

ARIANE CAMPOS DE SOUZA

**RETROSPECTIVA E PERSPECTIVA NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
HUMANA**

Belo Horizonte

**Faculdade de Farmácia da UFMG
2010**

ARIANE CAMPOS DE SOUZA

RETROSPECTIVA E PERSPECTIVA NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do certificado de Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Héli da Monteiro de Andrade

Belo Horizonte
 Faculdade de Farmácia da UFMG
 2010
SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE SIGLAS	4
RESUMO	5
I PREMISSAS	7
1 O PARASITO	7
2 FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE	10
3 LEISHMANIOSE VISCERAL	14
3.1 Controle de leishmaniose visceral	17
II DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL	19
III PERSPECTIVAS	26
IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE FIGURAS

1	Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	9
2	Forma cutânea de Leishmaniose tegumentar	11
3	Forma mucocutânea de leishmaniose tegumentar, envolvendo o lábio, palato e asas do nariz	12
4	Forma cutânea difusa leishmaniose tegumentar	12
5	Paciente com Leishmaniose Visceral	13
6	Mapa da distribuição da Leishmaniose Visceral (LV) em todo o mundo	14
7	Mapa da distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral no Brasil	16
8	Forma aflagelada ou amastigota de <i>Leishmania</i>	21

LISTA DE SIGLAS

DAT	- Teste de aglutinação direta
ELISA	- Ensaio imunoenzimático
IFI	- Imunofluorescência indireta
LV	- Leishmaniose visceral
PCR	- Reação em cadeia de polimerase

RESUMO

As leishmanioses formam um grupo de doenças de transmissão vetorial causadas por protozoário intracelular obrigatório de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, e tem como peculiaridades a diversidade e complexidade. Podem ser divididas em dois grupos: Tegumentar e Visceral (LV). No Brasil a forma tegumentar é geralmente causada pelas espécies: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, enquanto a forma visceral é causada por *L. infantum* (= *L. chagasi*). Existem dois tipos de LV que diferem em suas características de transmissão: o zoonótico que é a LV transmitida do animal para o vetor e deste para os humanos, e o antroponótico que é transmitida de humano para humano através do vetor. A forma zoonótica, inicialmente, era conhecida como doença de zona rural, de ambiente silvestre, atingindo o homem ou animais que tivessem contato com este ambiente. Recentemente, foi caracterizada como doença reemergente por ter sido estabelecida em áreas urbanas ou periurbanas onde seja um ambiente propício para o ciclo de vida do vetor. A doença é problema de saúde pública, em pelo menos 88 países e é considerada dentre as seis endemias prioritárias do mundo. A avaliação clínica de novos testes é cheia de dificuldades. A falta de um padrão-ouro torna estudos de acurácia diagnóstica da LV extremamente complexa. Um padrão-ouro no diagnóstico LV existe □ cultura de aspirado esplênico. No entanto, a obtenção de aspirados esplênicos são invasivos e técnicas de cultura normalmente não estão disponíveis nas áreas endêmicas de LV. Na rotina utiliza-se o diagnóstico clínico-epidemiológico associado a testes sorológicos para dar início ao tratamento. Na era atual da biologia molecular, há grande perspectiva de utilização de diagnóstico molecular, especialmente a detecção de DNA do parasito em sangue do paciente por meio da reação em cadeia da polimerase. Esse é um método de alta sensibilidade e especificidade que tem o custo cada vez mais reduzido.

SUMMARY

The leishmaniasis are a group of vector-borne diseases caused by obligate intracellular

protozoan of different species of the genus *Leishmania*, and its peculiarities of the diversity and complexity. They can be divided into two groups: cutaneous and visceral leishmaniasis (VL). In Brazil, the cutaneous form is usually caused by species: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. guyanensis*, while the visceral form is caused by *L. infantum* (= *L. chagasi*). There are two types of VL that differ in their transmission characteristics: the zoonotic VL is transmitted from animals to and from this vector to humans, and antroponótico which is transmitted from human to human through the vector. The zoonotic form, initially, was known as a rural disease in a wild environment, affecting man or animals that have contact with this environment. Recently, it was characterized as a reemerging disease have been established in urban or peripheral is a good environment for the life cycle of the vector. The disease is a public health problem in at least 88 countries and is considered among the six priority endemic diseases in the world. The clinical evaluation of new tests is fraught with difficulties. The lack of a gold standard makes studies of diagnostic accuracy of VL extremely complex. A gold standard in diagnosing VL □ splenic aspirate culture. However, obtaining splenic aspirates are invasive and culture techniques are often not available in endemic areas of VL. In the routine the clinical □ epidemiological diagnosis is associated with serological tests before initiating treatment. In the atual era of molecular biology, there is great prospect for the use of molecular diagnostics, especially the detection of parasite' DNA in blood of patients by using the polymerase chain reaction. This is a method of high sensitivity and specificity that has increasingly reduced cost.

I PREMISSAS

1 O PARASITO

As leishmanioses formam um grupo de doenças de transmissão vetorial causadas por protozoário intracelular obrigatório de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, e tem como peculiaridades a diversidade e complexidade (SINGH, 2006). O protozoário está sob o reino Protista e filo Euglenozoa. Este filo é caracterizado pela presença de um citóstoma associado, apoiado por um dos três grupos de microtúbulos que surgem desde as bases flagelares. Uma série de outras peculiaridades ultra-estruturais também distinguem o grupo, principalmente a presença de uma haste paraxial em cada flagelo, que, respectivamente, dispõe de estruturas tubulares e treliçadas (PASTORINO et al., 2002).

