do material genético do parasito prévio à recidiva do quadro, evento frequente nesta população (Bossolasco et al., 2003; Mary et al., 2006).

1.5 Tratamento específico

A escolha de esquemas terapêuticos para LV varia de acordo com a apresentação clínica da doença, as contraindicações dos medicamentos e as orientações do local de onde provém o paciente, que dependem, por sua vez, da espécie de *Leishmania* envolvida e de seu padrão de resistência às medicações.

No Brasil, o MS sugere o uso do antimoniato de meglumina (Glucantime®) como medicamento de primeira escolha, uma vez que apresenta eficácia terapêutica comprovada (Brasil, 2006a). Em sua última publicação, o MS estendeu o tempo

mínimo de tratamento com Glucantime® para 30 dias, com dose diária de 20 mg/kg, seguindo orientação da OMS (World Health Organization, 2010; Brasil, 2011b). Tal mudança é embasada na observação da situação atual da Índia e de algumas áreas do Nepal, onde o uso irregular ou incompleto de esquemas mais curtos de antimoniais levou a taxas de falha com esta medicação superiores a 60% (Sundar et al., 2000; Bern et al., 2006). Devem ser considerados, ainda, os efeitos colaterais do antimonial, sendo os principais a cardiotoxicidade e a pancreatite (Thakur, Sinha, Pandey, Kumar, Kumar, Hassan, et al., 1998; Rigo, Rigo, Honer, 2008).

As contraindicações para uso de antimonial pentavalente são: insuficiência renal, insuficiência hepática, insuficiência cardíaca, uso concomitante de medicamentos que alteram o intervalo QT corrigido, gravidez, idade maior de 50 anos e hipersensibilidade aos componentes da formulação (Brasil, 2011b).

Caso estas contraindicações estejam presentes, indica-se a administração de anfotericina B desoxicolato, que também deve ser a escolha para pacientes com sinais de gravidade (idade inferior a seis meses ou superior a 65 anos, desnutrição grave, presença de comorbidades, icterícia, fenômenos hemorrágicos, edema generalizado ou sinais de toxemia) (Brasil, 2006b).

A anfotericina B é o medicamento com maior potencial leishmanicida e sua formulação mais usualmente utilizada é o desoxicolato (Maltezou, 2010). O MS sugere uso de dose diária de 1mg/kg por 14 a 20 dias e a orientação da OMS é administração desta mesma dose por período mais prolongado, de 20 a 30 dias (World Health Organization, 2010; Brasil, 2011b). A anfotericina B desoxicolato está contraindicada em casos de insuficiência renal e hipersensibilidade a componentes da formulação, tendo como principais efeitos colaterais tremores, calafrios e febre, durante sua infusão, e nefrotoxicidade associada à hipocalcemia e hipomagnesemia (Brasil, 2011b). Com o objetivo de diminuir a frequência dessas últimas intercorrências, estudo indiano evidenciou que a infusão diária de solução salina acrescida de cloreto de potássio em pacientes em tratamento com anfotericina B desoxicolato diminuiu significativamente o risco de alteração da função renal e dos níveis séricos de potássio durante o tratamento com anfotericina B desoxicolato (Thakur et al., 2010).

Em pacientes com insuficiência renal previamente conhecida ou que evoluem com esta complicação após instituição do tratamento, o MS indica formalmente a administração de anfotericina B lipossomal. Apesar da escassez de publicações, recomenda-se prescrever esta medicação também a pacientes maiores

de 50 anos, transplantados renais, cardíacos ou hepáticos, nas doses diárias de 3mg/kg por sete dias ou 4mg/kg por cinco dias (Brasil, 2011b). Sugere-se que melhor penetração e maior permanência tecidual sejam obtidas com doses iniciais mais elevadas, a partir de 5mg/kg/dia (Bern et al., 2006), o que deve motivar rediscussão da posologia da anfotericina B lipossomal proposta no Brasil.

Estudos brasileiros com outras formulações lipídicas da anfotericina B (complexo lipídico e dispersão coloidal) e com medicamentos mais recentemente aplicados no tratamento de LV, como a miltefosina e a paramomicina, ainda são necessários para avaliar suas indicações na doença por *L. (L.) infantum*.

Uma nova perspectiva, já estudada na Índia, é a administração de dose única de anfotericina B lipossomal (10mg/kg), que se mostrou não inferior a tratamento convencional com anfotericina B desoxicolato (Sundar et al., 2010). Está em andamento investigação semelhante em países do leste africano (Edwards et al., 2011).

A utilização de esquemas terapêuticos combinados tem sido avaliada em várias áreas endêmicas, visando aumento da eficácia e da tolerância dos medicamentos, redução da duração e de custos do tratamento e limitação da emergência de resistência do parasito (van Griensven et al., 2010). Estudos na Índia já evidenciaram que diferentes associações de drogas são eficazes, seguras e apresentam melhor relação custo-benefício do que monoterapias (Sundar et al., 2011; Meheus et al., 2010).

Foi iniciada, em 2011, pesquisa denominada LV Brasil, o primeiro estudo multicêntrico nacional com a finalidade de avaliar a eficácia e a segurança da farmacoterapia da LV, como monoterapia ou em combinação. Consiste em ensaio clínico aberto, randomizado, no qual os seguintes esquemas serão comparados: Glucantime® (administração endovenosa por 20 dias), anfotericina B desoxicolato (por 14 dias), anfotericina B lipossomal (por sete dias) e associação de anfotericina B lipossomal (dose única) e Glucantime® (administração endovenosa por 10 dias). Os resultados deste estudo serão essenciais à indicação de tratamento mais adequado aos quadros de LV no país.

1.6 Fatores preditores de prognóstico

Diante da gravidade da doença, com potencial evolução para óbito, busca-se definir fatores preditores de falha terapêutica, recidiva e óbito, que possam

direcionar mais adequadamente a atenção prestada aos pacientes. Em locais onde o acesso a exames laboratoriais mais complexos é restrito, como na maior parte dos países onde a LV é endêmica, aspectos clínicos e propedêutica básica têm sido o foco dos estudos de determinantes de gravidade.

As diferentes definições de melhora e cura devem ser levadas em consideração na análise dos fatores de risco para falência do tratamento. A OMS propõe cura inicial da LV como melhora ao fim do tratamento e cura definitiva como ausência de recidiva em seis meses, o que é corroborado pelo MS (World Health Organization, 2010; Brasil, 2011b). Ainda de acordo com o MS, o controle parasitológico é considerado dispensável (Brasil, 2011b), mas estudos têm utilizado a presença de *Leishmania* em aspirados de MO e de baço para avaliar falha terapêutica (Rijal et al., 2010; Kajaia et al., 2011).

Apesar de ainda ser a droga de escolha em muitos países, inclusive no Brasil, os antimoniais vêm apresentando taxas crescentes de resistência, secundária a fatores relacionados à própria medicação, ao parasito e também aos doentes (Sundar et al., 2000). Estudo no Nepal identificou febre de duração superior a 12 semanas, proximidade de regiões indianas com transmissão de *L. (L.) donovani* com alta taxa de resistência, interrupção do tratamento e administração da medicação em atenção ambulatorial como fatores de risco para falha do esquema terapêutico com estibogluconato de sódio (Rijal et al., 2010). No Piauí, resposta insatisfatória a tratamento com Glucantime® foi observada mais frequentemente em pacientes menores de 10 anos e naqueles com infecção bacteriana concomitante a LV (Santos et al., 2002).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular proporcionou perspectivas novas no acompanhamento de pacientes com LV. Sugeriu-se que a negatificação da PCR ao término do tratamento estaria associada à resposta terapêutica adequada (Osman et al., 1998; Disch et al., 2004; Maurya et al., 2005; Salam et al., 2010). Contudo, há relatos de detecção persistente de material genético do parasito em pacientes imunocompetentes clinicamente curados, após meses do término do tratamento (Cruz et al., 2006). No entanto, questiona-se a possibilidade real de realização deste tipo de exame em doentes com LV, considerando-se o custo elevado e a complexidade de sua execução como fatores limitantes à sua oferta.

Em pacientes curados após administração de tratamento inicial com antimonial, as chances de recidiva foram maiores naqueles menores de um ano,

com diagnóstico após mais de 90 dias de sintomas ou com anemia grave em estudo na Geórgia (Kajaia et al., 2011). Observou-se que esplenomegalia volumosa à alta na primeira internação e tratamento com a associação de antimonial e paramomicina por 17 dias, em detrimento à administração somente de antimonial por 30 dias, estiveram associados à recidiva de LV no Sudão. A influência da terapêutica inicial ainda precisa ser esclarecida, uma vez que a taxa de letalidade foi reduzida após introdução do esquema combinado (Gorski et al., 2010). Contudo, a duração prolongada da doença, refletida na maioria destes fatores, provavelmente favorece o reaparecimento do quadro após cura inicial.

Na África, desnutrição, anemia grave, vômitos, diarreia e extremos de idade (crianças menores de dez anos e adultos maiores de 40 anos) foram associados a óbito (Seaman et al., 1996; Lyons et al., 2003; Collin et al., 2004; Mueller et al., 2009). No Sudão, observou-se que densidade parasitária alta em aspirado esplênico também consistiu em risco para evolução fatal de LV (Seaman et al., 1996). Na Etiópia, a parcela dos doentes mais sujeita a óbito foram aqueles coinfectados pelo HIV (Lyons et al., 2003). Em estudo retrospectivo em Uganda, associou-se coinfeção com tuberculose, hepatopatia manifestada por meio de icterícia e presença de antígenos do vírus da hepatite B no sangue e efeitos adversos da medicação com maior risco de morte (Mueller et al., 2009).

No Piauí, foram relatados anemia grave, episódios de diarreia, febre de longa duração (acima de 60 dias) e icterícia como fatores prognósticos para êxito letal (Werneck et al., 2003). Em estudo posterior neste mesmo estado, associou-se óbito a idade menor do que um ou maior do que 40 anos, vômitos, história de sangramento, dispnéia, icterícia, edema, coinfeção pelo HIV, leucocitose, neutropenia grave ou neutrofilia (Costa et al, 2010).

Em estudos pediátricos no Brasil, várias destas características também foram descritas mais frequentemente nos pacientes que evoluíram para óbito. Dentre elas, destacam-se idade inferior a um ano, desnutrição, icterícia, hemorragias, edema, infecção concomitante, dispnéia, plaquetopenia e neutropenia grave (Rey et al., 2005; Sampaio et al., 2010).

Observa-se espectro amplo de apresentações clínicas e laboratoriais que sugerem maior risco de evolução fatal. Entretanto, a letalidade por LV persiste elevada no Brasil, a despeito do conhecimento destas características (Brasil, 2011b). Deste modo, é necessária a identificação de um conjunto de fatores de risco sensíveis e, ao mesmo tempo, específicos, para que os pacientes mais graves

sejam prontamente reconhecidos e as medidas de suporte necessárias sejam tomadas em tempo oportuno. Devem-se considerar, ainda, diferenças regionais na apresentação e evolução distinta da doença entre as faixas etárias na formulação destes parâmetros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Correlacionar parâmetros clínicos e laboratoriais e carga parasitária em sangue periférico com a evolução da LV em crianças.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever a apresentação e a evolução de parâmetros clínicos e laboratoriais em crianças portadoras de LV.
- Aplicar a classificação de gravidade e o escore de predição para óbito, propostos pelo MS, em crianças portadoras de LV.
- Mensurar a carga parasitária em sangue periférico de crianças portadoras de LV antes, durante e após tratamento específico.
- Correlacionar a carga parasitária em sangue periférico de crianças portadoras de LV com parâmetros clínicos e laboratoriais da doença, critérios de gravidade, escores de predição de óbito e evolução.
- Identificar fatores de risco para evolução grave da LV em crianças.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no Hospital Infantil João Paulo II (HIJPII) da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), unidade pública do estado exclusiva para atendimento pediátrico. Situado em BH, é considerado instituição de ensino devido à oferta de estágios para grande número de estudantes de graduação na área de saúde e à existência de residências médicas em pediatria e em áreas de atuação pediátrica, que oferecem cerca de 23 novas vagas anualmente.

O HIJPII conta com 184 leitos para internação hospitalar, atendendo a urgências e emergências clínicas. É referência para o estado de MG, com unidade de internação de 45 leitos para pacientes com doenças infecciosas. Há também ambulatório de urgência específico para quadros infecciosos, onde são atendidos, em média, 90 pacientes por mês e, destes, 50% são hospitalizados. Entre 2007 e 2011, os números de internações de crianças com diagnóstico confirmado de LV em cada ano foram 53, 78, 64, 44 e 31, respectivamente (Aline Fonseca, Núcleo Hospitalar de Epidemiologia, HIJPII – comunicação pessoal).

3.2 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo de coorte prospectivo que teve como população alvo crianças internadas por LV no Hospital Infantil João Paulo II (HIJPII) entre junho de 2010 e junho de 2011. As características demográficas, clínicas e laboratoriais e a carga parasitária observadas à admissão foram consideradas “fatores de exposição” e a evolução grave ao longo da internação hospitalar foi avaliada como “desfecho”.

3.3 Critérios e definições

3.3.1 Casos suspeitos e confirmados

Foram considerados casos suspeitos de LV os pacientes provenientes de área endêmica com febre, associada a hepatomegalia ou esplenomegalia.

Definiram-se como casos confirmados de LV aqueles pacientes suspeitos de LV, com um ou mais dos seguintes exames laboratoriais com resultado positivo:

- pesquisa direta de amastigotas no esfregaço de MO;
- cultura de promastigotas a partir do aspirado de MO;
- amplificação da região conservada do k-DNA de *Leishmania* de aspirado da MO ou sangue periférico (reação em cadeia de polimerase – PCR);
- reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em sangue periférico com título igual ou superior a 1:80;
- teste imunocromatográfico de antígeno rk39 em sangue periférico.

3.3.2 Critérios de inclusão e exclusão

No estudo, foram incluídas crianças de até 12 anos de idade, internadas no HIJPII e que preencheram a definição de caso confirmado de LV.

Foram excluídos do estudo os pacientes com idade acima de 12 anos e que haviam recebido algum tipo de medicação específica para LV (Glucantime® ou anfotericina B desoxicolato ou anfotericina B lipossomal) antes da realização da primeira avaliação clínica.

3.3.3 Definições clínicas e laboratoriais

O *tempo de aparecimento de sintomas* foi o intervalo, em dias, entre o relato do primeiro sintoma, independentemente de qual fosse, e a avaliação inicial.

Edema foi considerado como presença deste sinal em no mínimo um sítio e *edema generalizado* como aquele presente em dois ou mais locais.

Taquidispneia foi observada quando a criança apresentava frequência respiratória acima do limite para sua faixa etária (Singh, Aneja, 2011) (Tabela 1) ou qualquer sinal de esforço respiratório, como batimento de asas de nariz, tiragem intercostal, tiragem subdiafragmática e balanço toraco-abdominal.

Tabela 1 - Limites de normalidade de frequência respiratória por faixa etária

Faixa etária	Limite de Frequência Respiratória (incursões por minuto)
Menor de 2 meses	60
2 meses a 12 meses	50
1 a 4 anos	40
Maior de 4 anos	30

Sinal de má perfusão foi diagnosticado se observado tempo de reperfusão periférica superior a dois segundos.

A medida do fígado foi realizada a partir do rebordo costal direito (RCD), na linha hemiclavicular direita, e a do baço a partir do rebordo costal esquerdo (RCE), na linha hemiclavicular esquerda, sempre com o paciente em decúbito dorsal. *Hepatomegalia* foi considerada como fígado palpável além de dois centímetros do RCD em crianças menores de dois anos e acima de um centímetro nas demais faixas etárias. *Esplenomegalia* foi definida como baço palpável além de um centímetro do RCE em menores de um ano e com qualquer dimensão nas demais idades (Martins, Carvalho, 2005).

Nas dimensões utilizadas para definir hepatomegalia e esplenomegalia, considerou-se a medida absoluta (não ajustada) do tamanho das vísceras. Para cálculo das médias de tamanho de fígado e baço e comparações entre estas, optou-se por utilizar valor ajustado pela superfície corporal (SC) devido à variação muito grande de peso e estatura das crianças incluídas no estudo, conforme já descrito na literatura (Costa et al., 2009). O ajuste foi realizado dividindo-se a medida da víscera, em centímetros, pelo valor da SC do paciente. A SC do paciente foi calculada a partir da fórmula: $SC = [(peso \cdot 4) + 7] / (peso + 90)$, com a medida do peso em quilogramas (Wang et al., 1992).

Na avaliação clínica realizada entre 10 e 15 dias após início do tratamento (T1), as crianças não foram pesadas. Para cálculo da SC neste momento, utilizou-se o valor obtido na avaliação inicial.

Para caracterizar o estado nutricional dos pacientes, foi adaptado o critério proposto pela OMS (World Health Organization, 1999; World Health Organization and United Nations Children's Fund, 2009). Naqueles menores de 60 meses, diagnosticou-se *desnutrição grave* se a relação peso altura estivesse abaixo de três desvios-padrão e *desnutrição moderada* caso esta medida estivesse entre menos dois e três desvios-padrão. Para as crianças com idade superior a cinco anos, foi considerado *desnutrido grave* aquele com índice de massa corporal (IMC) menor do

que três desvios-padrão e *desnutrido moderado* aquele com IMC entre menos dois e três desvios-padrão. *Baixa estatura grave* foi constatada nas crianças com relação estatura idade abaixo de três desvios-padrão e *baixa estatura moderada* naquelas com esta medida entre menos dois ou três desvios-padrão.

Os valores de referência utilizados para análise dos exames laboratoriais foram os fornecidos pelo laboratório do HIJPII, local onde eles foram realizados (Anexo 1).

Para avaliação da função renal, calculou-se o *clearance* de creatinina a partir da fórmula: altura*k/creatinina sérica, com medida da altura em centímetros, o k equivalente a 0,55 (constante utilizada para crianças) e a creatinina sérica com valor em mg/dL. Considerou-se como *insuficiência renal* valor de *clearance* de creatinina inferior a 60 mL/min/1,73m² (Vogt, Avner, 2007).

Dentre os fatores descritos para contraindicação de Glucantime® ou para decisão de troca de medicamento, *gravidade clínica* foi considerada presença de sinais de gravidade, conforme proposto pelo MS (Brasil, 2006b). Em alguns poucos pacientes, a contraindicação de Glucantime® como terapêutica inicial ou decisão de troca de medicação foram definidas unicamente por orientação da equipe assistencial e, nestes casos, tais condutas foram também enquadradas na categoria de *gravidade clínica*. *Alterações em exames de função hepática* foram entendidas como valores de aminotransferases hepáticas superiores a cinco vezes o limite superior da referência e *alterações do eletrocardiograma* foram consideradas como anormalidades deste exame para a idade, especialmente prolongamento do intervalo QT corrigido com valor superior a 0,45 segundos (Bernstein, 2007).

Como *tratamento efetivo*, foi considerado aquele administrado por último (após troca de medicação), uma vez que somente este foi realizado de maneira completa.

A *resolução da febre* foi definida como intervalo mínimo de 24 horas sem ocorrência de picos febris, após início de tratamento específico para LV.

Os quadros de *infecção bacteriana* foram constatados a partir da definição deste diagnóstico pela equipe assistencial, com introdução de tratamento com antimicrobiano. Considerou-se *infecção à admissão* o quadro diagnosticado até 72 horas após a entrada do paciente no hospital e *infecção hospitalar* aquela detectada após este período.

Neutropenia febril foi definida como introdução de antibiótico de amplo espectro na presença de febre e contagem de neutrófilos inferior a 500 cél/mm³ ou,

em alguns casos, mesmo com neutropenia menos grave, mas associada a acometimento mais intenso do estado geral do paciente, ainda que na ausência de comprovação microbiológica. *Pneumonia* foi diagnosticada em crianças com febre, sinais e sintomas respiratórios, em especial tosse e taquidispneia, e com radiografia de tórax com imagem sugestiva de alteração de etiologia bacteriana, nas quais foi administrado antimicrobiano. A *infecção do trato urinário (ITU)* foi observada nos casos com febre e urocultura positiva (crescimento acima de 10^5 unidades formadoras de colônia/mL) em que tratamento com antibiótico foi instituído. As infecções nos demais sítios – *vias aéreas superiores (IVAS)*, *infecção de pele e flebite* – foram definidas com base em dados clínicos sugestivos, diante de tratamento antimicrobiano efetivo.

Sangramento digestivo foi caracterizado em casos de hematêmese, melena ou enterorragia. *Sangramento respiratório* foi definido em casos de hemoptise. *Gengivorragia* e *epistaxe* não foram considerados como sangramentos digestivos e respiratórios, respectivamente, sendo classificadas à parte. *Sangramento de trato urinário* foi diagnosticado a partir da presença de mais de dez hemácias por campo em análise de sedimento urinário. *Petéquias* e *equimoses* foram também denominadas de sangramentos cutâneos.

Melhora clínica ao final do acompanhamento foi definida como resolução de febre, melhora do estado geral e redução de visceromegalias.

3.3.4 Critérios de gravidade e escores preditores de óbito

A classificação de gravidade proposta pelo MS em seu manual de 2006 (denominada neste estudo de MS-2006) foi aplicada aos pacientes incluídos no estudo, considerando o quadro clínico da admissão. Como pacientes graves, foram classificados os lactentes com idade inferior a seis meses, os desnutridos graves, os pacientes ictericos, os com edema generalizado e aqueles com fenômenos hemorrágicos exceto epistaxe. (Brasil, 2006b).

O escore preditor de óbito, presente no Manual do MS publicado em 2011 (denominado neste estudo de MS-2011), também foi utilizado para caracterização da coorte estudada. O escore propõe pontuação diferenciada para maiores e menores de dois anos. Há, ainda, um modelo clínico e outro clínico e laboratorial para cada faixa etária, visando classificação de todos os pacientes, mesmo na

ausência de propedêutica laboratorial. Todo paciente que atingir quatro pontos ou mais no modelo clínico ou seis pontos ou mais no modelo clínico e laboratorial apresenta risco aumentado de evoluir para óbito (Tabelas 2 e 3) (Brasil, 2011b).