Estes protozoários flagelados estão na Família Trypanosomatidae, na qual se inclui um número de agentes patogênicos responsáveis por doenças graves em humanos e outros animais. São caracterizados pela presença de um cinetoplasto, um granulado contendo DNA localizado no interior da mitocôndria única e associada com as bases flagelares. Os membros da família Trypanosomatidae têm citóstomas reduzidos ou ausentes e alimentação inteiramente por absorção. Eles têm um complexo ciclo de vida, envolvendo mais de um hospedeiro, e passam por várias etapas morfológicas. Todos os membros são exclusivamente parasitas. Há nove gêneros da Família nos termos do presente: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Wallaceina*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (SINGH, 2006).

Leishmania spp. são transmitidos pela picada de flebotomíneos nos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Insetos que vivem em lugares úmidos e escuros. São chamados como: mosquito-palha, birigui, cangalhinha, bererê, asa branca ou asa dura (GOMES et al., 2008).

As diversas espécies do gênero *Leishmania* são associadas a variações das formas clínicas e possuem suas respectivas espécies vetoras. Assim, *Leishmania infatum* (= *L. chagasi*) – causadora da forma visceral nas Américas – é transmitida principalmente por *Lu. longipalpis*, enquanto a leishmaniose tegumentar americana,

conhecida popularmente como: “úlceras de bauru”, “nariz de tapir” e “ferida brava” é causada por várias espécies no Brasil, como o *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (FALQUETO et al., 1986).

Doença	Leishmaniose tegumentar		
Espécies	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
Vetores	<i>Lutzomyia intermédia</i> <i>Lutzomyia whitmani</i> <i>Psychodopigus wellcomei</i>	<i>Lutzomyia anduzei</i> <i>Lutzomyia whitmani</i> <i>Lutzomyia umbratilis</i>	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> <i>Lutzomyia reducta</i> <i>Lutzomyia olmeca nociva</i>

Fonte: FALQUETO et al. (1986).

Durante o ciclo de vida, a *Leishmania* (FIGURA 1) apresenta duas formas distintas principais: a promastigota flagelar, encontrada no intestino do vetor artrópode, e uma forma de amastigota que se desenvolve intracelularmente no hospedeiro mamífero. Apenas flebotomíneos fêmeas são transmissoras da doença inoculando promastigotas na pele. Os parasitos penetram nas células dendríticas e macrófagos na derme e se transformam em amastigotas. Eles se multiplicam e sobrevivem em fagolisossomos. Os parasitos podem ser disseminados através dos sistemas linfáticos e vasculares. Através dos monócitos, podem infectar macrófagos no sistema retículo-endotelial, resultando em infiltração da medula óssea, hepatoesplenomegalia e, por vezes, no aumento dos gânglios linfáticos – linfadenopatia (SUNDAR et al., 2005).

A infecção do vetor ocorre ao picar um vertebrado infectado para exercer o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo do invertebrado, esses macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas de *Leishmania* que se diferenciam em promastigotas. Rapidamente, diferenciam-se em formas alongadas, flageladas e móveis que se multiplicam e migram para a probóscida do inseto, onde se diferenciam em formas infectivas, promastigotas metacíclicas e são inoculadas no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva, no momento da picada (BRASIL, 2006).

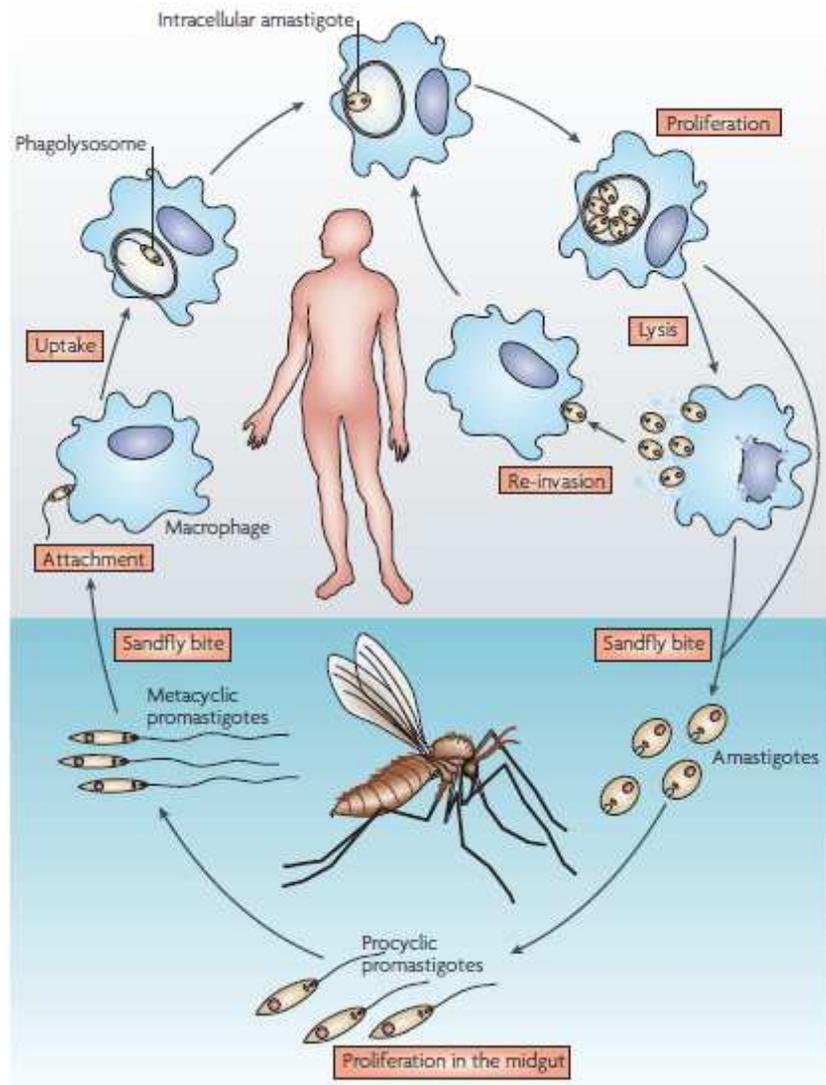


FIGURA 1: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: CHAPPUIS et al. (2007).