Tabela 2 - Escore preditor de óbito proposto pelo MS (MS-2011) para pessoas com idade acima de dois anos

Variável	Peso no modelo clínico	Peso no modelo clínico e laboratorial
Idade		
2 – 20 anos	-	-
20 – 40 anos	1	1
> 40 anos	2	2
Sangramento		
1 – 2 sítios	1	1
3 – 4 sítios	2	2
5 – 6 sítios	3	3
Aids	2	3
Edema	1	1
Icterícia	1	1
Dispneia	1	1
Infecção bacteriana	1	1
Leucócitos < 1.500/mm ³	-	2
Plaquetas < 50.000/ mm ³	-	3
Insuficiência renal	-	3
Pontuação máxima	11	20

Tabela 3 - Escore preditor de óbito proposto pelo MS (MS-2011) para lactentes com idade menor de dois anos

Variável	Peso no modelo clínico	Peso no modelo clínico e laboratorial
Idade		
< 12 meses	1	1
> 12 meses	-	-
Sangramento		
1 – 2 sítios	1	1
3 – 4 sítios	2	2
5 – 6 sítios	4	4
Edema	1	2
Icterícia	1	-
Dispneia	1	1
AST ou ALT > 100 UI/L	-	3
Pontuação máxima	8	11

Priorizou-se a aplicação dos modelos clínicos e laboratoriais para as duas faixas etárias, sendo empregado o modelo clínico somente quando os exames utilizados como critérios não haviam sido realizados à admissão hospitalar.

Outro escore preditor de evolução fatal aplicado nas crianças do estudo foi o proposto por Sampaio et al., direcionado especificamente para menores de 15 anos

(Tabela 4). Considerou-se como risco para óbito a pontuação igual ou superior a três pontos (Sampaio et al., 2010).

Tabela 4 - Escore preditor de óbito proposto por Sampaio et al. para crianças menores de 15 anos

Variável	Pontuação
Dispneia	1
Infecção associada	1
Neutrófilos < 500/mm ³	1
Icterícia	2
Sangramento de mucosa	2
Plaquetas < 50.000/ mm ³	3

3.3.5 Definição de evolução grave

Foi considerado paciente com evolução grave todo aquele que exigiu, no mínimo, uma das seguintes intervenções: internação em unidade de terapia intensiva (UTI), administração de aminas vasoativas, ventilação mecânica (VM) ou transfusão de algum tipo de hemoderivado (concentrado de hemácias, plaquetas ou plasma fresco concentrado).

Diante da conduta do serviço de não estabelecer valores pré-definidos indicativos de hemotransfusão, entendeu-se que apenas pacientes mais graves necessitariam desta medida e, por isso, incluiu-se esta intervenção na definição de evolução grave.

3.3.6 Fatores de risco para evolução grave

Foram avaliadas, como fatores de risco para evolução grave, características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes, além da carga parasitária.

Para as variáveis contínuas que já haviam sido descritas como fatores associados a maior risco de óbito no último manual do MS (Brasil, 2011b) e na literatura (Sampaio et al., 2010), utilizaram-se como pontos de corte os valores empregados nestas publicações. Com relação à dimensão do fígado e do baço, tamanho superior a 10 centímetros, com medida ajustada pela SC, foi considerado como ponto de corte.

Quando mensurada por métodos de biologia molecular, a carga parasitária em sangue periférico não possui limites claros sobre valores definidos como altos ou baixos, devendo-se considerar, ainda, as variações de alvos gênicos e métodos de normalização empregados nos diferentes estudos. Deste modo, optou-se por definir dois pontos de corte - carga maior ou igual a três $\log_{10} +1$ e carga maior ou igual a quatro $\log_{10} +1$ - para avaliar o número de cópias de SSU rRNA como fator de risco para evolução grave.

3.4 Propedêutica e tratamento específico

À admissão no HIJPII, os pacientes suspeitos de LV foram submetidos à coleta de sangue periférico para realização de RIFI e testes imunocromatográficos (Kalazar Detect® e Diamed-IT Leish®). O teste Kalazar Detect®, fornecido ao hospital pela prefeitura de BH desde maio de 2010, é empregado na rotina da investigação de doença. A utilização do teste Diamed-IT Leish® foi realizada no presente estudo.

Após um resultado de teste rápido positivo e/ou resultado da RIFI positivo em título igual ou superior a 1:80, era iniciada medicação específica para LV, conforme orientado pela equipe médica assistente, nas doses preconizadas pelo MS, ou de acordo com randomização do Projeto LV Brasil (Brasil, 2006b; Brasil, 2011b).

Quando os testes de pesquisa de anticorpos específicos foram negativos, ou, em alguns casos, quando apresentaram resultados discordantes, procedeu-se à coleta de aspirado de MO para pesquisa direta de amastigotas ou à coleta de sangue periférico para realização de PCR convencional.

Para aqueles pacientes que apresentaram amastigotas visualizados ao exame direto do aspirado de MO ou detecção de material genético do parasito em sangue periférico também foi iniciado tratamento específico para LV, conforme orientado pela equipe médica assistente ou de acordo com randomização do Projeto LV Brasil.

3.5 Projeto de pesquisa LV Brasil

Desde março de 2011, o HIJPII participa do estudo multicêntrico LV Brasil, cujo objetivo é avaliar a eficácia e a segurança da farmacoterapia para LV, utilizada como monoterapia ou em esquema de combinação. São critérios de inclusão: idade maior do que seis meses e menor do que 50 anos, caso confirmado de LV e concordância com participação voluntária na pesquisa. São definidos como critérios de exclusão: gravidez, infecção pelo HIV, doenças crônicas ou agudas que interfiram na evolução do quadro, comorbidades que levem à disfunção imune, uso de medicações que interfiram na resposta terapêutica ou causem interações medicamentosas prejudiciais, dependência química, hipersensibilidade a fármacos em teste, condições que impeçam acompanhamento adequado, recidiva de LV, encefalopatia hepática, edema generalizado, toxemia, desnutrição grave, icterícia, creatinina acima do valor de referência para a idade, razão normalizada internacional (RNI) menor do que dois, bilirrubina acima do limite superior da normalidade e plaquetas menores do que 20.000/mm³.

A propedêutica realizada neste estudo é mais ampla do que a proposta pela rotina do hospital para casos suspeitos de LV, incluindo, além do teste rápido Kalazar Detect®, a pesquisa direta de parasitos em aspirado de MO, cultura de promastigotas neste material e realização de PCR em sangue periférico e em amostra de MO em todos os pacientes.

O tratamento a ser administrado nos pacientes incluídos no estudo é definido por randomização. As quatro possibilidades de esquemas terapêuticos são: 20 dias de Glucantime® por via endovenosa (20mg/kg/dia), 14 dias de anfotericina B desoxicolato (1mg/kg/dia), sete dias de anfotericina B lipossomal (3mg/kg/dia) ou combinação de um dia de anfotericina B lipossomal (10mg/kg/dia) e dez dias de Glucantime® (20mg/kg/dia).

Algumas das crianças incluídas no presente estudo também participaram do projeto LV Brasil, sendo, deste modo, submetidas à propedêutica e ao tratamento conforme as orientações deste último.

3.6 Acompanhamento clínico, exames laboratoriais e coleta de amostras para quantificação da carga parasitária

No momento da inclusão (chamado T0), sempre antes do início de tratamento específico para LV, os pacientes foram submetidos à avaliação clínica

minuciosa – incluindo anamnese e exame físico – e iniciou-se o preenchimento da ficha de acompanhamento clínica e laboratorial.

Avaliações clínicas foram repetidas entre 10 e 15 dias (T1) e novamente entre 40 e 60 dias (T2) após o início do tratamento. Nos casos em que o paciente já havia recebido alta em algum destes dois momentos, foi realizado contato telefônico e agendada consulta no ambulatório de urgência em doenças infecciosas do HIJPII. Os exames clínicos foram realizados, em sua grande maioria, pelo mesmo profissional médico responsável pela pesquisa.

Os exames laboratoriais – hemograma, atividade de protrombina, aminotransferases oxalacética (AST) e pirúvica (ALT), bilirrubina total e albumina e globulina séricas – foram solicitados a critério da equipe médica assistente e realizados por meio das técnicas padronizadas (Anexo 1). Foram anotados, na ficha de acompanhamento clínica e laboratorial, os resultados dos exames realizados à admissão hospitalar, após uma semana de internação e os com a data mais próxima da alta, sempre precedente a esta. Para análises e comparações, contudo, consideraram-se apenas os exames da admissão e alta hospitalares.

Na mesma ficha, foram relatados, além das informações sobre as avaliações clínicas e exames laboratoriais, dados sobre o tratamento para LV, tratamentos complementares e complicações observadas durante a evolução do paciente. Os prontuários médicos foram pesquisados de modo a complementar as informações obtidas.

Foram obtidas amostras de sangue periférico dos pacientes para quantificação de DNA de *Leishmania* nos mesmos três momentos em que foram realizadas as avaliações clínicas: à inclusão do paciente no estudo (T0), entre 10 e 15 dias (T1) e entre 40 e 60 dias (T2) após início do tratamento específico. Em cada tempo, foram coletados quatro mL sangue periférico de cada criança em tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), por meio de técnica adequada.

3.7 Cálculo da amostra

Foram avaliados os casos suspeitos de LV hospitalizados de junho de 2010 a junho de 2011 no HIJPII e incluídos todos os pacientes que preencheram os critérios previamente determinados.

3.8 Análises estatísticas

As informações coletadas nas fichas clínicas foram inseridas, através do programa Teleform® (Autonomy Cardiff - San Diego, CA, USA), em banco de dados no programa SPSS® 14.0 (IBM Corporation - New York, NY, USA). Este programa também foi utilizado, juntamente com o GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software - San Diego, CA, USA), para realização das análises estatísticas.

As variáveis contínuas foram descritas como proporções, médias e medianas e suas dispersões foram apresentadas através de desvios-padrão e intervalos dos valores máximos e mínimos. A distribuição normal foi verificada individualmente por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis com distribuição normal, utilizou-se o teste *t* de Student para comparação de médias das amostras independentes e também das pareadas. Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Wilcoxon para análise de duas amostras pareadas, o teste de Mann-Whitney para a de duas amostras independentes e o teste de Kruskal-Wallis para mais de duas amostras independentes. A correlação de Spearman foi empregada para testar a concordância entre as variáveis contínuas de distribuição não paramétrica.

As variáveis categóricas e dicotômicas foram descritas quanto às suas frequências relativas. Para análise, utilizou-se o teste do qui-quadrado e, quando uma ou mais caselas apresentavam valor esperado inferior a cinco, empregou-se o teste exato de Fisher.

O teste de Mantel-Cox foi utilizado para se avaliar o clareamento da carga parasitária nos diferentes tratamentos para LV.

Calculou-se o risco relativo (RR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%) como medida da magnitude do efeito de variáveis categóricas ou dicotômicas sobre o desfecho (evolução grave).

Variáveis com perda de informação acima de 50% foram excluídas das análises. O nível de significância empregado foi de 5% em todas as análises.

3.9 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – protocolo nº 11/2010 – e no Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG – parecer nº 027/010. Todos os pais ou guardiões das crianças assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexo 3), cientes de que não receberiam benefícios diretos para participação no estudo.

3.10 Técnicas laboratoriais

A RIFI foi realizada pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Laboratório Central (LACEN) do estado de MG, de acordo com as normas do SISLAB, com kit de imunofluorescência produzido por Biomanguinhos, FIOCRUZ. Foram considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência a partir da diluição 1:80, inconclusivos os com resultado 1:40 e negativos os demais.

Os testes rápidos Kalazar Detect® foram realizados por bioquímicos e médicos treinados, no laboratório do HJPII, segundo as instruções do fabricante.

A pesquisa direta de amastigotas no esfregaço de MO corado com Giemsa foi realizada por equipe do próprio hospital, composta de hematologistas pediátricos experientes. A amostra de aspirado de MO foi semeada em meio cultura Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e encaminhada para Centro de Referência de Leishmanioses do CPqRR, vinculado ao Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC). A pesquisa de formas promastigotas de *Leishmania* foi realizada a cada sete dias em lâmina – lamínula em microscópio ótico.

Para as PCR convencionais em sangue periférico e MO, as amostras foram também encaminhadas ao LPC, onde se empregou como alvo a região conservada do kDNA (Degraive et al., 1994).

3.10.1 Teste imunocromatográfico DiaMed-IT Leish®

A despeito da possibilidade de emprego de sangue total, utilizaram-se amostras de soros, mais facilmente disponíveis no ambiente hospitalar, para realização do teste DiaMed-IT Leish®. Foram seguidas as instruções do fabricante. Inicialmente, pingou-se uma gota de tampão no primeiro poço e aguardou-se um minuto; em seguida, foram colocadas quatro gotas de tampão no segundo poço e aguardou-se mais um minuto. Foram dispensados 10 µL de soro no primeiro poço, homogeneizando-o com tampão. Após um minuto, colocou-se a tira dentro do primeiro poço e, após dez minutos, esta foi passada para o segundo poço. Aguardaram-se mais dez minutos para realização da leitura do teste. Ele foi considerado positivo caso fossem percebidas duas bandas na tira e negativo se somente a banda controle estivesse corada. O exame foi definido como inválido nos casos em que a banda controle não estava visível.

3.10.2 Extração de DNA para qPCR

O DNA total das amostras dos pacientes foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen) seguindo protocolo do fabricante para extração de sangue total. Acrescentou-se o volume de Buffer AL, proteinase K e etanol (96-100%) proporcional para 200 µL de amostra. Para a eluição final, utilizaram-se 200 µL de Buffer AE. Os devidos cuidados foram considerados para não haver contaminação entre as amostras. Após a extração total do DNA, determinou-se sua concentração utilizando o aparelho Qubit® Fluorometer (Invitrogen Life Technologies), usando o Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen Life Technologies).

3.10.3 Fragmento alvo e iniciadores para qPCR

O gene de SSU rRNA, conservado em todas as espécies de *Leishmania*, foi escolhido como alvo. Ele apresenta aproximadamente 160 cópias no genoma do parasito, o que confere sensibilidade e estabilidade quantitativa em potencial para o ensaio (van Eys et al., 1992).

Os iniciadores senso LEISH.U1 (5'- AAGTGCTTTCCCATCGCAACT – 3') e o antisenso Leish.P1 (5'- GACGCACTAAACCCCTCCAA – 3'), que geram um fragmento de 67 pares de bases (pb) do SSU rRNA, foram utilizados conjuntamente com uma sonda TaqMan, LEISH.P1 (FAM 5'- CGGTTCGGTGTGTGGCGCC –3' TAMRA) (Wortmann et al., 2001), por conferirem sensibilidade e especificidade ao ensaio.

3.10.4 Construção da curva padrão para q PCR

O ensaio molecular em tempo real foi do tipo quantitativo, necessitando, portanto, de uma curva padrão construída com quantidades conhecidas de cópias do fragmento do genoma de *Leishmania* a ser amplificado. Essa curva foi elaborada a partir de plasmídeos contendo o fragmento de interesse clonado. Dessa maneira, os produtos de PCR do SSU rRNA foram clonados no vetor pCR 4-TOPO (Invitrogen Life Technologies) seguindo instruções do fabricante. A linhagem TOP10 da bactéria *Escherichia coli* foi submetida a ensaio de competência, por meio de choque térmico, a fim de torná-la apta ao recebimento do vetor contendo o inserto. Após essa etapa, as colônias de bactérias foram avaliadas em PCR convencional com os iniciadores já mencionados para verificar a presença do fragmento de interesse, o qual foi submetido ao sequenciamento. Após essa confirmação, as bactérias foram crescidas por 12 horas a 37°C em meio Luria-Bertani suplementado com ampicilina. Os plasmídeos foram extraídos seguindo protocolo de extração plasmidial (Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, PROMEGA) e, posteriormente, foram submetidos à reação de restrição enzimática para linearização. A concentração dos plasmídeos lineares foi dosada após purificação (Kit Healthcare Illustra Microspin G-25, GE) estando, dessa maneira, apropriados a serem utilizados na curva padrão da qPCR.

3.10.5 Reação da qPCR

A qPCR em tempo real foi utilizada para detectar a presença do DNA do parasito e para determinar sua quantidade em amostras clínicas. O DNA extraído

das amostras de sangue foi submetido à amplificação e quantificação das cópias do fragmento de 67pb do SSU rRNA de *Leishmania*.

As reações foram preparadas utilizando os iniciadores descritos e o sistema de detecção TaqMan® (Applied Biosystems) para as amostras. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. As curvas padrões foram utilizadas em cada experimento com quantidades conhecidas (diluições seriadas em base decimal) e em triplicata dos plasmídeos pCR- 4 TOPO (Invitrogen Life Technologies) com o gene de interesse clonado. O volume final destas reações foi 20 µL, incluindo três µL de DNA, 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 0.3 µM de cada *primer* e 0.25 µM de sonda.

O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 50 °C por dois minutos para ativação da uracil-DNA glicosilase (UNG), 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação e 60°C por um minuto para anelamento. As análises seguiram padrões do equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems).

Como controle do procedimento de extração, de amplificação e para normalização do ensaio de qPCR para o gene SSU rRNA de *Leishmania* spp., um ensaio de qPCR foi usado para o gene humano da β-actina, utilizando os iniciadores Aco1 e Aco2 (118), que geram um fragmento de 120pb. O sistema de detecção utilizado nesse caso foi o SYBR Green (Applied Biosystems). Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. As curvas padrões foram utilizadas em cada experimento com quantidades conhecidas (diluições seriadas em base decimal) e em triplicata dos plasmídeos pCR- 4 TOPO (Invitrogen Life Technologies) com o gene de interesse clonado. A mistura desta reação era composta por 12.5 µL de Syber® Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 0.1 µM de cada *primer* and três µL de DNA, para um volume final de 25 µL. O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento. A análise de dissociação foi realizada após o programa de ciclagem em todos os experimentos e seguiu padrão específico do equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems).

A carga parasitária foi expressa pela carga de DNA de *Leishmania* (número de cópias de fragmentos de SSU rRNA) normalizada em relação ao gene de referência da β-actina, seguindo instruções de Overbergh et al. (1999). Para calcular o fator de correção da β-actina utilizado na normalização, dividiu-se o valor de

números de cópias da β -actina de cada amostra pelo valor mais alto de número de cópias obtidos nos experimentos.

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas e laboratoriais na primeira avaliação

Entre junho de 2010 e junho de 2011, foram internadas 53 crianças com diagnóstico confirmado de LV, número discretamente inferior ao dos anos de 2008 e 2009. Quatro iniciaram tratamento específico antes da avaliação pela equipe do estudo e familiares de uma optaram por não assinar o TCLE. Deste modo, foram incluídos 48 pacientes.

A idade variou de três meses a nove anos, com média de 39,7 meses; 20 (41,7%) e 37 crianças (77,1%) eram menores de dois e cinco anos, respectivamente. Vinte e cinco indivíduos (52,1%) eram do sexo masculino.

Dezessete pacientes (35,4%) residentes na cidade de BH e 23 (47,9%) procediam da região metropolitana de BH. Os demais moravam no interior do estado de MG (oito pacientes - 16,7%).

O tempo médio de aparecimento de sintomas antes da internação foi de 26 dias, variando de quatro a 180 dias. Metade das crianças foi internada até 15 dias após início do quadro. Não foi observada diferença no tempo de sintomas de pacientes provenientes de BH, de sua região metropolitana ou daqueles procedentes do interior do estado (teste de Kruskal Wallis – $p=0,89$).

À admissão hospitalar (antes do início do tratamento - T0), os sintomas mais relatados pelos responsáveis foram palidez (87,5%), distensão abdominal (81,2%) e prostração (81,2%), além de febre (100%), que foi critério de inclusão no estudo. O sinal detectado em maior número de pacientes foi palidez (100%). Hepatomegalia estava presente em 46 pacientes (95,8%) e esplenomegalia em 47 (97,9%). A frequência dos sintomas e sinais está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Sintomas e sinais observados em T0 (antes do início do tratamento) de 48 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Sintomas	N (%)	Sinais	N (%)
Febre*	48 (100)	Palidez	48 (100)
Palidez	42 (87,5)	Esplenomegalia	47 (97,9)
Prostração	39 (81,2)	Hepatomegalia	46 (95,8)
Distensão Abdominal	39 (81,2)	Prostração	27 (56,2)
Hiporexia	32 (66,7)	Edema	11 (22,9)
Perda de peso	27 (56,2)	Petéquia/equimose	3 (6,3)
Vômito	26 (54,2)	Taquidispneia	3 (6,3)
Dor Abdominal	23 (47,9)	Icterícia	2 (4,2)
Diarréia	14 (29,2)	Sinal de má perfusão	0 (0,0)
Edema	11 (22,9)		
Epistaxe	7 (14,6)		
Petéquia/equimose	5 (10,4)		
Gengivorragia	1 (2,1)		
Sangramento digestivo	1 (2,1)		
Sangramento respiratório	1 (2,1)		

*Critério de inclusão

Ao exame físico à admissão hospitalar, as medidas de fígado ajustadas pela SC variaram de 2,7 a 21,9 cm, com média de 7,7 cm e desvio padrão (DP) de 3,5 cm. A média da dimensão do baço ajustada pela SC foi de 12,7 cm, com DP de 5,0 cm e valores entre 2,8 e 26,1 cm.

Três pacientes (6,3%) apresentaram quadro de desnutrição – dois (4,2%) com moderada e um (2,1%) com grave. Duas destas três crianças não apresentaram baixa estatura significativa, sugerindo quadro de desnutrição aguda e uma apresentou baixa estatura moderada, indicativa de déficit de crescimento crônico. Outros três pacientes (6,3%) apresentaram quadro de baixa estatura sem comprometimento significativo da relação peso altura ou do IMC, perfil também compatível com quadro de desnutrição crônica.

Nenhum paciente era infectado pelo HIV ou estava em uso de drogas imunossupressoras.