2 FORMAS CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES

Como já referido, as leishmanioses podem ser divididas em dois grupos: tegumentar e visceral. No Brasil a forma tegumentar é geralmente causada pelas espécies: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, enquanto a visceral é causada por *L. infantum* (= *L. chagasi*).

A) Leishmaniose tegumentar

A forma tegumentar apresenta variações clínicas que permitem a classificação em formas cutânea, mucocutânea e difusa. Na forma cutânea, o paciente geralmente apresenta uma ou várias úlcera(s) ou nódulo(s) na pele. A úlcera é indolor, com formato arredondado ou ovalado; mede de alguns milímetros até alguns centímetros; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem-delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras (FIGURA 2). A infecção bacteriana associada pode causar dor local e produzir exsudato seropurulento que, ao dessecar-se em crostas, recobre total ou parcialmente o fundo da úlcera. Diferentes espécies de *Leishmania* podem infectar os macrófagos da derme, com variáveis apresentações clínicas e prognóstico. As úlceras podem cicatrizar espontaneamente – embora lentamente – em indivíduos imunocompetentes, mas pode causar cicatrizes desfigurantes. Normalmente, essa forma clínica apresenta boa resposta ao tratamento, tanto nos casos de úlcera única quanto nos de múltipla. Apesar de *L. braziliensis* ser a espécie mais prevalente e de maior distribuição geográfica no Brasil, sendo também responsável pela maioria dos casos, as lesões múltiplas são frequentemente causadas por *L. guyanensis* e parecem estar relacionadas às múltiplas picadas de *Lu. umbratilis* (CHAPPUIS et al., 2007).

A forma mucocutânea é geralmente secundária a uma forma cutânea primária. Pode ocorrer meses ou anos após a cura clínica da forma cutânea. Pacientes com lesões cutâneas múltiplas, lesões extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são o grupo com maior risco de desenvolver metástases para a mucosa. As lesões podem destruir total ou parcialmente as mucosas do nariz, boca e garganta, cavidades e tecidos circundantes. Geralmente, a lesão é indolor e se inicia no septo nasal anterior, cartilaginoso, próxima ao intróito nasal, sendo, portanto, de fácil visualização (FIGURA 3). Tem sido observado o acometimento mucoso

concomitante em até 30% dos pacientes e as manifestações sistêmicas, como febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outros (CHAPPUIS et al., 2007).



FIGURA 2: Forma cutânea da Leishmaniose tegumentar

Fonte: <http://www.scribd.com/doc/2973158/Biologia-Leishmaniose-tegumentar>

Leishmania braziliensis é responsável pela maioria dos casos de leishmaniose mucocutânea, tendo também já sido descrita a associação com *Leishmania amazonensis* (SUNDAR et al., 2005).

A forma cutânea difusa, produz lesões crônicas de pele semelhantes às da ranceniase. No Brasil, a doença é causada pela *L. amazonensis*. Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrendo grandes extensões cutâneas (Figura 4). É difícil de tratar (WHO, 2001).

B) Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é caracterizada por febre alta, perda de peso substancial, inchaço do baço e do fígado e anemia (FIGURA 5). Se não for tratada, a doença pode ter uma taxa de mortalidade tão elevada quanto 100% (WHO, 2001).



FIGURA 3: Mucosa concomitante, envolvendo o lábio, palato e asas do nariz

Fonte: <http://www.scribd.com/doc/2973158/Biologia-Leishmaniose-tegumentar>



FIGURA 4: Forma cutânea difusa

Fonte: <http://www.scribd.com/doc/2973158/Biologia-Leishmaniose-tegumentar>

Estima-se que a população infectada seja muito superior à doente, ocorrendo muitos casos de forma assintomática. Nessa forma clínica o “status” imune do hospedeiro é determinante, e assim, nos últimos anos, tem sido crescente o número de registros de co-infecção com HIV – vírus da imunodeficiência humana (DESJEUX, 2004).

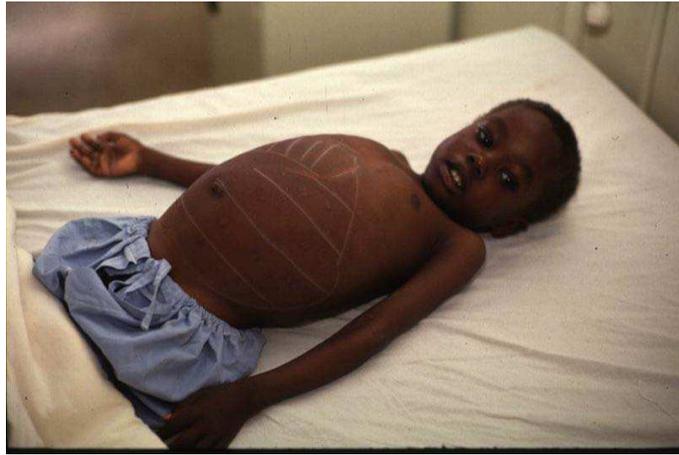


FIGURA 5: Pacientes com leishmaniose visceral

Fonte: BRASIL (2006).

3 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é amplamente distribuída no mundo (FIGURA 6), principalmente na Ásia, Oriente Médio, África e América (GAMA et al., 1998). Existem dois tipos de LV que diferem em suas características de transmissão: a zoonótica que é a LV transmitida do animal para o vetor e deste para os humanos, e a antroponótica que é transmitida de humano para humano através do vetor. Na primeira, os seres humanos são hospedeiros ocasionais e os animais, principalmente cães, são os reservatórios do parasita. LV zoonótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. infantum*. Já a LV antroponótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. donovani* (SUNDAR et al., 2005).



FIGURA 6: A distribuição da leishmaniose visceral em todo o mundo

Fonte: CHAPPUIS et al. (2007).

No continente americano é conhecida como leishmaniose visceral americana (LVA) (CALDAS et al., 2001). No Brasil, o agente etiológico é a *L. chagasi*, espécie semelhante à *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia (PASTORINO et al., 2002). Há uma polêmica sobre a origem da LV no Novo Mundo – se esta foi introduzida devido à colonização europeia e causada pela *L. infantum* – ou se há milhões de anos, foi introduzida com os canídeos, devendo ser classificada como *L. chagasi* (GONTIJO & MELO, 2004).

Em ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) foi incriminado como o principal reservatório desse parasito. Hospedeiros silvestres registrados foram o chacal – *C. aureus*, o lobo – *C. lupus* e a raposa – *Vulpes vulpes* (LAINSON et al., 1987). Em

cães, principal reservatório, muitos casos são assintomáticos ou oligossintomáticos (ALVES & BEVILACQUA, 2004). No Brasil, o percentual de cães infectados em uma área endêmica varia de 1% a 67%. No entanto, a prevalência da infecção em cães é provavelmente superior a valores reportados em estudos sorológicos (GOMES et al., 2008).

Regiões onde a pobreza e desnutrição são comuns são onde se encontram com maior frequência os casos detectados de LV, tendo maior prevalência em crianças de zero a nove anos. Inicialmente era conhecida como doença de zona rural, de ambiente silvestre, atingindo o homem ou animais que tivessem contato com este ambiente. Recentemente, foi caracterizada como doença reemergente por ter sido estabelecida em áreas urbanas ou periurbanas onde haja um ambiente propício para o ciclo de vida do vetor (CALDAS et al., 2001).

Essas mudanças são sugeridas devido a transformações ambientais decorrentes das migrações por pressões socioeconômicas, causando a miséria na população e a má distribuição de renda. Com o processo de urbanização, várias cidades, em quatro das cinco regiões do país, vivenciaram ou vivenciam epidemias de LV como: Boa Vista e Santarém (Região Norte); Teresina, São Luiz, Natal e Aracaju (Região Nordeste); Montes Claros, Belo Horizonte, Araçuaí, Sabará, Perdões e Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Cuiabá (Região Centro-Oeste) (ALVES & BEVILACQUA, 2004).

Belo Horizonte representa as cidades brasileiras no processo de urbanização de LV, pois esta convive com a doença desde 1993 e o percentual de notificações tem aumentado. Com isso, foi notado que as medidas de controle para eliminação da transmissão e prevenção de novas epidemias foram ineficientes (GONTIJO & MELO, 2004).

Em estudo realizado por GAMA et al. (1998) em algumas áreas do Maranhão foi constatado que condições de vida como moradia, estrutura física das casas, coleta pública de lixo, água encanada nas casas, banheiros são inversamente proporcionais a infecção pelo parasito.

De 1984 a 2002, foram notificados 48.455 casos de leishmaniose LVA no Brasil, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (BRASIL, 2006). Na última década, a média anual de casos de LVA no Brasil foi de 3.379 e a incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes. Com isso, a

letalidade aumentou de 3,4%, em 1994 para 5,5%, em 2008. A letalidade média nos últimos 4 anos foi 6,3% (Brasil, 2009).

No Brasil, o calazar atinge 19 estados principalmente na região Nordeste, onde se concentram mais de 90% dos casos humanos da doença. Há focos nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, sendo que nas duas últimas décadas tem havido um crescente aumento da incidência, com uma média anual nos últimos cinco anos de 3.500 casos (FIGURA 7) BRASIL (2002).

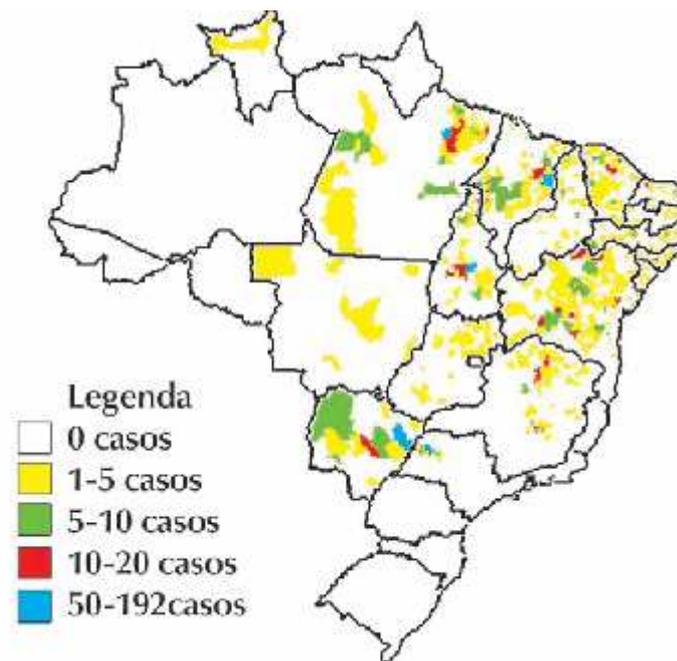


FIGURA 7: Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral

Fonte: BRASIL (2006).