Observou-se que os pacientes apresentaram valores médios de hemoglobina, plaquetas, leucócitos totais, neutrófilos e albumina abaixo dos valores de referência. Por outro lado, as aminotransferases (AST e ALT) encontravam-se acima dos valores de referência (Anexo 1). Os níveis de bilirrubina total e de atividade de protrombina tiveram média próxima dos valores de referência. As médias, desvios-padrão, valores mínimos e máximos de exames hematológicos e bioquímicos dos pacientes à admissão estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Exames hematológicos e bioquímicos à admissão hospitalar de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Exame Laboratorial	N (%)	Média (±DP)	Mínimo	Máximo
Hemoglobina (mg/mm ³)	48 (100)	7,5 (±1,5)	4,3	10,1
Hematócrito (%)	48 (100)	22,9 (±4,2)	13,4	32,5
Plaquetas (unid/mm ³)	48 (100)	99.270 (±45.478)	17.000	202.000
Leucócitos (cél/mm ³)	48 (100)	3.785 (±1.736)	1.200	9.300
Neutrófilos (cél/mm ³)	48 (100)	1.354 (±971)	231	5508
Atividade de protrombina (%)	41 (85,4)	65,6 (±17,0)	8	100
AST (UI/L)	44 (91,7)	168 (±313)	18	1.496
ALT (UI/L)	44 (91,7)	78 (±130)	18	783
Bilirrubina total (mg/dL)	40 (83,3)	0,9 (±2,2)	0,1	14,0
Albumina (g/dL)	44 (91,7)	2,4 (±0,6)	0,8	3,6
Globulina (g/dL)	44 (91,7)	4,3 (±1,1)	2,4	7,6

Os valores de hemoglobina, plaquetas, leucócitos, neutrófilos, atividade de protrombina, aminotransferases, bilirrubina total e albumina à admissão foram categorizados em variáveis dicotômicas, tendo como pontos de corte valores descritos na literatura para casos de LV (Sampaio et al., 2010; Brasil, 2011b) (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência de alterações laboratoriais à admissão hospitalar dos pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Exame laboratorial	N (%)	Alterado (% do N)
Hemoglobina ≤ 5 mg/mm ³	48 (100)	4 (8,3)
Hemoglobina ≤ 7 mg/mm ³	48 (100)	18 (37,5)
Plaquetas ≤ 50.000 unid/mm ³	48 (100)	9 (18,8)
Leucócitos ≤ 1.500 cél/mm ³	48 (100)	3 (6,3)
Neutrófilos ≤ 500 cél/mm ³	48 (100)	5 (10,4)
Atividade de protrombina ≤ 70%	41 (85,4)	26 (63,4)
AST ≥ 100 UI/L	44 (91,7)	14 (31,8)
ALT ≥ 100 UI/L	44 (91,7)	5 (11,4)
Bilirrubina total ≥ 1,0 mg/dL	40 (83,3)	5 (12,5)
Albumina ≤ 2,5 g/dL	44 (91,7)	22 (50,0)

O nível sérico de creatinina foi avaliado em 43 pacientes (89,6%). Verificou-se que dois pacientes (4,6%) apresentaram insuficiência renal antes da administração de droga específica para leishmaniose.

4.2 Diagnóstico laboratorial

Todos os pacientes da casuística tiveram o diagnóstico de LV corroborado por meio de exame laboratorial, com intervalo médio de 1,2 dias e máximo de cinco dias entre a hospitalização e a confirmação diagnóstica laboratorial.

A RIFI e os dois testes rápidos - Kalazar Detect® e Diamed-IT Leish®- foram realizados em todos os 48 pacientes, sendo positivos em 32 (66,7%), 41 (85,4%) e 48 (100%) crianças, respectivamente. Dez amostras (20,8%) foram inconclusivas na RIFI (título de 1:40).

Dentre os 37 pacientes que não participaram do estudo LV Brasil, apenas dois (5,4%) realizaram pesquisa direta de *Leishmania* em aspirado de MO, com resultado positivo em ambos. Outras duas crianças (5,4%) tiveram o DNA do parasito detectado por meio de PCR convencional em amostra de sangue periférico. Não foi realizada mielocultura ou PCR em amostra de MO de nenhum destes pacientes.

Os 11 pacientes incluídos no estudo LV Brasil foram submetidos à propedêutica mais extensa, com realização de pesquisa direta em aspirado de MO, PCR em sangue periférico e em MO e mielocultura. Ressaltam-se a baixa positividade deste último método (18,2%) e os resultados da PCR que foram positivos em todos os pacientes, tanto em amostras de sangue periférico quanto nas de MO. A tabela 8 mostra a positividade dos exames diagnósticos para LV em pacientes não incluídos e incluídos no estudo LV Brasil.

Tabela 8 - Positividade dos métodos diagnósticos para LV em 48 pacientes internados no HIJPII não incluídos e incluídos no estudo LV Brasil, de junho de 2010 a junho de 2011

Método	Pacientes não incluídos (n = 37)		Pacientes incluídos (n = 11)	
	Positivos/ total realizado	Positividade (%)	Positivos/ total realizado	Positividade (%)
RIFI	24/37	64,9	8/11	72,7
Kalazar Detect®	32/37	86,5	9/11	81,8
Diamed-IT Leish®	37/37	100	11/11	100
Pesquisa direta - MO	2/2	100	9/11	81,8
PCR -sangue periférico	2/2	100	11/11	100
PCR - MO	-	-	11/11	100
Mielocultura	-	-	2/11	18,2

4.3 Tratamento específico

O tratamento específico foi iniciado em todos os 48 pacientes assim que confirmado laboratorialmente o diagnóstico de LV.

Nas 37 crianças não incluídas no estudo LV Brasil, a primeira medicação administrada e eventuais trocas desta foram orientadas pela equipe médica assistente, de acordo com manuais do MS e indicação clínica. Vinte e quatro crianças (64,9%) iniciaram o tratamento com Glucantime®, 12 (32,4%) com anfotericina B desoxicolato e uma (2,7%) com anfotericina B lipossomal. As contraindicações à administração de Glucantime® como terapêutica inicial foram gravidade clínica (seis casos), alterações em exames de função hepática (três casos), idade inferior a seis meses (dois casos), alterações ao eletrocardiograma inicial (um caso) e insuficiência renal (um caso). Este último paciente foi o único a receber anfotericina B lipossomal como primeiro tratamento; nos demais, foi administrada anfotericina B desoxicolato.

Em seis (16,2%) dos 37 pacientes, foi necessária troca da medicação inicialmente administrada. Em quatro (10,8%), após administração por tempo médio de 3,2 dias, o Glucantime® foi trocado por anfotericina B desoxicolato devido à gravidade clínica. Para duas crianças (5,4%) que receberam anfotericina B desoxicolato por tempo médio de 6,0 dias como medicação inicial foi indicado tratamento sequencial com anfotericina B lipossomal – uma devido à piora das

escórias renais e outra por decisão da equipe assistente (lactente com cinco meses de idade).

Os 11 pacientes incluídos no estudo LV Brasil tiveram seus esquemas terapêuticos selecionados a partir de randomização. Dois (18,2%) foram tratados com Glucantime® por via endovenosa durante 20 dias, três (27,3%) receberam anfotericina B desoxicolato por 14 dias, um (9,1%) recebeu anfotericina B lipossomal por sete dias e para cinco pacientes foi administrado esquema combinado de dose única de anfotericina B lipossomal no primeiro dia, seguido de 10 dias de Glucantime® endovenoso. Nenhum destes necessitou de troca do esquema terapêutico.

Considerando-se todos os 48 pacientes do estudo, no tratamento final e efetivo foi empregado Glucantime® em 22 (45,8%), anfotericina B desoxicolato em 17 (35,5%), anfotericina B lipossomal em quatro (8,3%) e combinação de anfotericina B lipossomal e glucantime em cinco crianças (10,4%). A duração média foi de 28,2 dias, 19,7 dias, 6,5 dias e 11,0 dias para os tratamentos com Glucantime®, anfotericina B desoxicolato, anfotericina B lipossomal e combinação de anfotericina B lipossomal e Glucantime®, respectivamente.

4.4 Características clínicas na segunda e terceira avaliações

A resolução da febre ocorreu, em média, no terceiro dia após início de tratamento específico, variando de um a 10 dias.

A avaliação clínica entre o 10º e o 15º dias após início de tratamento (T1) foi realizada em 46 (95,8%) dos 48 pacientes. Dois pacientes já haviam recebido alta hospitalar e não retornaram para a avaliação.

Em T1, constatou-se menor frequência de prostração, edema e petéquias ou equimoses do que em T0. Houve redução do percentual de pacientes com palidez, mas este ainda permaneceu alto em T1. Os dois pacientes que estavam ictericos em T0 também apresentaram este sinal em T1 (Tabela 9 e Figura 1).

Trinta e sete pacientes (80,4%) apresentaram hepatomegalia ao exame físico em T1. A média da hepatimetria ajustada por SC dos pacientes com fígado palpável em T1 foi de 7,3 cm ($\pm 3,8$ cm), variando de 1,0 a 18,4 cm, com redução de 5,2% em relação a T0 (antes do início do tratamento). Não foi constatada diferença

significativa entre as medidas do fígado observadas nestes momentos (teste de Wilcoxon – $p=0,13$) (Figura 2).

Esplenomegalia foi observada em 42 crianças (91,3%). O tamanho médio do baço ajustado pela SC dos pacientes com baço palpável foi de 10,2 cm ($\pm 4,9$ cm), com valores entre 1,0 e 26,1 cm. Houve redução de 19,7% na dimensão do baço, com diferença significativa entre as medidas de T0 e T1 (teste t pareado - $p<0,0001$) (Figura 2).

A terceira avaliação clínica (T2), entre os 40° e 60° dias após início de tratamento específico, foi realizada em 42 pacientes (87,5%), inclusive nas duas crianças não submetidas à avaliação em T1. Seis pacientes não compareceram a este retorno, a despeito de várias tentativas de agendamento.

Nenhum paciente apresentava prostração, icterícia, edema, petéquias ou equimoses. Vinte e quatro crianças (57,1%) mantinham palidez, 26 (61,9%) ainda estavam com hepatomegalia e 22 (52,4%) apresentavam esplenomegalia ao exame físico (Tabela 9 e Figura 1).

A medida média do fígado ajustada por SC em T2 foi de 4,6 cm ($\pm 2,4$ cm), variando de 1,1 a 9,1 cm, nos pacientes em que esta víscera era palpável. Houve redução de 40,3% em relação a T0, sendo significativa a diferença entre os valores de T0 e T2 (teste de Wilcoxon – $p<0,0001$) e também entre T1 e T2 (teste de Wilcoxon – $p < 0,0001$) (Figura 2).

A dimensão média do baço ajustada por SC foi de 6,0 cm ($\pm 3,0$ cm), variando de 1,8 a 11,1 cm, considerando-se os pacientes com este órgão palpável. Houve redução de 52,8% em sua medida, comparando-se T0 e T2, e esta diferença foi significativa entre T0 e T2 (teste de Wilcoxon – $p<0,0001$) e também entre T1 e T2 (teste de Wilcoxon – $p < 0,0001$) (Figura 2).

Todos os pacientes avaliados haviam apresentado melhora clínica em T2.

Tabela 9 - Percentual de sinais observados em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Sinais	T0 (%) n=48	T1 (%) n=46	T2 (%) n=42
Palidez	100	89,1	57,1
Esplenomegalia	97,9	91,3	52,4
Hepatomegalia	95,8	80,4	61,9
Prostração	53,3	21,7	0,0
Edema	22,9	15,2	0
Petéquia/equimose	6,3	2,2	0
Icterícia	4,2	4,3	0

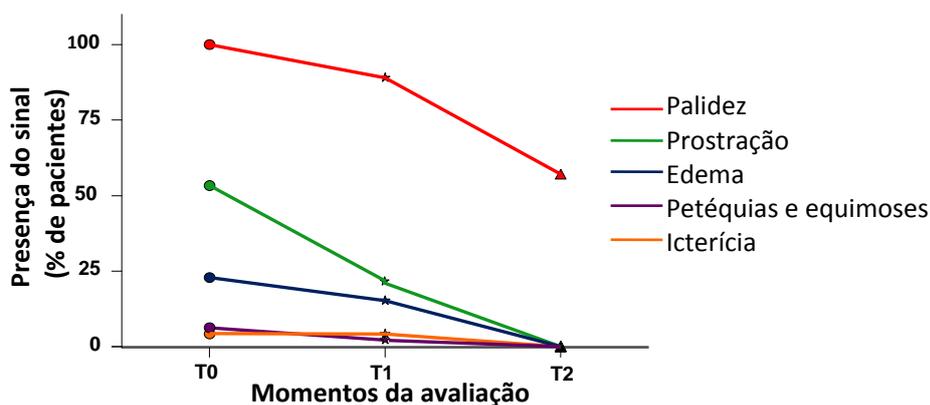


Figura 1 - Percentual de sinais observados em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.

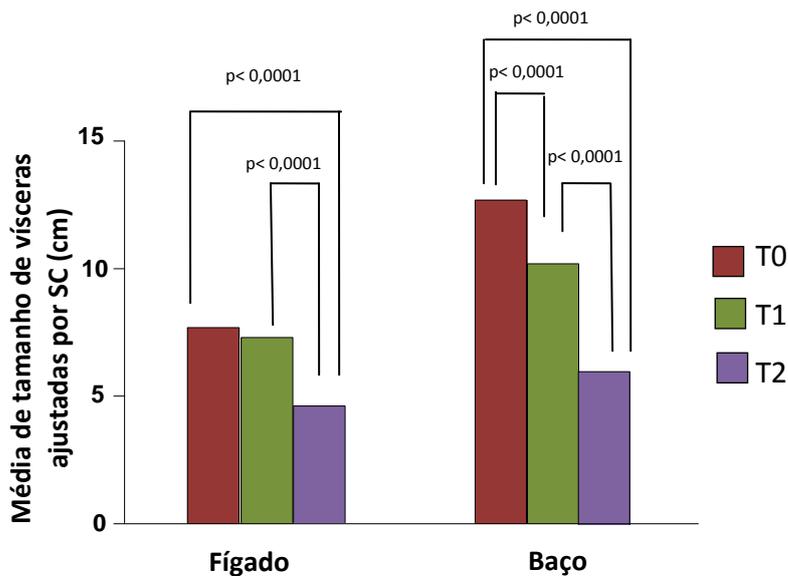


Figura 2 - Média do tamanho de vísceras ajustadas por SC, em cm, observadas em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas no gráfico.

4.5 Evolução dos exames laboratoriais

Observou-se aumento significativo nos valores de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos, neutrófilos e atividade de protrombina à alta hospitalar, comparado-os aos exames da admissão. Houve redução significativa nos níveis de AST, o que não foi observado para ALT. (Tabela 10).

Tabela 10 - Médias dos valores de exames hematológicos e bioquímicos à admissão e alta hospitalares de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Exame Laboratorial	N (%)	Média (±DP)	Valor p
Hemoglobina (mg/mm³)			
Admissão	48 (100)	7,5 (±1,5)	< 0,0001
Alta	44 (91,7)	9,1 (±1,4)	
Hematócrito (%)			
Admissão	48 (100)	22,9 (±4,2)	< 0,0001
Alta	43 (89,6)	30,2 (±11,6)	
Plaquetas (unid/mm³)			
Admissão	48 (100)	99.270 (±45.478)	< 0,0001*
Alta	44 (91,7)	318.000 (±119.865)	
Leucócitos (cél/mm³)			
Admissão	48 (100)	3.785 (±1.736)	< 0,0001*
Alta	44 (91,7)	6.290 (±2.929)	
Neutrófilos (cél/mm³)			
Admissão	48 (100)	1.354 (±971)	< 0,0001*
Alta	44 (91,7)	2.517 (±1.438)	
Atividade de protrombina (%)			
Admissão	41 (85,4)	65,6 (±17,0)	< 0,0001
Alta	24 (50)	83,2 (±11,7)	
AST (UI/L)			
Admissão	44 (91,7)	168 (±313)	< 0,0001*
Alta	37 (77,1)	49 (±35)	
ALT (UI/L)			
Admissão	44 (91,7)	78 (±130)	0,43*
Alta	37 (77,1)	47 (±30)	
Bilirrubina total (mg/dL)			
Admissão	40 (83,3)	0,9 (±2,2)	NR**
Alta	18 (37,5)	0,4 (±0,7)	
Albumina (g/dL)			
Admissão	44 (91,7)	2,4 (±0,6)	NR**
Alta	19 (39,6)	3,1 (±0,4)	
Globulina (g/dL)			
Admissão	44 (91,7)	4,3 (±1,1)	NR**
Alta	19 (39,6)	4,3 (±0,7)	

*Utilizado teste de Wilcoxon

** Não realizado – perda de informações superior a 50%

Os valores p que evidenciam diferença significativa (p <0,05) estão em negrito.

4.6 Intercorrências e tratamento de suporte durante a internação hospitalar

Dentre os 48 pacientes avaliados, 31 (64,6%) apresentaram infecção bacteriana diagnosticada pelo médico assistente e receberam tratamento com antimicrobiano. Em 20 destes (41,7% do total de pacientes), a infecção estava presente à admissão hospitalar, tendo sido instituído o tratamento para neutropenia febril sem foco em 16, para pneumonia em dois, para ITU em um e para infecção de

pele em um. A duração média de administração de antimicrobiano foi de 10,1 dias ($\pm 5,2$ dias), variando de dois a 21 dias.

Onze crianças (22,9% do total de pacientes) evoluíram com infecção hospitalar. Os focos foram pneumonia (três pacientes), IVAS - incluindo sinusite e otite média - (três pacientes), ITU (dois pacientes), infecção de pele (um paciente), flebite (um paciente) e neutropenia febril sem foco (um paciente). O tempo médio de tratamento com antibiótico foi de 9,1 dias ($\pm 3,3$ dias), variando de três a 15 dias de duração.

Três crianças apresentaram varicela durante o período de internação. Apesar de não ser investigado sistematicamente, quadro de parasitose intestinal foi diagnosticado em duas crianças – uma com giardíase, tratada ainda no hospital, e outra com estrogiloidíase e ascaridíase, para a qual o anti-helmíntico foi prescrito à alta.

Onze pacientes (22,9% do total de pacientes) evoluíram com algum tipo de sangramento durante a internação. Dentre estes, cinco (45,4%) apresentaram epistaxe, dois (18,2%) tiveram sangramento de trato urinário, dois (18,2%) apresentaram sangramento de trato digestivo, um (9,1%) evoluiu com gengivorragia e um (9,1%) apresentou gengivorragia e sangramento de trato digestivo.

Nenhum paciente evoluiu para óbito no grupo avaliado. Cinco crianças (10,4%) necessitaram de internação em UTI, uma (2,1%) recebeu aminas vasoativas, duas (4,2%) precisaram de VM e 15 (31,2%) receberam transfusão de algum tipo de hemoderivado.

O tempo de internação hospitalar entre os pacientes não incluídos no estudo LV Brasil foi ditado pela avaliação da equipe clínica assistente, tendo média de 22,8 dias ($\pm 9,1$ dias), variando de 10 a 44 dias. Dentre os pacientes do estudo LV Brasil, a duração da hospitalização atendeu também aos protocolos da pesquisa, variando de 12 a 25 dias, com média de 16,4 ($\pm 3,9$ dias).

4.7 Quantificação do material genético de *Leishmania*

4.7.1 Confiabilidade dos ensaios quantitativos

O desempenho do ensaio foi avaliado através de diluições seriadas de uma curva padrão, com pontos com concentrações conhecidas e pré-definidas que

variaram de $1,6 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^8$ cópias de DNA do plasmídeo contendo o fragmento de 67pb do gene SSU rRNA de *Leishmania*.

A partir de quatro experimentos distintos, calculou-se a média das concentrações de DNA da curva padrão, que foi linear até sete diluições. O coeficiente de correlação linear médio (R^2) foi de 0,99 e a eficiência da amplificação média foi de 100%. Como medidas de precisão, foram determinados os coeficientes de variação (CV) interensaio (entre os quatro experimentos) e intraensaio (entre as triplicatas de um único ensaio), baseados na relação entre os DP e as médias dos Cts de cada ponto (Tabela 11). Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios utilizando o gene codificador para β -actina humana.

Tabela 11 - Número de cópias de DNA do plasmídeo contendo o fragmento de 67pb do gene SSU rRNA e coeficientes de variação (CV), em percentual, dos pontos da curva padrão

	Cópias de DNA do plasmídeo	CV Interensaios (%)	CV Intraensaio (%)
Ponto 1	$1,6 \times 10^2$	2,33	1,27
Ponto 2	$1,6 \times 10^3$	2,78	0,61
Ponto 3	$1,6 \times 10^4$	1,34	0,12
Ponto 4	$1,6 \times 10^5$	2,26	0,46
Ponto 5	$1,6 \times 10^6$	0,83	0,37
Ponto 6	$1,6 \times 10^7$	1,07	0,90
Ponto 7	$1,6 \times 10^8$	1,65	0,63

Os ensaios mostraram um bom limite de detecção, com amostras com $1,6 \times 10^2$ cópias do DNA do plasmídeo linearizado positivas, o equivalente a conteúdo de DNA (fragmento de 67pb do gene SSU rRNA) de uma célula de *Leishmania* (van Eys et al., 1992).

4.7.2 Número de cópias de SSU rRNA nas três avaliações

Antes do início de tratamento específico para LV (T0), foi realizada avaliação do número de cópias de SSU rRNA em sangue periférico em todas as crianças, positivas em sua totalidade. Em T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento), foram dosadas as cargas parasitárias de 46 e 43 pacientes respectivamente, sendo que as duas crianças que não foram avaliadas em T1 tiveram amostra coletada e analisada em T2.

As médias, DP, mediana e valores mínimo e máximo do número de cópias de SSU rRNA nos diferentes momentos estão apresentados na Tabela 12. Houve grande variação entre os valores encontrados entre os diferentes pacientes em um mesmo momento.

Tabela 12 - Cópias de SSU rRNA em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) dos pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Momento de avaliação	Média (\pm DP)	Mediana	Mínimo	Máximo
T0 (n=48)	8.592.371 (56.187.103)	1.662	44	389.089.853
T1 (n=46)	248 (618)	0	0	2.321
T2 (n=43)	311 (1.902)	0	0	12.478

Somente dois pacientes apresentaram número absoluto de cópias de SSU rRNA superior à média em T0 (23.052.253 e 389.089.853 cópias de SSU rRNA). Eram crianças de 17 e 24 meses de vida, ambos do sexo masculino. O início dos sintomas destes pacientes ocorreu 25 e 30 dias antes da admissão hospitalar e não foram relatados ou observados sangramentos, icterícia ou desnutrição grave.

Observou-se diferença estatística significativa entre os números de cópias de SSU rRNA nos momentos T0-T1 (teste de Wilcoxon - $p < 0,0001$) e T0-T2 (teste de Wilcoxon - $p < 0,0001$), mas não houve diferença entre os valores nos tempos T1-T2 (teste de Wilcoxon - $p=0,12$) (Figura 3).