Minas Gerais é o segundo estado com maior registro de casos. Foram registrados 2.374 casos de LV, no período de 2004 a 2008, o que corresponde a 68% dos casos registrados na Região Sudeste e 14% no país. Neste período, a letalidade média foi de 8,9%, porém observa-se uma redução de aproximadamente 47% ao longo dos anos, passando de 12,4%, em 2004, para 6,6%, em 2008. Ainda em 2008, foram confirmados 452 novos casos distribuídos em 8% dos seus municípios, sendo que em Belo Horizonte ocorreram 31% dos casos, seguidos pelos municípios de Paracatu, com 10%, e Montes Claros, com 8% (BRASIL, 2009).

3.1 Controle da leishmaniose visceral

A doença é problema de saúde pública em pelo menos 88 países e é considerada dentre as seis endemias prioritárias do mundo. São registrados 59.000 óbitos no mundo anualmente (ALVARENGA et al., 2010).

No programa brasileiro de controle da LV, iniciado há mais de 40 anos, foi estabelecida a integração de três medidas de saúde pública: distribuição gratuita do tratamento específico, controle de reservatórios domésticos e controle de vetores. A medicação distribuída nas unidades públicas de saúde onde se trata LV é composta de antimônio pentavalente, com dose recomendada de 20 mg/kg/dia por no mínimo 20 dias. O controle de reservatórios tem sido feito pelo diagnóstico sorológico de todos os cães domésticos onde existe transmissão de *Leishmania chagasi* para seres humanos. Para isto, foi estruturada uma rede de testes de imunofluorescência, utilizando-se eluato de papel de filtro; todos os cães com resultado reagente têm sido sacrificados. Finalmente, o controle do vetor, essencialmente para o flebótomo *Lu. longipalpis*, por aspersão espacial (principalmente) ou por aplicação residual de inseticida (LACERDA, 1994; MONTEIRO et al., 1994).

No entanto, em 2000, depois de duas décadas de tentativas de controle da LV no Brasil, o número de casos no país aumentou nitidamente e invadiu áreas urbanas, onde encontrou-se com a AIDS (BRASIL, 1999). Assim, o Ministério da Saúde propôs reavaliar os programas de controle de endemias, aliada ao reconhecimento da pouca eficiência do programa brasileiro para LV, por meio da convocação de um comitê de consultores para analisar o Programa atual e propor mudanças para o controle da doença no país (COSTA & VIEIRA, 2001).

COSTA & FURTADO (2001) descreveram as sugestões propostas para cada uma das medidas do programa, dadas a seguir, resumidamente.

- a) Relacionadas ao tratamento – Baseado em revisão dos esquemas utilizados até o presente, sugeriu-se passar a duração mínima de 20 dias para 30 dias e a indicação do uso, ainda que cauteloso, de Anfotericina B como droga de escolha para pacientes com LV em insuficiência renal e na gestação.
- b) Sobre a eliminação de cães soropositivos – Os consultores recomendaram então que a triagem sorológica universal sistemática de todos os cães seguida de eliminação deve ser suspensa. Sugeriram que, na ausência do vetor ou de casos humanos, as únicas medidas para as áreas com leishmaniose visceral canina

devem ser de vigilância e de educação em saúde. Devem ser promovidos inquéritos sorológicos amostrais contingenciais de infecção canina e a intensificação da identificação de vetores.

- c) Quanto ao controle do vetor – Os consultores enfatizaram que a prioridade do programa de controle da transmissão deve ser dada para controle de vetores, em vez da atual ênfase conferida ao controle de reservatórios. Mesmo na presença de casos humanos, o comitê só recomendou o controle de vetores para as áreas onde pelo menos uma das três seguintes situações estiver presente em uma área limitada: 1) introdução recente da doença; 2) aumento nítido da incidência; 3) incidência cumulativa maior que 5 casos por 100.000 habitantes por ano. A aplicação de inseticidas deve se restringir a aplicações residuais, com cobertura extensiva de todo o domicílio e seus anexos.

De acordo com BRASIL (2002), a estratégia de controle ainda consiste na identificação e eliminação dos reservatórios, principalmente o cão; no uso de inseticidas, para eliminação do vetor; no diagnóstico e tratamento adequado dos casos registrados. Além disso, há empenho em desenvolver atividades de vigilância entomológica e ampliar a capacidade diagnóstica e terapêutica da rede de assistência. Dessa forma, a Fundação Nacional da Saúde (FUNASA, 2002) ampliou essa série de capacitações como alternativa para controle da doença, para os técnicos das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde.

Em suma, no Brasil, foram descritos 70 mil casos de 1980 a 2008, com 3.800 mortes. De 1985 a 1989, foram registrados anualmente 1.601 casos passando para 3.630 de 2000 a 2004, estabilizando-se a partir de então (WERNECK, 2010).

De acordo com CHAPPUIS et al. (2007) é importante o desenvolvimento de vacinas para o controle da doença e aprofundamento para entender os fatores que podem predispor alguns indivíduos a desenvolver a doença ou controlar a infecção.

II DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Nem todas as infecções causadas por *L.infantum* podem levar à doença clínica evidente, mas naqueles que desenvolvem a doença, a multiplicação do parasito no sistema retículo-endotelial provoca febre prolongada, anemia, hepatoesplenomegalia e emagrecimento. LV é fatal se não for tratada adequadamente, e o sucesso do tratamento depende em parte da precocidade no diagnóstico (BOELAERT et al., 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a definição de caso clínico de LV como febre persistente (> 2 semanas) e esplenomegalia em uma pessoa residente em uma área endêmica de LV. A combinação dos dois sinais é encontrada na maioria dos casos de LV, embora esplenomegalia não esteja sempre presente. Alguns programas de controle de LV relatam que pode ter adição de outros sinais ou sintomas clínicos, como emagrecimento, anemia e linfadenopatia (WHO, 1996).