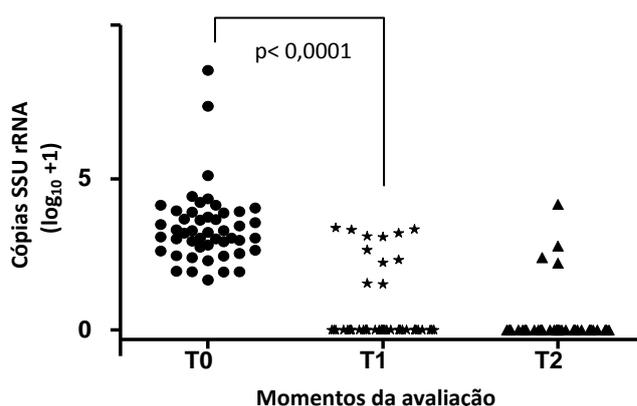


Figura 3 - Número das cópias de SSU rRNA (em $\log_{10} + 1$) em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de 48 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas no gráfico.

Entre os 46 pacientes com coleta de amostra em T1, 35 (76,1%) já haviam apresentado negatização da carga parasitária. Quatro (8,7%) crianças apresentaram redução da carga sem negatizá-la e sete (15,2%) mantiveram número de cópias de SSU rRNA semelhante ao de T0 (Figura 4).

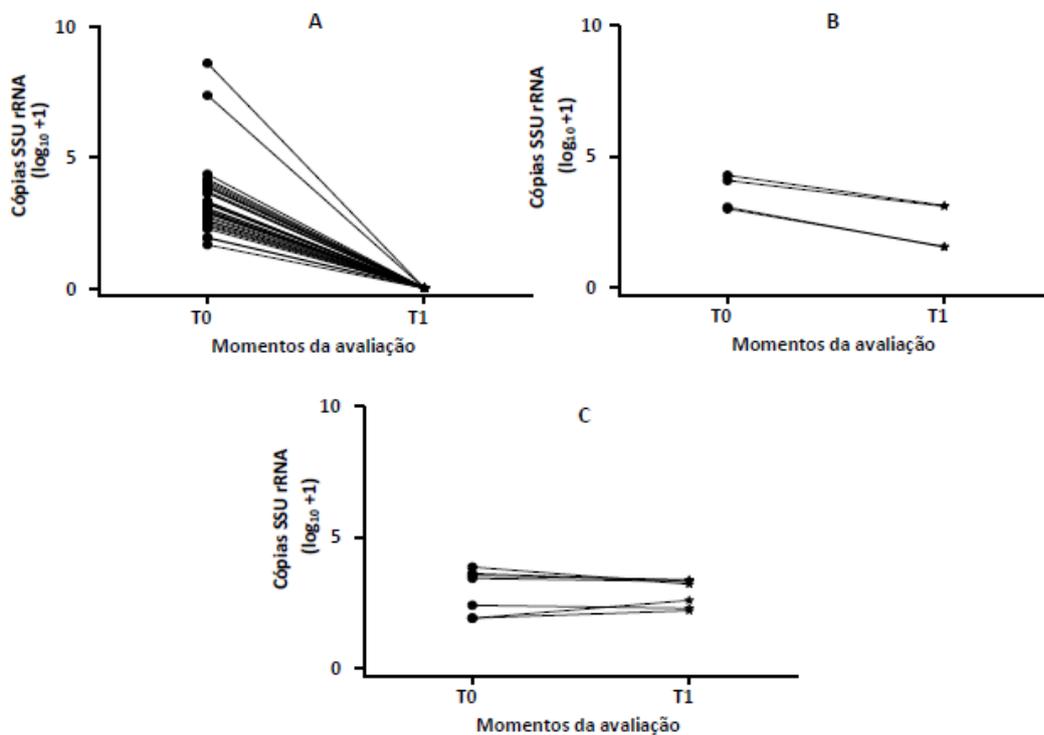


Figura 4 - Número de cópias de SSU rRNA (em $\log_{10} + 1$) em T0 (admissão hospitalar) e T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) de 46 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011. A – 35 pacientes com negatização das cópias em T1; B – quatro pacientes com redução sem negatização do número de cópias em T1; C – sete pacientes com persistência de número semelhante de cópias em T0 e T1.

Entre os 43 pacientes com amostra analisada em T2, 39 (90,7%) não apresentaram cópias de SSU rRNA detectáveis em sangue periférico. Em 29 destes, manteve-se a carga negativa já verificada em T1; em nove, a carga ainda era positiva em T1 e negativou em T2; em um paciente, não havia sido realizado exame em T1. Em duas crianças (4,65%), observou-se decréscimo do número de cópias de SSU rRNA com relação às avaliações anteriores, sem negatização – em uma destas, não havia sido coletada amostra em T1. Em outros dois pacientes (4,65%), a carga parasitária tornou-se positiva novamente, com número de cópias do fragmento gênico semelhante ao de T0, a despeito de sua negatização em T1 (Figura 5).

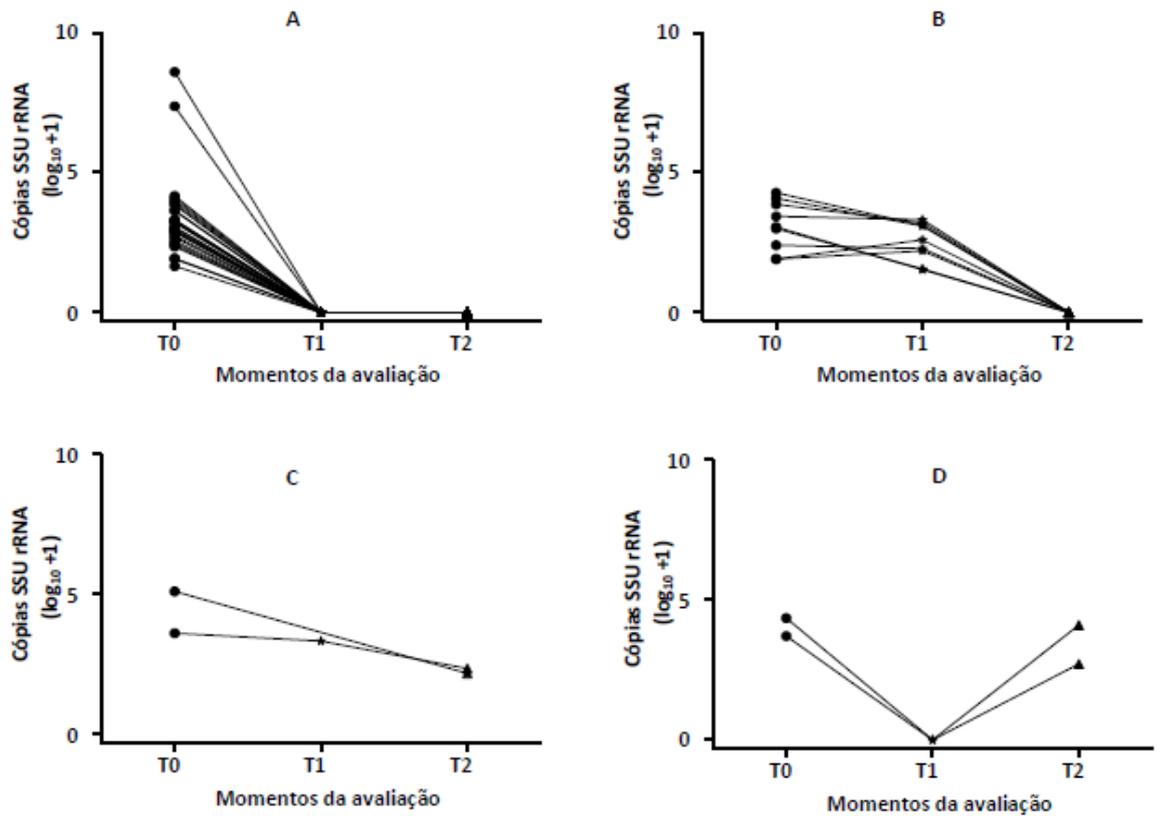


Figura 5 - Número de cópias de SSU rRNA (em $\log_{10} + 1$) em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de 43 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011. A – 29 pacientes com negativação das cópias em T1 e T2; B – dez pacientes com negativação das cópias somente em T2; C – dois pacientes com redução sem negativação de cópias em T2; D – dois pacientes com positivação do número de cópias em T2, após negativação em T1.

4.7.3 Número de cópias de SSU rRNA e características clínicas e laboratoriais na primeira avaliação

Foram avaliadas as características demográficas, clínicas e laboratoriais em T0 (antes do início do tratamento) e sua relação com o número de cópias de SSU rRNA dos pacientes neste momento. (Tabela 13 e 14).

Não se observou correlação ou influência de nenhuma característica em relação à carga parasitária em T0.

Tabela 13 - Correlação entre número de cópias de SSU rRNA e características demográficas, clínicas e laboratoriais em T0 (antes do início do tratamento), em pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Característica	N	Coefficiente de Correlação	Valor p*
Idade (meses)	48	-0,14	0,34
Tempo de doença (dias)	48	0,01	0,93
Tamanho de fígado ajustado por SC (cm)	48	0,08	0,60
Tamanho de baço ajustado por SC (cm)	48	-0,01	0,97
Hemoglobina (mg/mm ³)	48	-0,06	0,66
Hematócrito (%)	48	0,02	0,88
Plaquetas (unid/mm ³)	48	0,02	0,88
Leucócitos (cél/mm ³)	48	0,18	0,21
Neutrófilos (cél/mm ³)	48	0,12	0,41
Atividade de protrombina (%)	41	-0,14	0,37
AST (UI/L)	44	-0,06	0,69
ALT (UI/L)	44	0,11	0,49
Bilirrubina total (mg/dL)	40	0,03	0,87
Albumina (g/dL)	44	0,23	0,13
Globulina (g/dL)	44	0,06	0,72

*Utilizada correlação de Spearman.

Tabela 14 - Comparação entre número de cópias de SSU rRNA e características demográficas e alterações clínicas em T0 (antes do início do tratamento), em pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Características	N	Valor p*
Sexo (n=48)		
Masculino	25	0,57
Feminino	23	
Desnutrição grave (n=48)		
Sim	1	0,26
Não	47	
Diarréia (n=47)		
Sim	14	0,96
Não	33	
Vômitos (n=47)		
Sim	26	0,96
Não	21	
Sangramentos (exceto cutâneos) (n=48)		
Sim	10	0,30
Não	38	
Icterícia (n=48)		
Sim	2	0,88
Não	46	
Edema (n=48)		
Sim	11	0,91
Não	37	
Taquidispneia (n=48)		
Sim	3	0,26
Não	45	

*Utilizado teste de Mann-Whitney

4.7.4 Número de cópias de SSU rRNA e medicação utilizada

A média, DP, mediana e valores mínimos e máximos do número de cópias de SSU rRNA em T0 (antes do início do tratamento), avaliados de acordo com a medicação efetiva, estão na tabela 15. Não foi observada diferença significativa da carga parasitária inicial nos diferentes grupos de tratamentos específicos para LV (teste de Kruskal-Wallis – $p=0,92$).

Tabela 15 - Cópias de SSU rRNA em T0 (antes do início do tratamento) dos pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011, de acordo com tratamento efetivo

Tratamento efetivo	Média (\pm DP)	Mediana	Mínimo	Máximo
Glucantime® (n=22)	3.366 (4028)	1811	43,8	14.558
Anfotericina B desoxicolato (n=17)	24.247.975 (94.182.976)	1899	80,28	389.089.853
Anfotericina B lipossomal (n=4)	31.946 (62.647)	699	469,8	125.917
Combinado (Anfotericina B lipossomal + Glucantime®) (n=5)	3.279 (3.707)	726	299,3	7.499

Tanto em T1 (10 a 15 dias após início de tratamento) quanto em T2 (40 a 60 dias após início do tratamento), não se observou diferença na dinâmica da carga parasitária dos pacientes que receberam tratamentos efetivos distintos (teste de Mantel-Cox – $p=0,97$).

Embora o número de pacientes seja pequeno (cinco crianças), ressalta-se a ausência de cópias de SSU rRNA em todos os pacientes tratados com a combinação de anfotericina B lipossomal e Glucantime® em T2 (Tabela 16 e Figuras 6 e 7).

Tabela 16 - Negativação da carga parasitária dos pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011, de acordo com tratamento efetivo

Tratamento efetivo	Pacientes com negativação de cópias de SSU rRNA (%)		Total de pacientes tratados (%)
	T1	T2	
Glucantime®	16 (72,7)	21 (95,4)	22 (100)
Anfotericina B desoxicolato	12 (70,6)	15 (88,2)	17 (100)
Anfotericina B lipossomal	3 (75)	3 (75)	4 (100)
Combinado (Anfotericina B lipossomal + Glucantime®)	4 (80)	5 (100)	5 (100)

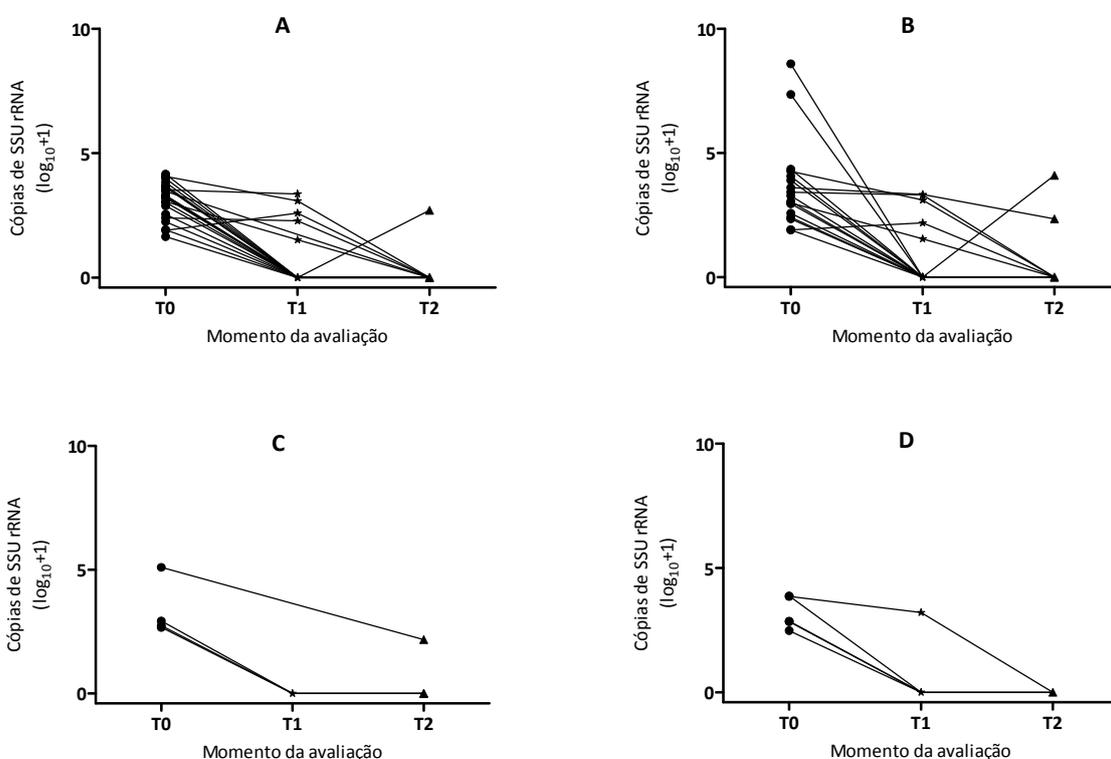


Figura 6: Número de cópias de SSU rRNA (em $\log_{10} + 1$) em T0 (antes do início do tratamento), T1 (entre 10 e 15 dias após início do tratamento) e T2 (entre 40 e 60 dias após início do tratamento) de pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011, de acordo com tratamento efetivo. A – 22 pacientes tratados com Glucantime®; B – 17 pacientes tratados com anfotericina B desoxicolato; C – quatro pacientes tratados com anfotericina B lipossomal; D – cinco pacientes tratados com combinação de anfotericina B lipossomal e Glucantime®.

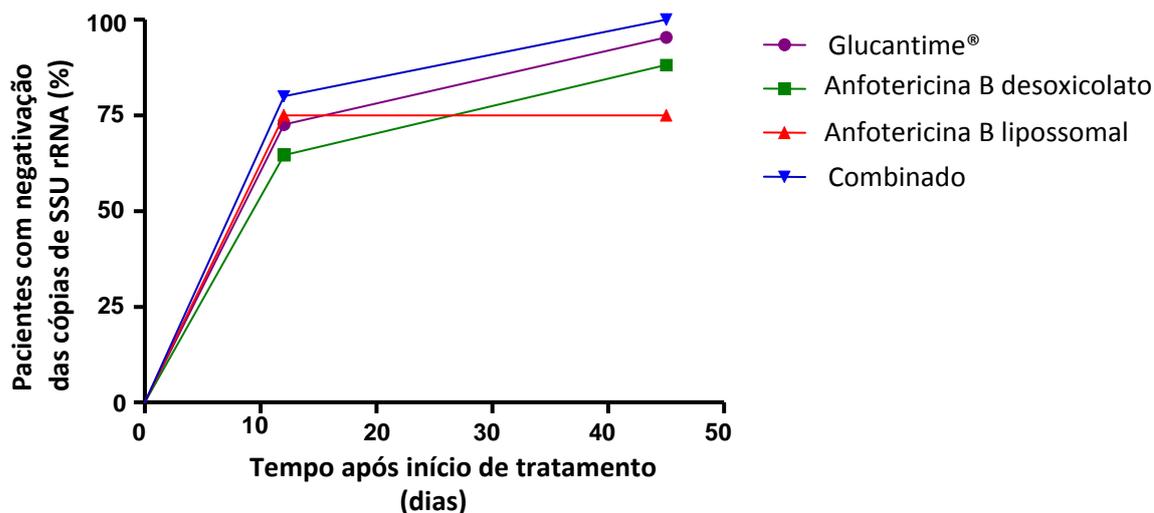


Figura 7 - Negatificação do número de cópias de SSU rRNA ao longo do tratamento efetivo com diferentes medicações em pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.

Um dos dois pacientes que apresentaram, em T2, queda no número de cópias de SSU rRNA sem negativá-las foi tratado com anfotericina B desoxicolato. O outro recebeu anfotericina B lipossomal. Nas duas crianças em que foi observada nova positividade da carga em T2 após sua negatificação em T1, o tratamento foi realizado com Glucantime® em uma e anfotericina B desoxicolato em outra.

4.8 Avaliação de gravidade

4.8.1 Avaliação de critérios de gravidade e escores preditores de óbito à admissão hospitalar

De acordo com a definição proposta pelo MS em manual de 2006 (MS-2006), nove crianças (18,7%) preenchiam, à admissão hospitalar, os critérios de paciente grave: duas com idade inferior a seis meses, uma desnutrida grave, duas com sangramentos (exceto epistaxe e petéquias ou equimoses), duas com edema generalizado, uma com icterícia e uma com edema e icterícia.

Por meio do escore proposto pelo MS em 2011 (MS-2011), 17 dos 20 pacientes menores de dois anos foram classificados utilizando-se o modelo clínico e

laboratorial e três foram classificados pelo modelo que utiliza somente parâmetros clínicos. Dentre os 28 pacientes com idade acima de dois anos, 26 foram classificados pelo modelo clínico e laboratorial e dois pelo modelo clínico. Entre os 48 pacientes do estudo, apenas um (2,1%) obteve pontuação superior ao limite proposto pelo MS, apresentando, assim, risco aumentado para evolução para óbito. À avaliação inicial, o paciente estava edemaciado, icterico e com aminotransferases de valor superior a 100 UI/L, além de ser lactente jovem (sete meses de idade).

Aplicando o escore prognóstico proposto por Sampaio et al., 11 pacientes (22,9%) atingiram pontuação preditora de evolução fatal à admissão hospitalar.

4.8.2 Tratamento específico em pacientes com critérios de gravidade ou pontuação preditora de óbito à admissão

Entre os nove pacientes considerados graves pelo critério do MS-2006, três realizaram tratamento completo com Glucantime®. Em seis, foi administrado inicialmente anfotericina B desoxicolato, sendo necessária a troca para anfotericina B lipossomal em dois destes pacientes – em um, devido à piora das escórias renais e, em outro, por decisão da equipe assistente (lactente com cinco meses de idade).

A única criança que atingiu pontuação superior ao limite no escore do MS-2011, apresentando, assim, maior risco de evolução para óbito, recebeu tratamento com anfotericina B desoxicolato.

Entre os 11 pacientes com pontuação preditora para evolução fatal pelo escore proposto por Sampaio et al., quatro receberam tratamento completo com Glucantime®. Em sete, administrou-se inicialmente anfotericina B desoxicolato; contudo, em um foi realizada troca para anfotericina B lipossomal por decisão da equipe assistente (lactente com cinco meses de idade).

4.8.3 Evolução grave: definição e aplicação de critérios de gravidade e escores preditores de óbito

Durante o período de internação hospitalar, 16 pacientes (33,3%) preencheram o critério de evolução grave: 11 devido a hemotransfusão, três devido

a hemotransfusão e internação em UTI, um por internação em UTI e necessidade de VM e um por hemotransfusão, internação em UTI e necessidade de VM e aminas (Figura 8).

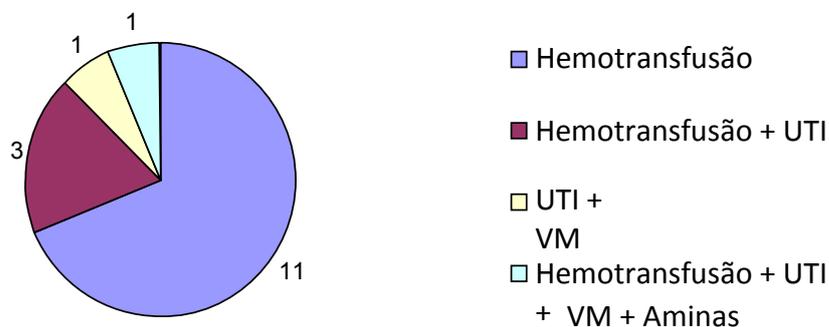


Figura 8 - Distribuição, de acordo com intervenções instituídas, dos 16 pacientes internados por LV que apresentaram evolução grave no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011.

Avaliou-se o critério de gravidade à admissão hospitalar do MS-2006 como um teste preditor de evolução grave durante a internação. Quatro pacientes classificados como graves pelo MS-2006 não exigiram nenhuma intervenção característica da evolução grave. Onze crianças que não foram consideradas graves pelo MS-2006 necessitaram, ao longo da internação, das intervenções mais invasivas, caracterizando-as como de evolução grave.

Deste modo, observou-se sensibilidade de 31,2%, especificidade de 87,5%, VPP de 55,5% e VPN de 71,8% do critério de gravidade do MS-2006, considerando-o como teste preditor de evolução grave.

Aplicando-se os escores preditores para óbito do MS-2011 e de Sampaio et al. na coorte estudada, foi possível calcular apenas a especificidade e o VPN, uma vez que nenhum paciente apresentou evolução fatal. A especificidade do modelo preditor de risco para óbito proposto pelo MS-2011 foi de 97,9% e seu VPN foi de 100%. A especificidade do sistema de pontuação elaborado por Sampaio et al. foi de 77,1% e seu VPN de 100%.

4.8.4 Número de cópias de SSU rRNA, critérios de gravidade e escores preditores de óbito à admissão hospitalar e evolução grave durante a internação

O número de cópias de SSU rRNA em T0 (antes do início do tratamento) foi comparado entre as categorias das diferentes classificações de gravidade e escores preditores de óbito.

Quando utilizado o critério de gravidade do MS-2006 à admissão, não foi observada diferença significativa na carga parasitária entre os pacientes classificados como graves (nove crianças) e não graves (39 crianças) (teste de Mann-Whitney – $p = 0,47$).

A única criança que atingiu pontuação acima do limite no escore do MS-2011 apresentava número de cópias de SSU rRNA superior à mediana. Contudo, não foi constatada diferença significativa entre o número de cópias do fragmento gênico do parasito desta criança e o dos demais 47 participantes do estudo (teste de Mann-Whitney – $p = 0,14$).

As 11 crianças que obtiveram pontuação preditora para óbito pelo escore proposto por Sampaio et al., de acordo com características apresentadas à admissão hospitalar, não tiveram carga parasitária diferente da dos demais 37 pacientes (teste de Mann-Whitney – $p = 0,78$).

Classificando os pacientes pelo critério proposto no presente estudo, os 16 que evoluíram com gravidade durante a internação não tinham, em T0, número de cópias de SSU rRNA significativamente diferente dos outros 32 (teste de Mann-Whitney – $p = 0,08$).

As médias, os DP e as medianas do número de cópias de SSU rRNA em T0, estratificados por grupos pela classificação de gravidade do MS-2006 à admissão, pelo escore preditor de óbito de Sampaio et al. também à admissão e pelo critério de evolução grave durante a internação hospitalar proposto no presente estudo estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Médias, DP e medianas do número de cópias de SSU rRNA em T0 (antes do início do tratamento) dos 48 pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011, de acordo com o critério de gravidade do MS-2006, o escore preditor de óbito de Sampaio et al. e a classificação de evolução grave proposta pelo presente estudo

Classificação	Grave*		Não grave**	
	Média (± DP)	Mediana	Média (± DP)	Mediana
MS-2006	4.484 (± 7.459)	844	10.574.191 (± 62.315.329)	1.702
Sampaio et al.	5.007 (± 7.844)	1.899	11.145.371 (± 63.971.830)	1.622
Evolução	3.124 (± 5.756)	640	12.886.995 (± 68.769.824)	2.314

*Grave: pacientes classificados como graves ou com pontuação preditora de óbito

** Não grave: pacientes classificados como não graves ou sem pontuação preditora de óbito

As duas crianças que apresentaram carga parasitária acima da média em T0 não preencheram o critério de gravidade do MS-2006 nem atingiram pontuação preditora de óbito nos escores avaliados à admissão hospitalar. Estes pacientes também não apresentaram evolução grave ao longo da internação.

Das 11 crianças que persistiam com carga parasitária positiva em T1 (10 a 15 dias após início do tratamento), apenas duas (18,2%) foram classificadas como graves pelos critérios do MS-2006 à admissão. Quando se avaliou de acordo com o critério evolutivo proposto, outros dois pacientes (18,2%) apresentaram evolução grave durante a internação hospitalar.

Entre os quatro doentes que permaneceram com material genético do parasito detectável em T2 (40 a 60 dias após início do tratamento), apenas um (25%) foi classificado como grave pelo MS-2006 na admissão e dois (50%) evoluíram com gravidade ao longo da internação hospitalar.

A única criança que atingiu pontuação preditora de óbito pelo escore MS-2011 voltou a apresentar carga parasitária positiva em T2, após tê-la negativado em T1.

4.8.5 Fatores de risco para evolução grave

Com a finalidade de prever a evolução grave ainda à admissão hospitalar, foram avaliadas características demográficas, clínicas e laboratoriais observadas

antes do início do tratamento (T0) que pudessem apontar para maior risco deste desfecho (Tabela 18).

Idade menor que 12 meses, taquidispneia, infecção bacteriana, fígado com medida ajustada por SC superior a 10 cm, hemoglobina menor ou igual a 7 mg/mm³, plaquetas menores ou iguais a 50.000 unidades/mm³ e albumina sérica com valor inferior a 2,5 g/dL foram fatores de risco para evolução grave. Icterícia, apesar de ter apresentado risco relativo com intervalo de confiança superior a um, não foi considerada fator de risco devido à ausência de significância estatística (valor de p= 0,11), possivelmente pela presença de zero em uma das caselas. A carga parasitária, mesmo utilizando-se diferentes pontos de corte para se caracterizar os grupos com carga alta e baixa, não se associou à evolução grave.

Tabela 18 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais como fatores de risco para evolução grave em pacientes internados por LV no HIJPII, de junho de 2010 a junho de 2011

Fatores	N	Evolução grave		Valor p	RR (IC 95%)	
		Sim	Não			
Idade ≤ 12 meses	48	Sim	6	1	0,01*	3,51 (1,89-6,52)
		Não	10	31		
Tempo de doença ≥ 60 dias	48	Sim	2	3	1,00*	1,23 (0,39-3,90)
		Não	14	29		
Desnutrição grave ou moderada	48	Sim	1	2	1,00*	1,00 (0,19-5,22)
		Não	15	30		
Diarréia	47	Sim	5	9	0,74*	1,18 (0,49-2,82)
		Não	10	23		
Vômitos	47	Sim	9	17	0,66	1,21 (0,51-2,86)
		Não	6	15		
Sangramentos (exceto cutâneos)	48	Sim	1	6	0,40*	0,39 (0,60-2,50)
		Não	15	26		
Icterícia	48	Sim	2	0	0,11*	3,29 (2,12-5,09)
		Não	14	32		
Edema	48	Sim	6	5	0,14*	2,02 (0,95-4,30)
		Não	10	27		
Taquidispneia	48	Sim	3	0	0,03*	3,46 (2,19-5,47)
		Não	13	32		
Infecção bacteriana	48	Sim	11	9	0,01	3,08 (1,27-7,48)
		Não	5	23		
Fígado ajustado por SC ≥ 10 cm	48	Sim	8	4	0,01*	3,00 (1,44-6,23)
		Não	8	28		
Baço ajustado por SC ≥ 10 cm	48	Sim	13	19	0,13	2,17 (0,72-6,53)
		Não	3	13		
Hemoglobina ≤ 7 mg/mm ³	48	Sim	11	7	0,01	3,67 (1,52-8,85)
		Não	5	25		
Plaquetas ≤ 50.000 unid/mm ³	48	Sim	6	3	0,04*	2,60 (1,28-5,27)
		Não	10	29		
Leucócitos ≤ 1.500 cél/mm ³	48	Sim	1	2	1,00*	1,00 (0,19-5,22)
		Não	15	30		
Neutrófilos ≤ 500 cél/mm ³	48	Sim	3	2	0,32*	1,98 (0,85-4,63)
		Não	13	30		
Atividade de protrombina ≤ 70%	41	Sim	10	16	0,74	1,15 (0,49-2,74)
		Não	5	10		
AST ou ALT ≥ 100 UI/L	44	Sim	4	10	1,00*	0,86 (0,32-2,26)
		Não	10	20		
Bilirrubina total ≥ 1,0 mg/dL	40	Sim	3	2	0,32*	1,91 (0,80-4,54)
		Não	11	24		
Albumina ≤ 2,5 g/dL	44	Sim	14	8	<0,0001	7,00 (1,80-27,24)
		Não	2	20		
Clearance de creatinina <60 mL/min/1,73m ²	43	Sim	1	1	1,00*	1,58 (0,38-6,77)
		Não	13	28		
Cópias de SSU rRNA ≥ 3 log ₁₀ +1	48	Sim	1	7	0,15	0,56 (0,25-1,24)
		Não	15	25		
Cópias de SSU rRNA ≥ 4 log ₁₀ +1	48	Sim	4	4	0,24*	0,33 (0,05-2,18)
		Não	23	17		

*Utilizado teste exato de Fisher.

Os valores p que evidenciam diferença significativa (p <0,05) estão em negrito.

O presente estudo teve como proposta acompanhar a apresentação e a evolução clínica e laboratorial de crianças internadas por LV no HJJP, instituição de referência em doenças infecciosas em pediatria em MG. Concomitantemente, avaliou-se a dinâmica da carga parasitária nestes pacientes ao longo do curso da doença, visando melhor compreensão da sua fisiopatologia.

O número de casos de LV em menores de 14 anos residentes da cidade de BH foi de 33 em todo o ano de 2010 e de 18 até a primeira semana de dezembro de 2011 (Prefeitura de Belo Horizonte, 2011). Na região metropolitana, foram notificados 94 casos em 2010 e 51 em 2011, considerando-se esta mesma faixa etária (Camila Freitas, Superintendência Regional de Saúde de Belo Horizonte, Secretaria Estadual de Saúde – comunicação pessoal). Apesar de corresponderem à faixa etária diferente da exigida para inclusão de pacientes no estudo (menores de 12 anos), estes dados sugerem que o número de crianças avaliadas no estudo (48 pacientes) é representativo dos casos pediátricos de LV ocorridos ao longo de um ano, entre 2010 e 2011, em residentes da região metropolitana de BH.

Deve-se destacar que se tratou de estudo prospectivo, sendo as avaliações realizadas por equipe médica pequena. Mais de 90% dos exames clínicos foram executados pela mesma profissional, gerando dados comparáveis.

A maioria dos pacientes avaliados tinha menos de cinco anos de idade (77,1%), o que é descrito em estudos brasileiros (Campos Jr, 1995; Pastorino et al., 2002; Pedrosa, Rocha, 2004; Queiroz et al., 2004; Rey et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Prado et al., 2011; Rocha et al., 2011) e de outras regiões (Cascio et al., 2002a; Petrela et al., 2010; Pace et al., 2011). A população na faixa etária pediátrica é considerada mais susceptível à evolução para doença após infecção e, em áreas endêmicas como MG, é esperado que a maioria dos casos ocorra em crianças jovens, ainda suscetíveis ao parasito (Badaró et al., 1986a; Davies, Mazloumi Gavgani, 1999; Costa, 2008).

A discreta predominância do sexo masculino entre os incluídos no estudo também foi observada em outras séries pediátricas (Pastorino et al., 2002; Cascio et al., 2002a; Oliveira et al., 2006; Braga, 2007; Costa, 2009). Este dado difere do maior número de homens acometidos pela LV na idade adulta, possivelmente devido à maior exposição ao flebótomo em atividades laborais e à vulnerabilidade devido a fatores hormonais (Snider et al., 2009; Harhay et al, 2011).

O tempo de sintomas prévio à admissão hospitalar (média de 26 dias; mediana de 15 dias) foi maior do que o relatado em série de crianças com LV na

Itália (Cascio et al., 2002a), mas menor do que o descrito em hospital pediátrico na Albânia (Petrela et al., 2010) e do que os relatados em estudos brasileiros em hospitais das cidades de São Paulo (Pastorino et al., 2002), Fortaleza (Rey et al., 2005), Recife (Queiroz et al., 2004), Três Lagoas (MS) (Oliveira et al., 2006), Maceió (Pedrosa, Rocha, 2004) e Brasília (Campos Jr, 1995). Em pacientes internados entre 2001 e 2005 no mesmo serviço de Belo Horizonte, a duração média do quadro antes da hospitalização foi de 30,5 dias, número próximo ao observado entre os casos internados do presente estudo, realizado entre 2010 e 2011 (Braga, 2007). A persistência deste intervalo entre início de sintomas e hospitalização aponta para a necessidade de capacitação de profissionais de saúde em MG, visando suspeição do quadro de LV em momento mais precoce, o que, possivelmente, reduziria a necessidade de internação e a evolução mais grave de muitas crianças.

O quadro clínico das crianças hospitalizadas no HIJPII foi semelhante ao relatado na literatura (Campos Jr, 1995; Cascio et al., 2002a; Pastorino et al., 2002; Pedrosa, Rocha, 2004; Queiroz et al., 2004; Rey et al., 2005; Braga, 2007; Petrela et al., 2010; Rocha et al., 2011). Os sintomas mais relatados por familiares foram febre (100%), palidez (87,5%), distensão abdominal (81,2%) e prostração (81,2%) e, ao exame físico na primeira avaliação, foi observada palidez e detectada hepatomegalia ou esplenomegalia em todos os pacientes. A presença de fígado ou baço aumentados, juntamente com a febre, era previamente esperada na totalidade das crianças, já que eram os critérios clínicos de inclusão no estudo. Ressalta-se que a presença de palidez foi subestimada e a de prostração mais frequentemente relatada pelos responsáveis, quando comparadas às observações do exame físico, apontando a subjetividade de percepção destes sinais. Diante de quadro inespecífico de febre e acometimento do estado geral, especialmente nas áreas endêmicas, a distensão abdominal, citada pelos responsáveis na maioria dos casos, deve ser questionada sistematicamente e pode acrescentar à suspeição do diagnóstico de LV.

Conforme proposto pela OMS, em menores de cinco anos optou-se por utilizar a medida de peso por estatura para diagnóstico de desnutrição, uma vez que este parâmetro relaciona-se ao estado recente de nutrição. Para maiores de cinco anos, foi usado o IMC, com este mesmo intuito. A avaliação da estatura por idade, por sua vez, permitiu inferência sobre a cronicidade de acometimento do crescimento (Waterlow, 1972; World Health Organization, 1999; Keane, 2007; World Health Organization and United Nations Children's Fund, 2009). Em sua

classificação, a OMS sugere, ainda, que todo paciente com edema bilateral seja classificado como desnutrido grave, uma vez que o peso encontra-se superestimado nesta situação. Contudo, em pacientes com LV, o edema apresenta causas múltiplas, decorrendo também do comprometimento prolongado da função de produção hepática de albumina, que leva à hipoalbuminemia sérica, menor pressão oncótica intravascular e conseqüente extravasamento de fluidos para o terceiro espaço (Gangneux et al., 2006). Deste modo, o critério de edema para classificação da desnutrição deve ser avaliado com restrição em pacientes com esta parasitose.

Apesar do emprego de diferentes critérios nas publicações, no presente estudo observou-se percentual de desnutridos (6,3%) próximo ao relatado em estudo italiano (15,3%) (Cascio et al., 2002a) e inferior ao descrito em séries brasileiras (26% a 66%) (Campos Jr, 1995; Pastorino et al., 2002; Queiroz et al., 2004; Rey et al., 2005; Braga, 2007). Tal fato pode estar relacionado às melhores condições socioeconômicas na região sudeste do Brasil e aos programas de transferência de renda recentemente implantados no país, ambos impactando na ingesta calórica de crianças (Victoria et al., 2011). Diferentemente, verificou-se semelhança do valor médio da albumina sérica das crianças internadas no HIJPII (2,4 g/dL) com as relatadas em estudos de Brasília (Campos, 1995) e de São Paulo (envolvendo principalmente imigrantes nordestinos) (Pastorino et al., 2002), que foram inferiores ao das crianças italianas (Cascio et al., 2002a). Tal dado sugere uma outra hipótese, considerando que o peso menos comprometido dos pacientes estudados em Belo Horizonte se deva à ingestão predominantemente de carboidratos, mais facilmente disponíveis para camadas sociais menos favorecidas, e não de fontes de proteínas, usualmente mais caras e de aquisição menos frequente por esta população.

Ainda é discutido o impacto da desnutrição na evolução para doença a partir da infecção e no desenvolvimento de formas graves de LV (Caldas et al., 2002; Costa, 2009). É reconhecido que a desnutrição pode comprometer as respostas imunes inatas e adaptativas, essenciais ao controle deste quadro infeccioso. Contudo, a elaboração destas respostas pelo organismo leva a catabolismo adicional, com comprometimento do estado nutricional (Harrison et al., 1986; Pearson et al., 1992; Malafaia, 2009). No presente estudo, a desnutrição não se associou à evolução grave, mas este resultado não deve ser interpretado como conclusivo devido ao pequeno número de pacientes com esta comorbidade.

As solicitações de exames laboratoriais complementares ficaram a cargo da equipe médica assistente, não sendo influenciadas pelo protocolo da pesquisa. Alguns exames, apesar de solicitados, não foram realizados por ausência temporária de reagentes, o que, lamentavelmente, ocorre com alguma freqüência no HIJPII. Deste modo, observou-se variação no número de dados disponíveis e restrição de comparações entre resultados de exames laboratoriais. Apenas o hemograma foi realizado na totalidade dos pacientes à admissão hospitalar. Observou-se, em alguns casos, ausência de exames que avaliam função hepática (aminotransferases, atividade de protrombina, bilirrubinas, albumina e globulina) e renal (creatinina), cujas realizações são indicadas pelo MS em todos os doentes hospitalizados (Brasil, 2006b). Tais dados apontam para a necessidade de capacitação permanente da equipe assistencial, mesmo em serviços de referência como o HIJPII, e de estrutura laboratorial adequada à atenção destes pacientes.

As alterações laboratoriais observadas estavam de acordo com as descritas para quadros clássicos de LV: pancitopenia, inversão da relação entre albumina e globulina, elevação de aminotransferases hepáticas e alteração das provas de coagulação sanguínea (Brasil, 2006b). A média do valor de hemoglobina ($7,5 \text{ mg/mm}^3$) foi semelhante à de estudo na Sicília (Itália) ($7,8 \text{ mg/mm}^3$) (Cascio et al., 2002a), em Tirana (Albânia) ($7,0 \text{ mg/mm}^3$) (Petrela et al., 2010), em Brasília ($7,3 \text{ mg/mm}^3$) (Campos Jr, 1995) e em série anterior do mesmo hospital em BH ($7,3 \text{ mg/mm}^3$) (Braga, 2007), mas superior à relatada em Fortaleza ($6,2 \text{ mg/mm}^3$) (Rey et al., 2005), Recife ($6,1 \text{ mg/mm}^3$) (Queiroz et al., 2004) e São Paulo ($6,9 \text{ mg/mm}^3$) (estudo envolvendo principalmente imigrantes nordestinos) (Pastorino et al., 2002). Valores médios de leucócitos totais ($3.785 \text{ células/mm}^3$), neutrófilos ($1.354 \text{ células/mm}^3$) e plaquetas ($99.270 \text{ unidades/mm}^3$) inferiores aos valores de referência foram relatados; contudo, assemelharam-se aos apresentados por crianças de outras séries (Campos Jr, 1995; Cascio et al., 2002a; Pastorino et al., 2002; Queiroz et al., 2004; Rey et al., 2005; Braga, 2007; Petrela et al., 2010). Ressalta-se que as médias das aminotransferases (AST de 168 UI/L e ALT de 78 UI/L) no presente estudo foram semelhantes às descritas anteriormente no mesmo serviço (AST de $90,3 \text{ UI/L}$ e ALT de $69,3 \text{ UI/L}$) (Braga, 2007), mas superiores a de série da Itália (AST de 53 UI/L e ALT de 33 UI/L) (Cascio et al., 2002a) e a de Brasília (AST de $50,97 \text{ UI/L}$ e ALT de $27,89 \text{ UI/L}$) (Campos Jr, 1995). Sugere-se, assim, lesão de hepatócitos mais intensa pela cepas circulantes em MG, o que apresenta importância especialmente na doença em menores de dois anos, faixa etária para a qual elevação de

aminotransferases superior a 100 UI/L é considerada fator de risco para óbito pelo escore do MS-2011 (Brasil, 2011b).

O intervalo entre a admissão hospitalar e a confirmação do diagnóstico de LV (1,2 dia) foi menor do que o relatado em Fortaleza (6 dias) (Rey et al., 2005) e do que o do HIJPII entre 2001 e 2005 (3,5 dias) (Braga, 2007), aproximando-se do encontrado em estudo italiano (2 dias) (Cascio et al, 2002a). Provavelmente, a diminuição deste intervalo foi devido à introdução de testes imunocromatográficos que utilizam o antígeno recombinante rk39 (Kalazar Detect® e Diamed-IT Leish®.) na investigação diagnóstica de LV.

Desde maio de 2010, kits do teste rápido Kalazar Detect® foram fornecidos pelo MS e distribuídos pela Prefeitura Municipal de BH a hospitais de referência (inclusive ao HIJPII) e a unidades de pronto atendimento. Concomitantemente, foi iniciado o presente estudo, que propôs a utilização do teste Diamed-IT Leish® em casos suspeitos de LV. Deste modo, otimizou-se a realização do diagnóstico laboratorial e houve a possibilidade de comparação da validade destes exames em serviço assistencial.

Maior positividade foi observada com o teste imunocromatográfico Diamed-IT Leish® (100%), resultado que está de acordo com a avaliação multicêntrica da OMS, na qual a maior sensibilidade foi observada com este teste (92,0%) (World Health Organization, 2011b). Estudo multicêntrico também confirmou a alta sensibilidade do Diamed-IT Leish® (93%) no Brasil (de Assis et al., 2011). Quanto ao Kalazar Detect®, sua positividade de 85,4% ficou próxima aos valores de sensibilidade descritos na avaliação da OMS (84,7%) (World Health Organization, 2011b) e em séries no Irã (82,4%) (Alborzi et al., 2006), Uganda (82,0%) (Chappuis et al., 2005) e Quênia (84,7%) (Boelaert et al., 2008). Foi, contudo, inferior às sensibilidades relatadas em pacientes de Montes Claros (MG) e Vitória (90%) (Carvalho et al. 2003) e em crianças hospitalizadas em Barcelona (96%) (Cruz et al., 2006).

Deve-se ressaltar, ainda, a possibilidade de uso de sangue total, coletado por punção digital à beira do leito, para utilização no kit Diamed-IT Leish®. Para o Kalazar Detect®, há necessidade de centrifugação da amostra e de pipetas para obtenção de soro. Apesar de não configurarem restrições para seu uso no HIJPII, as demandas para uso deste último teste são limitações a serem consideradas em serviços com menor estrutura laboratorial.