A clínica da doença varia de forma assintomática a febre, anemia, hepatoesplenomegalia, além de tosse seca, leucopenia e hipergamaglobulinemia que se não tratadas podem levar o paciente à morte. A progressão da doença é marcada por diarreia, icterícia, vômito e o edema periférico que dificultam o diagnóstico diferencial com outras patologias, retardando sua identificação. O aumento da letalidade é devido ao agravo por desnutrição, infecções bacterianas principalmente por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e às hemorragias (OLIVEIRA et al., 2010).

A apresentação clínica da LV é semelhante em diferentes áreas endêmicas, mas existem algumas diferenças. O aumento dos gânglios linfáticos são raramente encontrados em pacientes na Índia, mas são frequentes em pacientes no Sudão. Hiperpigmentação, o que provavelmente levou ao nome de Calazar, só foi descrita em pacientes com LV no subcontinente indiano, mas hoje esse sintoma é raro e foi, talvez, uma característica de doença prolongada na época em que tratamento eficaz não estava disponível. Conforme a doença avança, esplenomegalia pode aumentar, causando distensão abdominal e dor, que é por vezes aumentada por hepatomegalia concomitante. Os sintomas e sinais de co-infecções bacterianas, como pneumonia, diarreia ou tuberculose pode confundir o quadro clínico no momento do diagnóstico inicial. Os sintomas geralmente persistem por várias semanas ou meses antes dos

pacientes procurarem assistência médica ou morrer de co-infecções bacterianas, sangramento maciço ou anemia grave (SIDDIG et al., 1990).

Após um período de incubação, os pacientes apresentam sinais de infecção sistêmica persistente (incluindo febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso) e invasão do sistema fagocitário, como aumento do baço, gânglios linfáticos e fígado. A febre é geralmente associada com rigor e calafrios e pode ser intermitente. Fadiga e fraqueza são agravados pela anemia, que é causada pelo estado inflamatório persistente, hiperesplenismo (destruição periférica dos eritrócitos no baço) e, por vezes, sangramento (SIDDIG et al., 1990).

Devido a essa diversidade clínica e ausência de sinais patognomônicos, o quadro clínico permite apenas uma suspeita de diagnóstico, necessitando de confirmação por métodos laboratoriais.

A identificação de formas amastigotas do parasito em esfregaços de tecidos ou cultura tem sido o método recomendado para o diagnóstico da LV por muitos anos, mas tem sensibilidade variável, dependendo do tipo de amostra que é usada. A técnica mais sensível, aspiração esplênica, só pode ser usada sob condições altamente controladas (BOELAERT et al., 2007).

A confirmação da infecção se dá pelo achado da forma amastigota do parasito nos exames parasitológicos direto ou cultura. As formas amastigotas do parasito podem ser visto no meio intracelular em monócitos e macrófagos em exames microscópicos de aspirado de linfonodos, medula óssea e baço, corados pelo GIEMSA. As formas amastigotas são redondas ou ovais, 2 a 4 μm de diâmetro, com presença de núcleo e cinetoplasto (FIGURA 8). A identificação de amastigotas exige conhecimentos e formação, a precisão é dependente do microscopista (BOELART et al., 2007). A sensibilidade desse método é muito variável, pois não se encontra o parasito em quantidade homogênea no tecido, contudo, a especificidade é de 100% (GONTIJO & MELO, 2004).

SILVA et al. (2005) mostraram mediante um estudo a sensibilidade da aspiração de medula óssea em função do número de campos examinados e tempo gasto por análise de amostra. O aspirado de medula óssea é um método mais seguro, porém menos sensível para o diagnóstico da LV em comparação com o aspirado esplênico. Esfregaços de medula óssea de 98 pacientes e aspirado esplênico de 120 pacientes foram examinados. Entre os 87 pacientes com LV, a sensibilidade do aspirado de medula óssea foi de 40,2%, 65,5%, 89,7%, 92%, e 95,4% em 1, 5, 20, 30 e

60 minutos, respectivamente. A sensibilidade do exame do aspirado do baço foi de 93% para 114 pacientes. Um esfregaço de medula óssea é muito sensível, se analisado minuciosamente, alcançando sensibilidade semelhante à do aspirado do baço. Durante as epidemias, quando os recursos dos clínicos estão sobrecarregados e especialmente o número de amostras é maior do que o habitual, a sensibilidade dos esfregaços de medula óssea diminui porque menos tempo é gasto nas análises.