A baixa positividade da RIFI (66,7%) é dado relevante e difere da sensibilidade observada em estudo brasileiro (92,0%) (Pedras et al., 2008) e de resultados de pesquisa anterior no HIJPII entre 2001 e 2005 (95,9%) (Braga, 2007).

Considerando que este método sorológico é o teste diagnóstico sugerido e disponibilizado pelo MS para o sistema de laboratórios públicos do país, sua sensibilidade oscilante pode levar a atrasos no esclarecimento de quadros sugestivos da doença e na instituição de terapêutica adequada. Cabe comentar, ainda, a orientação do MS que sugere repetição da RIFI em nova amostra após 30 dias de resultado igual a 1:40 (Brasil, 2006a). Entendendo a LV como doença sistêmica grave e potencialmente letal, o prazo de 30 dias é demasiado longo para se aguardar a elucidação diagnóstica e, no HIJPII, optou-se por repetir a RIFI em prazo mais curto e, concomitantemente, utilizar outros exames (pesquisa direta em aspirado de MO e PCR em sangue periférico) para este fim.

Entre os pacientes não participantes do estudo LV Brasil, apenas quatro realizaram exames diagnósticos além da pesquisa de anticorpos específicos. Tal propedêutica difere da relatada em estudos no Brasil e na Europa (Campos Jr, 1995; Cascio et al., 2002a; Pastorino et al., 2002; Queiroz et al., 2004; Rey et al., 2005; Petrela et al., 2010), onde a pesquisa direta do parasito em aspirado de MO foi exame de primeira linha. Contudo, apóia-se nas diretrizes do MS, que consideram caso confirmado de LV o paciente procedente de área endêmica com quadro clínico sugestivo e RIFI ou teste rápido positivo (Brasil, 2011b). No HIJPII, a punção de MO é realizada somente em casos de diagnóstico duvidoso.

Nos pacientes participantes do estudo LV Brasil, nos quais foi realizada propedêutica mais extensa, observou-se pequena positividade da mielocultura (18,2%), discrepante da pesquisa direta do parasito em aspirado de MO (81,8%). Em estudos na Sicília (Itália) (Cascio et al., 2002a) e em São Paulo (Pastorino et al., 2002), também houve maior positividade na pesquisa direta do parasito do que na mielocultura. Diferença tão significativa, semelhante à do presente estudo, foi relatada em Três Lagoas (MS), onde se observou positividade da pesquisa direta de 90,6% e da mielocultura de 23% (Oliveira et al., 2006). Contrariamente, em estudo na Índia houve maior sensibilidade da cultura (97,8%), quando comparada ao exame direto (60%) (Sinha et al., 1993). Como não se trata de procedimento executado na rotina do HIJPII, é possível que tenham ocorrido dificuldades técnicas para a coleta de material adequado nestes casos, com amostras muito diluídas.

Alta positividade do PCR em sangue periférico e em MO foi relatada em estudos na Itália (100% tanto para amostras de sangue periférico quanto para amostras de MO) (Cascio et al., 2002b) e em Campo Grande (95,6% em sangue periférico e 91,1% em MO) (Fraga et al., 2010), o que foi comprovado na presente casuística (100% de positividade tanto para amostras de sangue periférico quanto para amostras de MO).

Questiona-se o emprego de métodos parasitológicos, com amostras obtidas a partir de punção de MO ou de baço, como base para a propedêutica da LV na maior parte das áreas endêmicas. Tais procedimentos são invasivos e dolorosos e a punção esplênica leva a risco de sangramento nos pacientes que apresentam distúrbios de coagulação, condição muito frequente naqueles com suspeita de parasitose (Werneck et al., 2003). Além disso, a pesquisa direta é dependente de examinador experiente e a cultura também exige equipe com destreza na coleta de material adequado. O presente estudo aponta para a utilização dos testes rápidos no diagnóstico de casos iniciais da doença, sendo possível o emprego da PCR em sangue periférico em recidivas ou casos duvidosos, tendo em vista a sensibilidade elevada deste método. O manual mais recente do MS já coloca os testes imunocromatográficos, juntamente com a RIFI, como critério de confirmação laboratorial, mas mantém a indicação de realização de punção de MO em todos os casos suspeitos da doença (Brasil, 2011b).

Todas as comparações realizadas entre os métodos diagnósticos empregados em regiões distintas devem ser avaliadas com certa restrição, uma vez que é necessário considerar as variações de acesso à propedêutica e qualidade de sua execução, específicas para cada local, além das diferenças de espécies de *Leishmania* envolvidas na doença. Em especial, devem-se ressaltar as diferenças de comportamento entre a *L. (L.) infantum*, prevalente na América, Europa e Ásia Central, e a *L. (L.) donovani*, agente etiológico da LV no subcontinente indiano e no leste africano. É bem documentado que os testes rápidos, independentemente de marca, apresentam maior sensibilidade nos pacientes do subcontinente indiano (World Health Organization, 2011b).

Nos 37 pacientes não incluídos no estudo LV Brasil, a indicação de tratamento seguiu, de um modo geral, as orientações do MS de 2006, que preconizam a anfotericina B desoxicolato como medicação de escolha para pacientes que preencham o critério de gravidade proposto no manual (Brasil, 2006b). Possivelmente, esta orientação mais recente justificou a menor utilização do

Glucantime® como terapêutica inicial nos pacientes do HIJPII em 2010 e 2011 (64,9%), quando comparado às séries brasileiras anteriores, incluindo a do mesmo serviço entre os anos de 2001 e 2005 (93,6% a 100%) (Campos, 1995; Pastorino et al., 2002; Queiroz et al., 2004; Rey et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Braga, 2007).

Três pacientes com critérios de gravidade pelo MS-2006 receberam Glucantime® como tratamento efetivo e evoluíram com melhora, sem necessidade de troca de esquema terapêutico. Situação semelhante foi descrita em hospital universitário de Campo Grande, em que 11 pacientes graves pelo critério do MS-2006 foram tratados com antimonial, porém com um óbito e necessidade de troca de esquema em outras três crianças. O achado deste último estudo corroborou, assim, a indicação da anfotericina B desoxicolato nestes casos (Brustoloni et al., 2010). A única paciente que atingiu pontuação preditora de óbito no escore do MS-2011 foi tratada com anfotericina B desoxicolato. Entretanto, ressalta-se que, a despeito da proposição do escore, neste último manual não há clareza na indicação de esquemas terapêuticos preferenciais para os pacientes com maior risco de evolução fatal, provavelmente pela escassez de literatura para embasá-la.

Com relação às trocas de medicação realizadas, observou-se sua relativa precocidade (média de 3,2 dias quando medicação inicial foi Glucantime® e de 6,0 dias quando medicação inicial foi anfotericina B desoxicolato), sugerindo que estas alterações foram baseadas mais provavelmente em reavaliação e mudança de conduta diante do quadro clínico inicial e não consistiam em resposta à falha terapêutica. O paciente que necessitou de troca para anfotericina B lipossomal devido à nefrotoxicidade da anfotericina B desoxicolato configura exceção a esta observação.

Em um lactente de cinco meses, a equipe assistencial optou por administrar anfotericina B lipossomal após suspensão da anfotericina B desoxicolato, que é a medicação indicada para crianças menores de seis meses (Brasil, 2011b). Apesar de não estar apoiada pelas orientações do MS, esta conduta foi respaldada pela menor toxicidade e necessidade de menor tempo de internação para tratamento da LV com o uso da formulação lipossomal (Bern et al., 2006), associada à disponibilidade e acesso fácil a ela no município de BH.

A resolução da febre ocorreu, em média, três dias após instituição de medicação específica, o que está de acordo com o descrito em manual do MS e com resultados de séries pediátricas (três a dez dias) (Pastorino et al., 2002; Cascio et al., 2002a; Queiroz et al., 2004; Brasil, 2006a).

Resposta clínica, com menores percentuais de prostração, edema, petéquias e equimoses, foi evidenciada em T1 (entre 10 e 15 dias após tratamento), comprovando que a eficácia dos esquemas terapêuticos específicos é ponto a ser observado nas avaliações clínicas sequenciais, ainda que o tratamento não tenha sido ainda administrado na dose total preconizada (Brasil, 2006a).

Em T1 e T2 (40 a 60 dias após início do tratamento), a persistência da palidez, indicativo da anemia, reflete suas causas múltiplas. Apesar de seu aumento significativo, à alta hospitalar ainda observou-se valor médio da hemoglobina inferior ao de referência, muito provavelmente devido à ferropenia, já descrita em crianças com LV em BH (Braga, 2007). Deste modo, são necessários investigação da carência deste elemento e tratamento com suplemento em casos específicos, visando recuperação completa da anemia e da palidez. Diferentemente, os valores de plaquetas, leucócitos e neutrófilos já haviam atingido a normalidade no momento da liberação hospitalar.

Em T1, a persistência da icterícia, indicando manutenção da hiperbilirrubinemia nas duas crianças que apresentavam este sinal em T0 (antes do início da medicação), é justificada pela resolução mais lenta desta anormalidade em quadros de acometimento hepático (Kader, Balistreri, 2007). Ressalta-se a melhora da atividade inflamatória no fígado à alta, demonstrada pelas médias das aminotransferases dentro dos valores de referência à alta hospitalar. A ausência significativa (maior de 50%) de informações sobre os valores de bilirrubina, albumina e globulina à alta hospitalar impossibilitou a comparação com valores da admissão. Contudo, esta ausência não teve impacto na condução dos casos, entendendo-se que a recuperação da hiperbilirrubinemia e da inversão entre albumina e globulina se dá mais tardiamente (Brasil, 2006a).

Observou-se diminuição discreta do número de pacientes que apresentavam visceromegalias em T1. Em T2, constatou-se, ainda, percentual significativo de crianças com hepatomegalia (61,9%) e esplenomegalia (52,4%), apesar de redução estatisticamente significativa da média do tamanho de ambos os órgãos. Houve redução de 40,3% do fígado e 52,8% do baço neste último momento, tendo como base T0. De acordo com as observações de Pedrosa et al., a diminuição de tamanho das vísceras ocorreria mais rapidamente em pacientes com menor tempo de evolução de doença (Pedrosa, Rocha, 2004). A demora de redução das visceromegalias das crianças internadas no HIJPII entre 2010 e 2011, cujo tempo de sintomas foi inferior ao de outros estudos nacionais (Campos Jr, 1995; Pastorino et

al., 2002; Pedrosa, Rocha, 2004; Queiroz et al., 2004; Rey et al., 2005; Oliveira et al., 2006), não confirma estas observações.

Há relatos de redução de fígado entre 20,8% e 54,0% e de baço entre 37,3% e 63,2%, considerando-se seus tamanhos absolutos à admissão e à alta hospitalar (Pastorino et al., 2002; Pedrosa, Rocha, 2004; Rey et al., 2005; Caldas et al., 2006). Contudo, comparações dos dados do presente estudo com estas casuísticas devem ser elaboradas criteriosamente, uma vez que, no primeiro, foram analisadas as medidas das vísceras ajustadas por SC entre T0 e T2 (40 a 60 dias após início do tratamento), momento em que a grande maioria das crianças já havia terminado o tratamento há algum tempo e encontrava-se no domicílio. Optou-se pelo emprego de medidas de fígado e baço ajustadas por SC, já utilizado em outro estudo de casos de LV (Costa, 2009), devido à grande variação de idade, peso e estatura dos pacientes avaliados, o que dificultaria a interpretação e comparação dos valores absolutos.

Percentual significativo das crianças (64,6%) apresentou infecção em algum momento de sua evolução. A maior parte das infecções presentes à admissão foi classificada como neutropenia febril sem foco identificado (16 casos - 33,3% do total de pacientes) e, entre as hospitalares, a pneumonia e as IVAS foram as mais frequentes (seis pacientes – 12,5% do total de pacientes).

A definição de neutropenia febril em pacientes com LV é bastante complexa, uma vez que a febre e a pancitopenia, incluindo neutropenia, são características da doença. Além disso, a situação clínica e imunológica de pacientes oncológicos com neutropenia secundária à quimioterapia difere significativamente da dos pacientes com a parasitose, não havendo estudos que validem a aplicação das diretrizes propostas para os primeiros naqueles com LV (Freifeld et al., 2011). Contudo, como os quadros infecciosos estão associados à evolução grave e óbito (Barati et al., 2008; Sampaio et al., 2010; Costa et al., 2010), o MS recomenda administração de antibióticos para todos os doentes com neutropenia inferior a 500 células/mm³ (Brasil, 2011b).

No HIJPII, estas recomendações são seguidas e, dependendo das condições gerais do paciente, eventualmente o antimicrobiano é introduzido mesmo com valores de neutrófilos acima deste limite. Neste estudo, por definição, a administração de antibiótico por indicação clínica foi considerada como indicativo de infecção, ainda que na ausência de comprovação microbiológica. É possível que esta definição, juntamente com a conduta de introdução precoce de antibióticos,

justifique o maior percentual de infecções relatado neste hospital de BH, tanto à admissão quanto durante a internação hospitalar, quando comparado à literatura (10,8% a 52,5%) (Cascio et al., 2002a; Pastorino et al., 2002; Pedrosa, Rocha, 2004; Rey et al., 2005). Em estudo retrospectivo no Piauí, neutropenia aumentou a chance de evolução para óbito, sugerindo-se que a pesquisa de quadro infeccioso e a introdução empírica de antimicrobiano sejam precoces nestes casos, o que respalda a conduta adotada no HIJPII (Costa et al., 2010).

Em estudos na Itália (Cascio et al., 2002), Recife (Queiroz et al., 2004), São Paulo (Pastorino et al., 2002), Maceió (Pedrosa, Rocha, 2004) e Fortaleza (Rey et al., 2005; Rocha et al., 2011), o sítio mais freqüente de infecção foi o pulmão. Excetuando-se os casos de neutropenia febril, a pneumonia também apresentou a maior freqüência entre os quadros infecciosos no presente estudo. Deve-se atentar para a limitação da definição de pneumonia da OMS nestes casos, na qual apenas a presença de febre, tosse e taquipneia são definidoras deste quadro (Singh, Aneja, 2011). A febre é sinal muito inespecífico e a tosse e a taquipneia podem resultar de pneumonite intersticial relacionada à LV (Duarte et al., 1989; Tuon et al., 2009) e de restrição torácica causada por hepatosplenomegalia volumosa. Deste modo, está justificada a orientação do MS sobre solicitação de radiografia de tórax à admissão de pacientes com LV, uma vez que o exame poderá ser útil para definição de infecção pulmonar neste momento ou como parâmetro de comparação no caso de suspeita diagnóstica de tal quadro posteriormente, sempre considerando-se o quadro clínico do paciente (Brasil, 2006b).

Ressalta-se que, em alguns pacientes, o tempo de tratamento (dois ou três dias) de infecções foi inferior ao considerado efetivo na literatura (Singh, Aneja, 2011; Freifeld et al., 2011), possivelmente devido à reavaliação clínica que descartou a hipótese infecciosa.

Sangramento é fator de risco reconhecido para óbito em LV (Lyons et al., 2003; Collin et al., 2004; Costa et al., 2010) e, em séries pediátricas, esteve associado a óbito em até 59% dos casos (Campos Jr, 1995; Rey et al., 2005; Sampaio et al., 2010). Apesar de apresentar freqüência significativa (22,9%), inclusive superior à descrita no mesmo hospital entre 2001 e 2005 (16,6%) (Braga, 2007), a maior parte dos sangramentos foi caracterizada como epistaxe, geralmente de menor volume e gravidade.

A indicação de hemoderivados nos casos de LV conduzidos no HIJPII segue, prioritariamente, definição clínica individualizada e não parâmetros

hematológicos pré-estabelecidos, diferentemente do que ocorre em outras doenças (Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2010). A frequência de pacientes que necessitaram de alguma hemotransfusão (31,2%) foi inferior à relatada em Recife (49,4%) (Queiroz et al., 2004).

Deve-se ressaltar a ausência de óbitos na coorte acompanhada, sendo que o último paciente internado no HIJPII com evolução fatal foi notificado em 2008. Possivelmente, a introdução dos testes rápidos, que conferiu maior rapidez à investigação diagnóstica, e a administração de anfotericina em pacientes com quadro grave, influenciaram esta taxa de letalidade baixa.

Entre todos os residentes de BH que apresentaram a doença entre 2006 e 2011, a taxa de letalidade foi de 14,1% e, quando avaliadas somente as crianças e adolescentes até 14 anos, tal taxa foi bem inferior, com valor de 2,9% (Prefeitura de Belo Horizonte, 2011). Este último número aproxima-se do relatado em estudo no HIJPII entre os anos de 2001 e 2005, que observou letalidade de 3,6% (Braga, 2007). Também é notória a diferença destes percentuais de óbitos com os constatados em outras séries pediátricas no Brasil, cujas taxas de letalidade variaram de 6,4% a 12,6% (Campos Jr, 1995; Pastorino et al., 2002; Pedrosa, Rocha, 2004; Rey et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Sampaio et al., 2010). Estes dados indicam a necessidade de estudos detalhados que comparem fatores de risco para óbito entre crianças de localidades com taxas de sucesso terapêutico diferentes, e entre as populações pediátricas e adultas portadoras de LV no município de BH, visando identificar medidas capazes de diminuir o número de casos com evolução fatal. Nestes estudos, além da investigação do quadro clínico e de comorbidades no momento da internação, deveriam ser pesquisados o acesso de pacientes ao serviço de saúde, desde o nível ambulatorial até o hospitalar, e o grau de capacitação das equipes assistenciais com relação à LV.

Para quantificação da carga parasitária, optou-se pelo uso do fragmento do gene SSU rRNA, que está presente em aproximadamente 160 cópias no genoma de *Leishmania* e, assim, confere alta sensibilidade ao ensaio. No estudo, comprovou-se esta característica, com positividade detectada em todos os doentes em T0 (antes do início do tratamento) e com limite de detecção equivalente a conteúdo de DNA uma célula de *Leishmania* (van Eys et al., 1992).

Optou-se, ainda, pelo emprego do número de cópias de SSU rRNA normalizado em relação ao gene da β -actina humano, em detrimento da utilização de medida de parasitos por volume de sangue total, mais usual na literatura. Caso

esse método fosse usado, a inexatidão do número de cópias do fragmento avaliado no genoma levaria a estimativa imprecisa do número de protozoários nas amostras. Deste modo, a utilização do número de cópias de SSU rRNA reflete mais fielmente a carga de DNA em sangue total e ajusta os dados quanto a diferenças nos processos de extração de DNA e pipetagem das amostras. Deve-se ressaltar que, devido ao uso de alvos gênicos e processos de normalização distintos, não é possível comparar, em termos absolutos, o número de cópias do fragmento gênico com os relatados em estudos anteriores, mas é relevante analisar a dinâmica da carga em momentos específicos do curso clínico nas séries já descritas.

Observou-se variação muito ampla entre o número de cópias de SSU rRNA dos pacientes em T0, o que também foi relatado por outros autores que acompanharam pacientes com quadro clínico de LV na França (Mary et al., 2004; Mary et al., 2006), Itália (Bossolasco et al., 2003), Tunísia (Aoun et al., 2009) e Índia (Sudarshan et al., 2011). No presente estudo, não foram constatadas diferenças entre as cargas parasitárias apresentadas pelos pacientes com distintas características demográficas, clínicas ou laboratoriais. O número de cópias de SSU rRNA antes do início de tratamento específico também não apresentou associação com categorias de gravidade e escores preditores de óbito, utilizando diferentes critérios. O relativamente pequeno número de pacientes incluídos pode ter limitado estas comparações, exigindo-se, assim, avaliação com amostra mais ampla.

Na Itália, foi constatada menor carga parasitária em crianças, comparado-a aos valores encontrados em adultos coinfectados e não coinfectados pelo HIV, que foram semelhantes (Antinori et al., 2009). Ausência de diferença na carga entre paciente imunossuprimidos e imunocompetentes foi relatada na França (Mary et al., 2006), o que difere do encontrado em estudo no Piauí, em que maior conteúdo de DNA do parasito foi dosado em pacientes com LV e infecção pelo HIV (Zacarias et al., 2011).

A associação da carga parasitária com idade e coinfecção com HIV, ainda que controversa, aponta para a influência da resposta imune na determinação da multiplicação do parasito. Há relato de correlação significativa entre o conteúdo de DNA e níveis de interleucina 10 (IL-10) em sangue periférico de pacientes com LV na Índia, sugerindo esta citocina reguladora como biomarcador de gravidade da infecção (Verma et al., 2010). Em cães, foram descritos níveis elevados de IL-4 relacionados à carga mais alta em linfonodos durante quadro inicial da doença (Manna et al., 2008c) e, paradoxalmente, observou-se, em outro estudo, correlação

entre níveis de TNF- α e número de cópias de fragmento gênico em amostras de baço (De F Michelin et al., 2011). Tais dados denotam a complexidade da relação entre a resposta imune e a infecção por *Leishmania* e estudos envolvendo a quantificação do parasita poderão acrescentar muito na compreensão desta.

Queda significativa no número de cópias de SSU rRNA foi observada quando comparados T1 (10 a 15 dias após início do tratamento) e T2 (40 a 60 dias após início do tratamento) a T0, o que é compatível com a administração de tratamentos efetivos para LV e já foi descrito em outros estudos, nos quais foram empregadas técnicas de PCR convencional ou quantitativa (Osman et al., 1998; Lachaud et al., 2000; Pizzuto et al., 2001; Cascio et al., 2002b; Maurya et al., 2005; Mary et al., 2006; Aoun et al., 2009; Antinori et al., 2009; Sudarshan et al., 2011).

Constatou-se persistência de carga parasitária positiva em 11 pacientes (23,9% do total de pacientes testados neste momento) em T1 e em quatro (9,3% do total de pacientes testados neste momento) em T2. Todas estas crianças apresentaram melhora clínica ao final do acompanhamento. Este dado é concordante com o observado em estudos com pacientes pediátricos imunocompetentes na Tunísia (Aoun et al., 2009) e na Espanha (Cruz et al., 2006), onde queda ou negatificação da PCR foram relatadas após período longo após tratamento (até seis meses de acompanhamento).

Clareamento mais lento da parasitemia é descrito em pacientes imunossuprimidos (Lachaud et al., 2000; Fisa et al., 2002; Bossolasco et al., 2003; Antinori et al., 2007), o que não justifica o achado na casuística estudada, uma vez que não havia nenhuma criança com comorbidade que influenciasse significativamente a resposta imune.