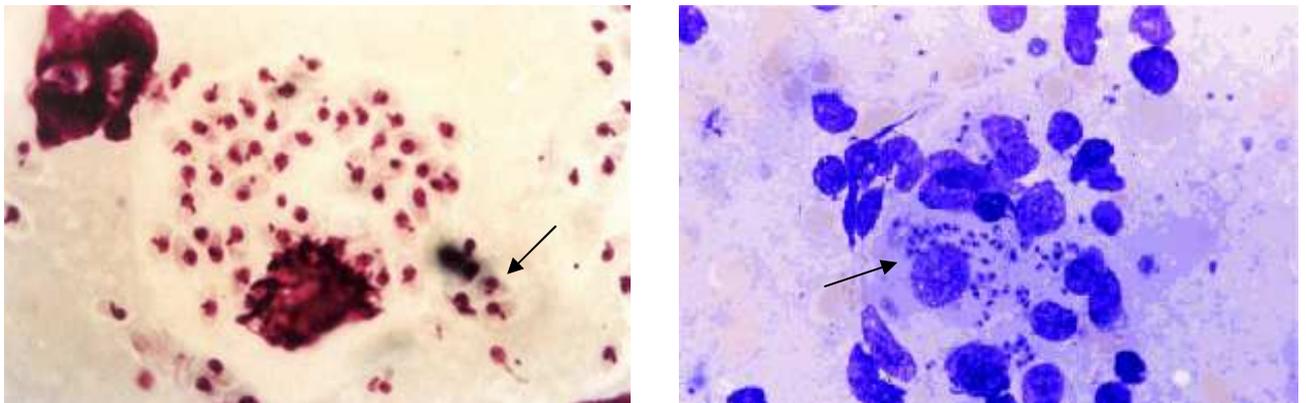


FIGURA 8: Formas amastigotas de *Leishmania*. Parasito encontra-se no macrófago
Fonte: BRASIL (2006).

O diagnóstico parasitológico indireto por meio de cultura, também pode ser feito por aspirado de linfonodos, medula óssea e baço inoculados preferencialmente em meio bifásico NNN/LIT. Cultura microbiológica destes espécimes é geralmente muito sensível mas não é prático nas decisões para salvar vidas, como o início da terapêutica (SINHA et al., 1993). Portanto, como esfregaços são simples de preparar, o exame direto destas amostras é geralmente o melhor método diagnóstico de menor custo.

Os testes de detecção de antígeno podem ser mais específicos do que os de detecção de anticorpos, por ser possível evitar reação cruzada e distinguir infecções passadas. Um teste de aglutinação em látex detecta o antígeno de baixo peso molecular na urina de pacientes com LV tem mostrado resultados iniciais promissores. Vários estudos realizados na África Oriental e no subcontinente indiano apresentaram boa especificidade, mas só baixa a moderada (48 a 87%) sensibilidade (SUNDAR et al., 2005).

O diagnóstico sorológico é facilitado devido ao grande estímulo por linfócito B e elevada produção de anticorpos que ocorre na LV. Sensibilidade e especificidade diferem muito entre os diversos métodos e reagentes utilizados, especialmente o antígeno. Um resultado pode permanecer positivo após o tratamento não permitindo a avaliação do efeito terapêutico. Então, um resultado positivo não indica a doença ativa (GONTIJO & MELO, 2004).

Vários testes que detectam anticorpos específicos anti-*Leishmania* foram desenvolvidos, mas todos têm limitações. Assim, testes baseados em anticorpos devem ser sempre usados em combinação com uma definição de caso clínico padronizado para o diagnóstico da LV (SUNDAR et al., 2005).

Os métodos sorológicos mais utilizados são ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) e teste de aglutinação direta (DAT). O ELISA é expresso em unidade de absorvância a um raio de luz. É rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a IFI. O fato de ser sensível permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos – os testes disponíveis até o momento ainda são pouco precisos na detecção - ou assintomáticos (MANDAL et al., 2008).

Nos ensaios de ELISA para diagnóstico de LV, como em outros métodos sorológicos, a maioria dos antígenos solúveis são derivados de promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* cultivadas “in vitro”, especialmente *L. amazonensis*, que cresce facilmente nessas condições (TAVARES, et al., 2003). A proteína recombinante rK39, que é conservada dentro do complexo *L. donovani*, tem sido usada nos testes de ELISA com altas sensibilidade e especificidade (BADARÓ et al., 1996).

O ELISA é útil para a análise de laboratório ou de campo por poder ser realizado em um número elevado de amostras em um ritmo rápido. Com os avanços da automação, ELISA pode ser realizada facilmente e é adaptável para uso com vários antígenos, como os solúvel (SA) e antígenos purificados, a fucose-manose, os peptídeos sintéticos e as proteínas recombinantes. Sensibilidade e especificidade do ELISA são muito influenciadas pelo antígeno utilizado. Assim pode-se encontrar valores de até 100% de sensibilidade e especificidade (MAALEJ et al., 2003).

O teste de IFI é comumente utilizado para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* usando promastigotas fixadas em lâminas de vidro. O teste é baseado na detecção de anticorpos, que são demonstrados nos estágios iniciais da infecção e

indetectáveis de seis a nove meses após a cura. Títulos acima de 1:20 são significativos e acima de 1:128 são diagnósticos. No entanto, existe a possibilidade de uma reação cruzada (BOELAERT et al., 2004). A sensibilidade desses testes varia de tão baixo quanto 28,4% até valores altos como 86,6% (IQBAL et al., 2002). No Brasil, foi observado que a IFI apresenta baixa especificidade, exigindo pessoal treinado para sua execução e não está adaptada para estudos epidemiológicos de larga escala, pois é uma reação dispendiosa. A dificuldade de interpretação é devida à limitação da técnica por ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar. O resultado da imunofluorescência indireta é normalmente expresso em diluições. Consideram-se como positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, com clínica sugestiva de LV, recomenda-se a solicitação de nova amostra em 30 dias (COSTA et al., 1990).

Em estudo feito por MARZOCHI et al. (1985) constatam-se que exames de sorologia eram positivas à IFI nas classes IgG com títulos de 1:90 a 1:2.800, tendendo a permanecer com altos títulos por mais de seis meses. A classe IgM resultava falsos positivos devido ao fator reumatóide. Antes do tratamento era realizada a intradermorreação de Montenegro (IDRM). O exame parasitológico já era efetuado também com biópsia de vísceras e pelo normal.

Os testes de DAT têm mostrado boa especificidade e sensibilidade, 72% a 100% e 91% a 100%, respectivamente. A técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução, embora apresente problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno e não tenha valor no prognóstico da doença (ROUSSEAU et al., 2001).