A queda do número de cópias de SSU rRNA ocorreu independentemente do tipo de medicação administrada, o que difere do relatado na Itália, onde observou-se, por meio de PCR convencional, ausência de fragmentos gênicos mais precocemente em crianças tratadas com anfotericina B lipossomal (mediana de seis dias) do que naquelas que receberam antimonial (mediana de 14 dias) (Cascio et al., 2002b). Divergindo desse achado, em estudo realizado em BH, 94,7% dos pacientes tratados com Glucantime® apresentou resultado negativo de PCR convencional em intervalo máximo de sete dias após o término do tratamento (Disch et al., 2004).

Cabe ressaltar que a redução da carga parasitária parece ocorrer muito precocemente, com declínio mais significativo até a primeira semana após início de

tratamento (Mary et al., 2006; Sudarshan et al., 2011). Deste modo, as inferências do presente estudo sobre a queda do número de cópias de SSU rRNA, em especial sobre a influência do tipo de medicação nesta diminuição, são limitadas, já que o intervalo entre a introdução de esquema terapêutico e a coleta subsequente de amostra foi de 10 a 15 dias.

Diante da tendência mundial de avaliações sobre tratamento combinado, a negatização da carga parasitária em todos os pacientes que foram tratados com dose única de anfotericina B lipossomal seguida de Glucantime® intravenoso pode ser considerada favorável à sua adoção. No entanto, tal resultado foi obtido em número muito pequeno de pacientes (cinco) e estudos avaliando a cinética dos fragmentos gênicos, inclusive após cada etapa do tratamento, devem ser realizados.

Em T2, dois pacientes apresentaram nova positividade da carga parasitária, após tê-la negativado em T1. Ambos apresentavam melhora clínica significativa e foram considerados clinicamente curados. Assim, de modo diferente ao descrito para imunossuprimidos (Bossolasco et al., 2003; Mary et al., 2006), este reaparecimento de parasitemia parece não estar associado à recidiva da doença. Aventa-se a possibilidade de ocorrer liberação de parasitos de órgãos para a corrente sanguínea após o início do tratamento, o que justificaria incremento em relação à carga pré-tratamento (Sudarshan et al., 2011). Contudo, como o reaparecimento dos fragmentos gênicos foi posterior ao término do tratamento (entre 40 e 60 dias após o início do tratamento), é pouco provável que esta seja a justificativa para este achado. A detecção de DNA livre, e não de parasitos viáveis, é outra explicação plausível para o achado (Fisa et al., 2002). Como as crianças, em T2, já estavam em seus domicílios em áreas endêmicas, a hipótese de reinfeção não pode ser excluída.

A qPCR mostrou sensibilidade muito alta, identificando todas as crianças com LV. Além desta característica, a identificação do material genético do parasito propicia especificidade elevada à técnica que fornece, também, resultados mais rápidos do que as técnicas de biologia molecular convencionais, com menor risco de contaminação durante sua execução.

No entanto, a demanda por equipamentos e pessoal capacitado e seu custo elevado, de US\$9,00 por amostra (Dra. Luciana Gomes, LPC, CPqRR, FIOCRUZ – comunicação pessoal), podem restringir sua aplicação rotineira. É necessário que se avalie fluxo propedêutico capaz de otimizar o emprego da qPCR, priorizando casos de diagnóstico duvidoso e aqueles com maior risco de recidivas.

É relevante ressaltar a limitação da classificação de evolução grave empregada no atual estudo. Todas as intervenções que compuseram este desfecho – internação em UTI, administração de aminas, VM e transfusão de hemoderivados – estão sujeitas a decisões subjetivas, dependentes da avaliação da equipe assistencial. Apesar de o HIJPII ser instituição de referência e, na grande maioria das vezes, disponibilizar estas medidas a todas as crianças que delas necessitam, a oportunidade diferenciada destes tratamentos também pode ter influenciado a evolução de cada indivíduo.

Existe descrição escassa na literatura sobre aplicação e validação de critérios para gravidade de LV. No presente estudo, 18,7% das crianças foram classificadas como graves pelo critério do MS-2006, percentual superior ao descrito em população pediátrica hospitalizada pela doença em Campo Grande (11,2%), na qual, paradoxalmente, observou-se letalidade superior (2,6%) à da série do HIJPII, entre 2010 e 2011 (Brustoloni et al., 2010). Possivelmente, existem fatores relacionados à assistência durante a internação hospitalar que justifiquem esta incongruência entre o número de pacientes graves à admissão e a taxa de letalidade nos dois serviços, mas deve-se questionar também se o critério de gravidade do MS-2006 tem realmente poder de identificar os pacientes com maior chance de evolução grave ou fatal.

Este questionamento é reforçado pela sensibilidade baixa (31,2%) deste critério para detectar aqueles que, ao longo da internação, apresentaram evolução grave no presente estudo. Destaca-se, ainda, seu VPP de 55,5%, indicando que quase metade das crianças classificadas como graves à admissão evoluíram sem necessidade de medidas mais invasivas para resolução do quadro.

O escore preditor de óbito proposto pelo MS-2011 é passo à frente na classificação de gravidade, considerando variáveis múltiplas, com pesos diferentes, a fim de se identificar, de maneira mais acurada, aqueles com risco de evolução fatal. Contudo, sua validação ocorreu somente no serviço em que foi elaborado, em Teresina, sendo necessária sua aplicação e avaliação criteriosa em outras áreas endêmicas, com realidades demográficas e assistenciais distintas (Costa, 2009; Brasil, 2011b).

Houve restrição importante da validação dos escores preditores de óbito devido à ausência de óbitos na coorte estudada. Apesar disso, a especificidade muito alta do sistema de pontuação do MS-2011 (97,9%) faz com que seja aventada a hipótese de que o ponto de corte estabelecido seja muito alto, favorecendo a

especificidade em detrimento da sensibilidade. Entende-se que, nestas classificações, a sensibilidade é a medida que deve ser mais acurada, visando a instituição precoce de intervenções capazes de evitar o óbito em todos aqueles com maior risco para este desfecho.

Na avaliação de fatores de risco para evolução grave, além da limitação da definição de critério de evolução grave, deve-se destacar que o número pequeno de crianças acompanhadas restringiu as conclusões. Contudo, acredita-se que os parâmetros que apresentaram associação significativa nesta amostra apontam para características que deverão ser sempre investigadas na condução do paciente.

Todos os fatores significativamente associados à evolução grave – idade menor que 12 meses, taquidispneia, infecção, fígado com medida ajustada por SC superior a 10 cm, hemoglobina menor ou igual a $7\text{mg}/\text{mm}^3$, plaquetas menores ou iguais a $50.000\text{ unidades}/\text{mm}^3$ e albumina sérica com valor inferior a $2,5\text{g}/\text{dL}$ – são características clínicas e laboratoriais facilmente acessíveis aos pacientes admitidos no HIJPII, o que possibilita sua pesquisa sistemática em casos suspeitos de LV.

Idade inferior a um ano já foi relacionada à maior letalidade em estudo de Fortaleza (Rey et al., 2005). Estudos na África, incluindo populações de todas as faixas etárias, descreveram, também, maior risco de óbito em crianças mais velhas, o que possivelmente é influenciado pelas condições socioeconômicas muito precárias neste continente (Collin et al., 2004; Mueller et al., 2009).

Taquidispneia foi descrita como fator de risco para óbito em outros estudos pediátricos e sua relação com a gravidade pode ser multicausal, sugerindo pneumonite intersticial pela própria LV, quadro infeccioso pulmonar ou restrição torácica devido a visceromegalias muito volumosas (Costa, 2009; Sampaio et al., 2010). Deste modo, sua etiologia deve ser investigada criteriosamente, para que medidas adequadas a cada situação sejam tomadas em tempo hábil.

A presença de infecção concomitante a quadro de LV é causa de óbito reconhecida (Rey et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Barati et al., 2008; Sampaio et al., 2010; Costa et al., 2010). Entretanto, com relação aos dados do presente estudo, cabe a ressalva de que foram incluídos todos os que receberam tratamento para neutropenia febril, independentemente de confirmação laboratorial, o que ampliou o grupo de pacientes que apresentou infecção, de modo diferente ao descrito na literatura. Deste modo, notou-se que, mesmo com prescrição de antimicrobiano profilática, observou-se que aqueles que necessitaram dela evoluíram com maior

gravidade, com risco potencial de óbito, que talvez tenha sido evitado por esta medida.

A hepatomegalia foi fator de risco para evolução grave nas crianças internadas no HIJPII. Este achado não apresenta descrição nos estudos anteriores. A presença de esplenomegalia, por sua vez, foi considerada fator de risco para evolução fatal no Sudão, em menores de 16 anos (Collin et al., 2004).

A anemia e a plaquetopenia aumentam o risco para óbito (Werneck et al., 2003; Collin et al., 2004; Sampaio et al., 2010; Costa et al., 2010), dado que foi corroborado pelos achados do presente estudo, relacionando-as à evolução grave. Não se pode considerar que estas duas variáveis estiveram intrinsecamente ligadas ao desfecho grave, que tinha como um de seus componentes a administração de hemoderivados, uma vez que a indicação das hemotransfusões seguiu parâmetros clínicos, e não pontos de corte previamente definidos.

Níveis baixos de albumina, por sua vez, não haviam sido anteriormente associados à gravidade do quadro de LV, talvez pela dificuldade de acesso a este exame bioquímico em áreas endêmicas com recursos mais restritos. Importante ressaltar que o edema, que tem como uma de suas causas a hipoalbuminemia, não foi identificado como fator de risco para evolução grave.

A carga parasitária, avaliada por meio da qPCR, não mostrou associação significativa com evolução grave nos pacientes estudados, o que difere do inicialmente esperado. Difere, também, do descrito em estudo no Sudão, onde parasitismo elevado em aspirado esplênico foi relacionado a maior risco de óbito (Seaman et al., 1996) e do observado em Teresina, onde número elevado de parasitos em MO levou a maior chance de evolução fatal por sangramento (Costa et al., 2010). Deve-se destacar, contudo, que estes resultados foram obtidos em avaliações microscópicas de órgãos diretamente parasitados pelas espécies de *Leishmania*, o que pode divergir de achados de métodos de biologia molecular em sangue periférico.

É bem determinado que pacientes assintomáticos apresentam menor quantidade de material genético do parasito detectável, quando comparados aos sintomáticos (Mary et al., 2006). Utilizando o mesmo alvo gênico empregado no presente estudo, observou-se que o valor médio da carga parasitária em crianças assintomáticas residentes em BH foi de 56,5 parasitos/mL de sangue, considerado expressivamente inferior à média da carga dos pacientes com a doença manifesta (3.499.697 parasitos/mL) (Marques, 2010).

As divergências sobre a influência da carga parasitária na evolução clínica e a diferença do número de fragmentos gênicos em pacientes sintomáticos e assintomáticos sugerem que, de alguma maneira, a carga parasitária influencia a apresentação da infecção e da doença, com provável intermediação da resposta imune, e evidenciam a necessidade de estudos na área.

Os manuais do MS, que ressaltam os pontos mais relevantes da LV e orientam quanto à propedêutica e tratamento específico e suportivo, são de grande importância na assistência dos pacientes com quadro suspeito da doença, principalmente em localidades de acesso mais difícil e onde os profissionais de saúde possuem menos experiência na condução dos casos. Contudo, persistem ainda muitas lacunas em suas diretrizes, decorrentes da insuficiência de estudos.

Algumas destas lacunas foram evidenciadas neste trabalho prospectivo, que descreveu a evolução clínica e a da carga parasitária de crianças hospitalizadas com LV. Mais significativamente, a presente pesquisa apontou para campos a serem estudados com maior urgência – necessidade real de procedimentos invasivos para diagnóstico de LV, comparação da evolução clínica dos doentes internados no HIJPII com as de serviços com taxas maiores de letalidade, padrão de redução do material genético do parasito em diferentes esquemas terapêuticos, significado clínico da persistência da carga parasitária após tratamento, validação de classificações e escores de gravidade já propostos e definição de fatores de risco para gravidade, específicos para cada instituição ou localidade.

Visando assistência de melhor qualidade aos pacientes pediátricos com LV, em especial àqueles internados no HIJPII, o presente estudo propõe a realização de PCR em sangue periférico, método que demonstrou positividade elevada, nos casos em que exames de pesquisa de anticorpos (RIFI ou testes rápidos) não sejam conclusivos, em substituição à pesquisa direta do parasito e cultura de aspirado de medula óssea. Propõe-se, ainda, a avaliação dos fatores de risco identificados em todos os pacientes, com objetivo de identificação precoce daqueles com maior potencial de evolução desfavorável.

6 CONCLUSÃO

- O quadro clínico e laboratorial das crianças hospitalizadas com diagnóstico confirmado de LV foi semelhante ao descrito na literatura, sendo caracterizado por febre, distensão abdominal, palidez, prostração e hepatosplenomegalia, associadas a anemia, plaquetopenia, leucopenia, diminuição da atividade de protrombina, elevação de aminotransferases hepáticas e redução da albumina sérica.

- O diagnóstico do primeiro episódio de LV pôde ser definido a partir de técnicas não invasivas, como os testes imunocromatográficos, em todas as crianças, sem necessidade de realização de procedimentos como a punção de MO. Nos casos em que a pesquisa de anticorpos específicos não for conclusiva para o diagnóstico, como em recidivas, a realização de PCR em sangue periférico, pelo método convencional ou quantitativo, é alternativa que mostrou adequada sensibilidade.

- Após administração de tratamento específico, houve melhora clínica de todos os pacientes, mas com resolução mais lenta da palidez e da anemia.

- A classificação de gravidade proposta pelo MS-2006 não se mostrou acurada para prever evolução grave em crianças hospitalizadas por LV.

- A carga parasitária antes do início do tratamento específico apresentou ampla variação em crianças com LV e esta variação não se associou a características demográficas, clínicas e laboratoriais à admissão. Houve queda significativa do número de cópias de SSU rRNA após início de tratamento específico nos pacientes avaliados. Contudo, quatro apresentaram melhora clínica mas persistiram com carga detectável em sangue periférico após término de esquema terapêutico.

- Não foi observada correlação entre a carga parasitária e diferentes classificações de gravidade à admissão e evolução grave durante a internação hospitalar.

- Idade menor que 12 meses, taquidispneia, infecção, fígado com medida ajustada por SC superior a 10 cm, hemoglobina menor ou igual a 7 mg/mm³, plaquetas menores ou iguais a 50.000 unidades/mm³ e albumina sérica com valor inferior a 2,5 g/dL foram considerados fatores de risco para evolução grave em crianças com LV.

7 ANEXOS

7.1 Métodos e valores de referência de exames laboratoriais do HIJPII

Tabela 19 - Valores de referência para hemograma, por faixa etária (limite mínimo - limite máximo)

Exame Laboratorial	Até 6 meses	6 – 12 meses	1 – 2 anos	2 – 6 anos	6 – 12 anos
Hemoglobina (mg/mm ³)	10,8 – 12,2	11,3 – 12,5	11,3 – 12,3	11,7 – 13,7	12,0 – 14,4
Hematócrito (%)	35 - 41	37 - 41	37 - 41	34 - 41	36 - 42
Plaquetas (unid/mm ³)	150.000 – 450.000				
Leucócitos (cél/mm ³) (x10 ³)	6,0 – 17,5	6,0 – 17,5	6,0 – 17,0	5,0 – 14,5	4,5 – 13,5
Neutrófilos (cél/mm ³)	1,0 – 8,5	1,5 – 8,5	1,5 – 8,5	1,5 – 8,0	1,8 – 8,0

Método: Citoquímica e citometria de fluxo

Tabela 20 - Métodos e valores de referência de atividade de protrombina e exames bioquímicos (limite mínimo - limite máximo)

Exame Laboratorial	Método	Valores de Referência
Atividade de protrombina (%)	Mecânica de coagulação	70 - 100
AST (UI/L)	IFCC	15 - 37
ALT (UI/L)	IFCC	30 - 65
Bilirrubina total (mg/dL)	Colorimétrico Jendrassik-Grof	≤ 1,00
Albumina (g/dL)	Colorimétrico Púrpura de bromocresol	3,4 - 5,0
Globulina (g/dL)	Reação de Biuret a ponto final	1,4 - 3,2

7.2 Ficha de acompanhamento clínico e laboratorial

Ficha de Acompanhamento Clínico-Laboratorial Leishmaniose Visceral - HIJPII

Iniciais

--	--	--	--	--	--

Número da pesquisa

--	--	--	--

IDENTIFICAÇÃO

1. Prontuário HIJPII:

--	--	--	--	--	--	--	--

2. Data de nascimento:

--	--

 /

--	--

 /

--	--	--	--

3. Sexo: Masculino Feminino

4. Data da internação:

--	--

 /

--	--

 /

--	--	--	--

5. Data da alta:

--	--

 /

--	--

 /

--	--	--	--

6. Data da entrada na pesquisa:

--	--

 /

--	--

 /

--	--	--	--

1ª ANAMNESE - PRÉ-TRATAMENTO

7. Tempo de sintomas:

--	--	--

 dias

8. Apresentou febre? Sim Não Sem informação

9. Esteve prostrado? Sim Não Sem informação

10. Apresentou hiporexia? Sim Não Sem informação

11. Apresentou perda de peso? Sim Não Sem informação

12. Apresentou palidez? Sim Não Sem informação

13. Apresentou edema? Tipo? Não Localizado Generalizado Sem informação

14. Apresentou diarreia? Sim Não Sem informação

15. Apresentou vômito? Sim Não Sem informação

16. Apresentou dor abdominal? Sim Não Sem informação

17. Apresentou distensão abdominal? Sim Não Sem informação

18. Apresentou petéquias e/ou equimoses? Sim Não Sem informação

19. Apresentou epistaxe? Sim Não Sem informação

20. Apresentou gengivorragia? Sim Não Sem informação

21. Apresentou sangramento digestivo (exceto gengivorragia)? Sim Não Sem informação

22. Apresentou sangramento em trato respiratório (exceto epistaxe)? Sim Não Sem informação



Ficha de Acompanhamento Clínico-Laboratorial
Leishmaniose Visceral - HIJPII

Iniciais

--	--	--	--	--

Número da pesquisa

--	--	--

23. Apresentou sangramento em trato genito-urinário? Sim Não Sem informação
24. Apresentou sangramento do sistema nervoso central? Sim Não Sem informação
25. Número de episódios de hemorragias:

--	--

26. Apresenta imunossupressão? Tipo?
- Não
- HIV/Aids
- Uso de corticóide oral por mais de 2 semanas, em dose > 1mg/kg/dia
- Uso de outras drogas imunossupressoras
- Desnutrição prévia
- Outras
- Sem informação

1º EXAME FÍSICO - PRÉ-TRATAMENTO

27. Peso:

--	--	--	--	--

 gramas

28. Percentil de peso: < p3 p3-p15 p15-p50 p50-p85 p85-p97 > p97 Não se aplica

29. Altura:

--	--	--

 cm

30. Percentil de altura: < p3 p3-p15 p15-p50 p50-p85 p85-p97 > p97 Não se aplica

31. Está prostrado? Sim Não Sem informação
32. Está desidratado? Sim Não Sem informação
33. Apresenta icterícia? Sim Não Sem informação
34. Apresenta palidez? Sim Não Sem informação
35. Apresenta má perfusão? Sim Não Sem informação
36. Apresenta hipotensão arterial? Sim Não Sem informação
37. Apresenta edema? Tipo? Não Localizado Generalizado Sem informação
38. Apresenta petéquias/equimoses? Sim Não Sem informação
39. Apresenta fígado palpável? Sim Não Sem informação
40. Medida do fígado:

--	--

 cm
41. Apresenta baço palpável? Sim Não Sem informação
42. Medida de baço:

--	--

 cm



Ficha de Acompanhamento Clínico-Laboratorial
Leishmaniose Visceral - HIJPII

Iniciais

--	--	--	--	--

Número da pesquisa

--	--	--

INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA

43. Teste rápido rk39 Kalazar Detect:

Positivo Negativo Inconclusivo/Indeterminado Não realizado Sem informação

44. Teste rápido rk39 ITLeish:

Positivo Negativo Inconclusivo/indeterminado Não realizado Sem informação

45. RIFI:

Positivo Negativo Inconclusivo/indeterminado Não realizado Sem informação

46. Aspirado de medula óssea:

Positivo Negativo Inconclusivo/indeterminado Não realizado Sem informação

47. Mielocultura:

Positivo Negativo Inconclusivo/indeterminado Não realizado Sem informação

48. PCR em sangue periférico:

Positivo Negativo Inconclusivo/indeterminado Não realizado Sem informação

49. PCR em medula óssea:

Positivo Negativo Inconclusivo/indeterminado Não realizado Sem informação

TRATAMENTO

50. 1ª Medicação iniciada: Glucantime Anfotericina desoxicolato Anfotericina lipossomal

51. Houve contra-indicação ao glucantime? Sim Não Sem informação

52. Motivos para contra-indicação ao glucantime:

Gravidade clínica

Idade do paciente

Alteração bioquímica hepática/pancreática

Elevação das escórias renais/insuficiência renal

Alteração em eletrocardiograma/cardiopatias prévia

Outros motivos

Sem informação

Não se aplica

53. Tempo de tratamento com a 1ª medicação iniciada:

--	--

 dias

54. Houve troca para 2ª medicação? Sim Não Sem informação



Ficha de Acompanhamento Clínico-Laboratorial
Leishmaniose Visceral - HIJPII

Iniciais

Número da pesquisa

--	--	--	--	--

--	--	--

55. 2ª Medicação iniciada:

Glucantime Anfotericina desoxicolato Anfotericina lipossomal Não se aplica

56. Motivos para início da 2ª medicação: Gravidade clínica

Idade do paciente

Alteração bioquímica hepática/pancreática

Elevação das escórias renais/insuficiência renal

Alteração em eletrocardiograma

Outros motivos

Sem informação

Não se aplica

57. Tempo de tratamento com a 2ª medicação iniciada:

--	--

 dias

58. Houve troca para 3ª medicação? Sim Não Sem informação

59. 3ª Medicação iniciada:

Glucantime Anfotericina desoxicolato Anfotericina lipossomal Não se aplica

60. Motivos para início da 3ª medicação: Gravidade clínica

Idade do paciente

Alteração bioquímica hepática/pancreática

Elevação das escórias renais/insuficiência renal

Alteração em eletrocardiograma

Outros motivos

Sem informação

Não se aplica

61. Tempo de tratamento com a 3ª medicação iniciada:

--	--

 dias

2ª AVALIAÇÃO CLÍNICA

62. Está prostrado? Sim Não Sem informação

63. Apresenta icterícia? Sim Não Sem informação

64. Apresenta palidez? Sim Não Sem informação

65. Apresenta edema? Tipo? Não Localizado Generalizado Sem informação

66. Apresenta petéquias/equimoses? Sim Não Sem informação

67. Apresenta fígado palpável? Sim Não Sem informação 68. Medida do fígado:

--	--

 cm

69. Apresenta baço palpável? Sim Não Sem informação 70. Medida de baço:

--	--

 cm

8195



Ficha de Acompanhamento Clínico-Laboratorial
Leishmaniose Visceral - HIJPII

Iniciais

--	--	--	--	--

Número da pesquisa

--	--	--

3ª AVALIAÇÃO CLÍNICA

71. Peso:

--	--	--	--	--

 gramas

72. Percentil de peso:

< p3 p3-p15 p15-p50 p50-p85 p85-p97 > p97 Não se aplica

73. Altura:

--	--	--

 cm

74. Percentil de altura:

< p3 p3-p15 p15-p50 p50-p85 p85-p97 > p97 Não se aplica

75. Está prostrado? Sim Não Sem informação

76. Apresenta icterícia? Sim Não Sem informação

77. Apresenta palidez? Sim Não Sem informação

78. Apresenta edema? Tipo? Não Localizado Generalizado Sem informação

79. Apresenta petéquias/equimoses? Sim Não Sem informação

80. Apresenta fígado palpável? Sim Não Sem informação

81. Medida do fígado:

--	--

 cm

82. Apresenta baço palpável? Sim Não Sem informação

83. Medida de baço:

--	--

 cm

COMPLICAÇÕES E TRATAMENTOS COMPLEMENTARES

84. Tempo para resolução inicial da febre:

--	--	--

 dias

85. Apresentou infecção bacteriana? Foco? Não

Pele

Vias aéreas superiores

Pneumonia

Infecção do trato urinário

Outros

Sem foco definido

Sem informação



**Ficha de Acompanhamento Clínico-Laboratorial
Leishmaniose Visceral - HIJPII**

Iniciais

Número da pesquisa

--	--	--	--	--

--	--	--

EXAMES LABORATORIAIS - 1ª AVALIAÇÃO - ANTES DO TRATAMENTO

- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|--|--|
| 106. Hemoglobina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> mg/mm ³ | | | | 107. Hematócrito: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> % | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 108. Plaquetas: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> . <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> | | | | | | | | | 109 Global de leucócitos: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> . <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> /mm ³ | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 110. Bastonetes: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> % | | | 111. Segmentados: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> % | | | 112. Eosinófilos: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> % | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 113 PCR: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | 114. Atividade de protrombina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> % | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 115. Razão de PTTa paciente/PTTa controle: <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 116. Bilirrubina total: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | 117. Bilirrubina direta: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 118. Albumina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> g/dL | | | | 119. Globulina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> g/dL | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 120. Uréia: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | 121. Creatinina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 122. Amilase: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | 123. Lipase: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 124. Glicemia: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | 125. TGO: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | 126. TGP: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 127. GGT: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | 128. Fosfatase alcalina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

EXAMES LABORATORIAIS - 2ª AVALIAÇÃO - APÓS 7 DIAS DE TRATAMENTO

- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|---|--|--|---|--|--|---|---|--|--|--|--|--|
| 129. Hemoglobina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> mg/mm ³ | | | | 130. Hematócrito: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> % | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 131. Plaquetas: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> . <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> /mm ³ | | | | | | | | | 132. Global de leucócitos: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> . <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> /mm ³ | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 133. Bastonetes: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> % | | | 134. Segmentados: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> % | | | 135. Eosinófilos: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> % | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 136. PCR: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | 137. Atividade de protrombina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> % | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 138. Razão de PTTa paciente/PTTa controle: <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 139. Bilirrubina total: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | 140. Bilirrubina direta: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 141. Albumina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> g/dL | | | | 142. Globulina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> g/dL | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 143. Uréia: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | 144. Creatinina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td></tr></table> , <table border="1"><tr><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 145. Amilase: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | 146. Lipase: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 147. Glicemia: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> mg/dL | | | | | 148. TGO: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | 149. TGP: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 150. GGT: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | 151. Fosfatase alcalina: <table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> U/L | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

8195



7.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para Pais/Guardiões de Crianças Menores de 12 anos

Prontuário/ Hospital Infantil João Paulo II: _____

Número da Pesquisa: _____

A criança _____, que está sob sua responsabilidade, está sendo convidada para participar da pesquisa **“Correlação entre carga parasitária de *L. (L.) chagasi*, perfil de resposta imune e parâmetros clínicos em crianças internadas com leishmaniose visceral”**.

Sua criança foi internada no Hospital Infantil João Paulo II, da rede FHEMIG, por suspeita de leishmaniose visceral, uma doença causada por um parasito, e o diagnóstico agora já está confirmado.

A pesquisa tem como objetivo estudar a quantidade de parasito no sangue da criança (chamada de carga parasitária) e a resposta do corpo contra esta infecção (chamada de resposta imune), antes, durante e depois do tratamento para a leishmaniose visceral. Será importante para entendermos melhor a doença e, mais adiante, conseguir cuidar melhor dos outros doentes com leishmaniose visceral.

Para participar da pesquisa, a criança precisará ser examinada por um médico da pesquisa em três momentos: antes do início do tratamento, 10 e 15 dias após o início do tratamento e entre 40 e 60 dias após o início do tratamento. Também precisará ter seu sangue colhido (cerca de 4 mL) em três momentos: antes do início do tratamento, 10 e 15 dias após o início do tratamento e entre 40 e 50 dias após o início do tratamento. O sangue de sua criança será analisado no Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou, centro da FIOCRUZ em Minas Gerais.

A técnica para coletar o sangue (punção venosa) será a mesma da utilizada para colher os exames comuns. Os riscos da coleta de sangue são pequenos. A criança poderá sentir dor leve momentânea no local da punção e depois poderá formar um pequeno hematoma (mancha roxa). Caso apresente qualquer problema, ela será avaliada por um médico da pesquisa.

Em qualquer momento sua criança poderá sair da pesquisa. Caso saia, não haverá nenhuma diferença no tratamento que ela está recebendo no Hospital Infantil João Paulo II.

Você nem a criança receberão nenhum benefício para participar da pesquisa.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais. Somente você e nós, o grupo da pesquisa, teremos acesso às informações da sua criança. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação da criança.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa René Rachou, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Nome do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Pesquisadores:

Maria Vitória Assumpção Mourão -
Hospital Infantil João Paulo II – Alameda Ezequiel Dias, 345 – Santa Efigênia
Tel: (31) 9177-7035/ 32399074/ 32399091 – Belo Horizonte

Ana Rabello -
Laboratório de Pesquisas Clínicas- Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto –
Telefone: (31) 33497708 - Belo Horizonte. Cep:30190-002

Endereço e telefone -Comitê de Ética – Centro de Pesquisa René Rachou
Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte - Cep: 30190-002
Secretária: Jéssica Camêlo – TeleFax: (31) 3349 7825

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação da criança
_____ na pesquisa e concordo com sua participação.

Nome do pai/mãe ou Guardião

Assinatura do pai/mãe ou guardião

Endereço: _____

Cidade: _____

Telefone: _____ / _____

Contato: _____

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alborzi A, Rasouli M, Nademi Z, Kadivar MR, Pourabbas B. Evaluation of rk39 strip test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in infants. *East Mediterr Health J.* 2006;12(3-4):294-9.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):334-59.

Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1990;162(6):1354-9.

Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2007;44(12):1602-10.

Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, et al. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(1):46-51.

Aoun K, Chouih E, Amri F, Ben Alaya N, Raies A, Mary C, et al. Short report: Contribution of quantitative real-time polymerase chain reaction to follow-up of visceral leishmaniasis patients treated with meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(6):1004-6.

de Assis TS, Caligiorne RB, Romero GA, Rabello A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(12):1269-72.

de Assis TS, Braga AS, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, de Siqueira IC, et al. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(2):81-5.

Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1986;154(6):1003-11 (a).

Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis.* 1986;154(4):639-49.

Barati M, Sharifi I, Daie Parizi M, Fasihi Harandi M. Bacterial infections in children with visceral leishmaniasis: observations made in Kerman province, southern Iran, between 1997 and 2007. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102(7):635-41.

Berman J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):289-94.

Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, den Boer M, Davidson RN, et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2006;43(7):917-24.

Bern C, Courtenay O, Alvar J. Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factor analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(2):e599.

Bernstein D. Laboratory Evaluation - Electrocardiography. In: Kliegman R, Behrman R, Jenson H, Stanton B, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 1865-9.

Bhattacharya SK, Sur D, Karbwang J. Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):353-6.

Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol*. 2009;31(5):254-66.

Boelaert M, El-Safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(1):32-40.

Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):5080-4.

Braga ASC. Fatores associados à evolução clínica da leishmaniose visceral em crianças hospitalizadas em centro de referência de Belo Horizonte, 2001 a 2005 [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília; 2006 (a).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Visceral Grave - Normas e Condutas. Brasília;2006 (b).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990-2010 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde [atualizado em 23/07/2011; acesso em 03/11/2011]; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf (a).

Brasil.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Visceral - Recomendações clínicas para redução da letalidade. Brasília; 2011 (b).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Letalidade de leishmaniose visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000-2010 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde [atualizado em 23/07/2011; acesso em 03/11/2011]; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_letalidade_05_09_11.pdf (c).

Brasil.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Óbitos de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000-2010 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde [atualizado em 23/07/2011; acesso em 03/11/2011]; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_obitos_05_09_11.pdf (d).

Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. Clin Diagn Lab Immunol. 2001;8(4):828-31.

Brustoloni YM, Cunha RV, Cômulo LZ, Oliveira AL, Dorval ME, Oshiro ET. Treatment of visceral leishmaniasis in children in the Central-West Region of Brazil. Infection. 2010;38(4):261-7.

Caldas AJ, Costa JM, Silva AA, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96(1):21-8.

Caldas AJ, Costa J, Aquino D, Silva AA, Barral-Netto M, Barral A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? Acta Trop. 2006;97(3):252-8.

Campos Jr D. [Clinical and epidemiological features of Kala-Azar in children]. J Pediatr (Rio J). 1995;71(5):261-5.

Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(3):321-4.

Cascio A, Colomba C, Antinori S, Orobello M, Paterson D, Titone L. Pediatric visceral leishmaniasis in Western Sicily, Italy: a retrospective analysis of 111 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21(4):277-82 (a).

Cascio A, Calattini S, Colomba C, Scalamogna C, Galazzi M, Pizzuto M, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. Pediatrics. 2002;109(2):E27 (b).

Castro A, Pitombeira M, Silva H, Gonçalves R, AQ S, Pompeu M, et al. Alterações citomorfológicas da medula óssea na leishmaniose visceral e sua correlação com a gravidade da doença. In: Bordin J, editor. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO; 10/11/2011. p. 252.

Chappuis F, Mueller Y, Nguimfack A, Rwakimari JB, Couffignal S, Boelaert M, et al. Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. J Clin Microbiol. 2005;43(12):5973-7.

Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. BMJ. 2006;333(7571):723.

Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetich S, et al. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. Clin Infect Dis. 2004;38(5):612-9.

Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(4):334-7.

Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2008;24(12):2959-63.

Costa CH, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(4):386-92.

Costa DL. Fatores prognósticos na Leishmaniose visceral: Alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2343-7.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48(3):151-6.

Davies CR, Mazloumi Gavgani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology.* 1999;119 (Pt 3):247-57.

DE F Michelin A, Perri SH, De Lima VM. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011;105(5):373-83.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89(3):463-9.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(3):239-43.

Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004;92(3):279-83.

Duarte MI, da Matta VL, Corbett CE, Laurenti MD, Chebabo R, Goto H. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83(1):73-6.

Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(7):1013-8.

Edwards T, Omollo R, Khalil EA, Yifru S, Musa B, Musa A, et al. Single-dose liposomal amphotericin B (AmBisome®) for the treatment of visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2011;12:66.

van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;51(1):133-42.

Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Kalantari M, Mohebbali M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102(7):577-83.

Fisa R, Riera C, Ribera E, Gállego M, Portús M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96 Suppl 1:S191-4.

Fraga TL, Brustoloni YM, Lima RB, Dorval ME, Oshiro ET, Oliveira J, et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(3):310-3.

Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4):e56-93.

Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. Hemoterapia - Condutas para a Prática Clínica. 1ª ed. Belo Horizonte;2010.

Gangneux JP, Donaghy L, Marty P. [Liver involvement during visceral leishmaniasis]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2006;30(8-9):1027-32.

Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;121(1-2):23-33.

Gorski S, Collin SM, Ritmeijer K, Keus K, Gatluak F, Mueller M, et al. Visceral leishmaniasis relapse in Southern Sudan (1999-2007): a retrospective study of risk factors and trends. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(6):e705.

van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(3):184-94.

Harhay MO, Olliaro PL, Vaillant M, Chappuis F, Lima MA, Ritmeijer K, et al. Who is a typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa, and South Asia. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(4):543-50.

Harrison LH, Naidu TG, Drew JS, de Alencar JE, Pearson RD. Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. *Rev Infect Dis.* 1986;8(3):447-53.

Hassan MQ, Ghosh A, Ghosh SS, Gupta M, Basu D, Mallik KK, et al. Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis. *Parasitology.* 1993;107 (Pt 5):509-17.

Joshi A, Narain JP, Prasittisuk C, Bhatia R, Hashim G, Jorge A, et al. Can visceral leishmaniasis be eliminated from Asia? *J Vector Borne Dis.* 2008;45(2):105-11.

Kader H, Balistreri W. Cholestasis. In: Kliegman R, Behrman R, Jenson H, Stanton B, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 18th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 1668-75.

Kajaia M, Morse DL, Kamkamidze G, Butsashvili M, Chubabria G, Zenaishvili O, et al. Risk factors for relapse of visceral leishmaniasis in Georgia. *Trop Med Int Health.* 2011;16(2):186-92.

Keane V. Assessment of growth. In: Kliegman R, Behrman R, Jenson H, Stanton B, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 18th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 70-4.

Kolaczinski JH, Reithinger R, Worku DT, Ocheng A, Kasimiro J, Kabatereine N, et al. Risk factors of visceral leishmaniasis in East Africa: a case-control study in Pokot territory of Kenya and Uganda. *Int J Epidemiol.* 2008;37(2):344-52.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.

Kumar R, Bumb RA, Salotra P. Correlation of parasitic load with interleukin-4 response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;57(3):239-46.

Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):236-40.

Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. A urbanização da leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(3):249-54.

Lyons S, Veeken H, Long J. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Trop Med Int Health.* 2003;8(8):733-9.

Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R. Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(1):e1484.

Malafaia G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. *Parasite Immunol.* 2009;31(10):587-96.

Maltezou HC. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:617521.

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2006;142(3-4):271-80.

Manna L, Gravino AE, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C. *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1149:358-60 (a).

Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J.* 2008;177(2):279-82 (b).

Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE. Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. *Cytokine.* 2008;44(2):288-92 (c).

Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci.* 2009;87(1):76-8.

Marques LHS. Determinação da taxa de infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* utilizando técnicas sorológicas e diagnóstico molecular quantitativo em crianças residentes em área urbana de expansão da Leishmaniose Visceral [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.

Martins M, Carvalho A. Diagnóstico diferencial das hepatosplenomegalias. In: Leão E, Côrrea E, Mota J, Viana M, editors. *Pediatria Ambulatorial*. 4ª ed. Belo Horizonte: Coopmed; 2005. p. 267-73.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5249-55.

Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(5):858-63.

Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3038-41.

Meheus F, Balasegaram M, Olliaro P, Sundar S, Rijal S, Faiz MA, et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9).

Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum (L. chagasi)* in human. *Acta Trop*. 2011;119(2-3):69-75.

Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(6):456-63.

Mueller Y, Mbulamberi DB, Odermatt P, Hoffmann A, Loutan L, Chappuis F. Risk factors for in-hospital mortality of visceral leishmaniasis patients in eastern Uganda. *Trop Med Int Health*. 2009;14(8):910-7.

Musso O, Sommer P, Drouet E, Cotte L, Neyra M, Grimaud JA, et al. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *J Virol Methods*. 1996;56(2):125-37.

Oliveira AL, Paniago AM, Dorval ME, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, et al. [Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(5):446-50.

Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, el-Hassan AM, el-Naeim DA, Kager PA. Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998;92(4):397-400.

Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*. 1999;11(4):305-12.

Pace D, Williams TN, Grochowska A, Betts A, Attard-Montalto S, Boffa MJ, et al. Manifestations of paediatric *Leishmania infantum* infections in Malta. *Travel Med Infect Dis*. 2011;9(1):37-46.

Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. [Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. *J Pediatr (Rio J)*. 2002;78(2):120-7.

Pearson RD, Cox G, Jeronimo SM, Castracane J, Drew JS, Evans T, et al. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;47(1 Pt 2):8-15.

Pedras MJ, de Gouvêa Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(2):172-8.

Pedrosa CM, da Rocha EM. [Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(4):300-4.

Petrela R, Kuneshka L, Foto E, Zavalani F, Gradoni L. Pediatric visceral leishmaniasis in Albania: a retrospective analysis of 1,210 consecutive hospitalized patients (1995-2009). *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9).

Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):357-61.

do Prado PF, Rocha MF, de Sousa JF, Caldeira DI, Paz GF, Dias ES. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(5):561-6.

Prefeitura de Belo Horizonte. Vigilância Epidemiológica da Leishmaniose Visceral em BH [Internet]. Belo Horizonte: Prefeitura de Belo Horizonte [atualizado em 06/12/2011; cited 20/12/2011]; Disponível em: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=22301&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&.

Quaresma PF, Murta SM, Ferreira EeC, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 2009;111(3):289-94.

Queiroz MJ, Alves JG, Correia JB. [Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area]. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80(2):141-6.

Rabello A, Orsini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97 Suppl 1:17-28.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006;81(1):68-75.

Reithinger R, Brooker S, Kolaczinski JH. Visceral leishmaniasis in eastern Africa--current status. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(12):1169-70.

Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AA. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81(1):73-8.

Rigo R, Rigo L, Honer M. Change in renal function and pancreatitis: adverse effects of the treatment of visceral leishmaniasis. *Arq Cienc Saúde.* 2008;15(3):2.

Rijal S, Bhandari S, Koirala S, Singh R, Khanal B, Loutan L, et al. Clinical risk factors for therapeutic failure in kala-azar patients treated with pentavalent antimonials in Nepal. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(3):225-9.

Rocha NA, Silva GB, Oliveira MJ, Abreu KL, Franco LF, Silva MP, et al. Visceral leishmaniasis in children: a cohort of 120 patients in a metropolitan city of Brazil. *Turk J Pediatr.* 2011;53(2):154-60.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 1990;71(3):267-75.

Rodrigues J, Silva R, Siqueira M. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico. In: Rosseti M, Silva C, Rodrigues J, editors. *Doenças Infecciosas - Diagnóstico Molecular*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 2006. p. 16-40.

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, et al. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol.* 2007;37(6):683-93.

Salam MA, Mondal D, Kabir M, Ekram AR, Haque R. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh. *Acta Trop.* 2010;113(1):52-5.

Sampaio MJ, Cavalcanti NV, Alves JG, Filho MJ, Correia JB. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(11):e877.

Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL, et al. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(6):629-33.

Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt BL. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med.* 1996;124(7):664-72.

Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(3):285-91.

Silva LA, Romero HD, Nogueira Nascentes GA, Costa RT, Rodrigues V, Prata A. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):261-6.

da Silva MR, Stewart JM, Costa CH. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(6):811-4.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):311-30.

Singh V, Aneja S. Pneumonia - management in the developing world. *Paediatr Respir Rev.* 2011;12(1):52-9.

Sinha R, Datta U, Sehgal S. Importance of bone marrow culture for diagnosis of Kalaazar. *Scand J Infect Dis.* 1993;25(6):787-9.

Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(2):106-13.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(1):1-6.

Sudarshan M, Weirather JL, Wilson ME, Sundar S. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(8):1751-5.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis.* 2000;31(4):1104-7.

Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med.* 2010;362(6):504-12.

Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet.* 2011;377(9764):477-86.

Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK, Kumar N, Kumar P, Hassan SM, et al. Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998;92(5):561-9.

Thakur CP, Kumar A, Mitra DK, Roy A, Sinha AK, Ranjan A. Improving outcome of treatment of kala-azar by supplementation of amphotericin B with physiologic saline and potassium chloride. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(5):1040-3.

Tuon FF, Guedes F, Fernandes ER, Pagliari C, Amato VS, Seixas Duarte MI. In situ immune responses to interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009;31(2):98-103.

Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;61(1):23-30.

Vaish M, Mehrotra S, Chakravarty J, Sundar S. Noninvasive molecular diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):2003-5.

Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2010;5(4):e10107.

Victoria CG, Aquino EM, do Carmo Leal M, Monteiro CA, Barros FC, Szwarcwald CL. Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. *Lancet.* 2011;377(9780):1863-76.

Vogt B, Avner E. Renal Failure. In: Kliegman R, Behrman R, Jenson H, Stanton B, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 18th ed ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 2206-14.

Wang Y, Moss J, Thisted R. Predictors of body surface area. *J Clin Anesth.* 1992;4(1):4-10.

Waterlow JC. Classification and definition of protein-calorie malnutrition. *Br Med J.* 1972;3(5826):566-9.

Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection.* 2003;31(3):174-7.

Werneck GL. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2010;26(4):644-5.

World Health Organization. Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. Geneva;1999.

World Health Organization. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record.* 2002;77(44):365-72.

World Health Organization and United Nations Children's Fund. WHO child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children. Geneva; 2009.

World Health Organization. Control of Leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Geneva;2010.

World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. Geneva: World Health Organization; [acesso em 02/11/2011]; Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (a).

World Health Organization. Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance. Geneva;2011(b).

Wortmann G, Sweeney C, Houg HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2001;65(5):583-7.

Zacarias D, Sene I, Costa D, Silva J, Silva F, Costa C. *Leishmania infantum* parasitemia is higher in patients with HIV. In: Torres R, editor. 27^a Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 15^a Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses; 26/10/2011; Uberaba. p. 219.

Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW. Clinical aspects of kala-azar in children from the Sudan: a comparison with the disease in adults. J Trop Pediatr. 1992;38(1):17-21.