Em estudo feito por PASTORINO et al. (2002) em um hospital pediátrico em área não endêmica foram realizados nos pacientes, de acordo com suas necessidades, os seguintes exames: hemograma com contador automático e coloração de esfregaço, eletroforese de proteínas, sorologia pela IFI, dosagens séricas das classes e subclasses de imunoglobulinas por imunodifusão radial, mielograma efetuado na crista ilíaca pósterio-superior, cultura de aspirado de medula para a pesquisa de *Leishmania* em meio bifásico, biópsia hepática e punção aspirativa de baço. De acordo com os resultados obtidos houve grande variabilidade clínica da doença, em que a desnutrição não foi o principal fator de risco para a LV. A febre estava presente na maioria dos casos; sua ausência foi em três pacientes constatada durante todo o tratamento. Em

um paciente com quadro clínico clássico da LV, com diagnóstico parasitológico obtido apenas pela biópsia hepática, registrou-se a regressão espontânea da LV enquanto aguardava resultados dos outros exames. Essa situação chamou a atenção dos pediatras em áreas não endêmicas, tanto pela possibilidade de regressão da doença sem tratamento quanto para os casos que não apresentem todos os sinais e sintomas clássicos da LV.

Na maioria das áreas endêmicas de *Leishmania*, os recursos são limitados, pode não haver disponibilidade de eletricidade e há laboratórios onde faltam equipamentos. Portanto, a necessidade de realizar testes rápidos e simples sempre foi sentida. Com este objetivo, dois testes rápidos foram desenvolvidos, um pela empresa InBios (EUA) que utiliza o antígeno rK39 e o outro é por PNS. O diagnóstico limitado (Índia), em que se utiliza o antígeno Ld-rKE-16. Ambos são comercialmente disponíveis e baseados em tecnologia de imunocromatografia (SINGH, 2006).

MANDAL et al. (2008) realizaram um estudo comparativo entre DAT, utilizando antígeno de promastigota ou de amastigota, ELISA e teste em tira rK39, no sorodiagnóstico da LV. Em total de 94 pacientes com suspeita clínica, 16 (17%) foram soropositivos para todas as técnicas e mais 6 foram positivos para teste em tira e ELISA. Com base na positividade do aspirado de medula óssea, sensibilidade e especificidade do DAT foram de 100%, enquanto o teste em tira rK39 e ELISA apresentaram 100% e 80% respectivamente, sugerindo que, nesse caso, o DAT poderia ser a melhor técnica para o sorodiagnóstico de LV.

As recentes melhorias nas abordagens moleculares usadas para identificar sequências de DNA específicas para certos patógenos constituíram novas opções para a identificação e caracterização de agentes infecciosos, incluindo aqueles causando a leishmaniose. O conhecimento do genoma do *Leishmania* tem permitido o desenvolvimento de métodos sensíveis e específicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que são cada vez mais utilizados no diagnóstico da doença. A possibilidade de usar a PCR em amostras de sangue periférico torna esta técnica especialmente adequada para diagnosticar a doença em crianças, que pode causar dor e desconforto, ou acarretar acidentes fatais com o uso de procedimentos invasivos convencionais (aspiração de medula óssea, baço e fígado) (FRAGA et al., 2010).

FRAGA et al. (2010) mostraram que a sensibilidade da PCR no sangue periférico foi tão elevada como a PCR em aspirados de medula óssea, método atualmente classificados entre os mais sensíveis. Analisaram também amastigotas por

microscopia direta e cultivo de promastigotas em cultura, técnicas consideradas "padrão ouro" para o diagnóstico da LV. Demonstraram que a PCR de sangue periférico é mais sensível para a detecção de LV que a microscopia do aspirado de medula óssea. Os testes de cultura apresentaram baixa sensibilidade na detecção de formas promastigotas. O valor do uso de culturas para o diagnóstico pode ter sido reduzido por causa da frequência de contaminação da amostra. Os resultados descritos sugerem que pode ser vantajoso empregar PCR do sangue periférico em lugar dos métodos tradicionais utilizados para o diagnóstico da LV, incluindo testes de microscopia direta e cultura. PCR de detecção em sangue periférico também pode ser usado em vez do PCR de alta sensibilidade do aspirado de medula óssea para o diagnóstico de LV em crianças. Isso evitaria a coleta de material infectado por dolorosos e por vezes perigosos, procedimentos invasivos.

O diagnóstico precoce e o tratamento são essenciais tanto para pacientes individuais quanto para a comunidade. O resultado do tratamento é pior em pacientes com estado geral de saúde ruim (SUNDAR et al., 2005).

Os métodos atuais de diagnóstico baseados na detecção do parasita (esfregaços corados, cultura ou histopatologia) são invasivos e têm baixa sensibilidade. Já os métodos imunológicos são limitados devido à especificidade, por não distinguir infecções passadas e presentes, e não são confiáveis em pacientes imunocomprometidos. Nos últimos anos, a PCR tem sido aplicada com êxito para a detecção de *Leishmania* spp. em casos que haja qualquer uma das manifestações clínicas da leishmaniose. Vários protocolos de PCR para a detecção combinada e diferenciação dos parasitas existem, incluindo multiplex PCR, além de PCR de polimorfismo de comprimento dos fragmentos (PCR-RFLP). No entanto, há várias etapas de manipulação do pós-PCR e esses procedimentos requerem tempo e representam um risco de contaminação por DNA. O uso da reação de PCR ainda é um pouco restrito pois é um método caro e exige técnico altamente especializado (VERMA et al., 2010).

Diagnóstico rápido e preciso para o tratamento permanecem essenciais para o controle da LV. Além de melhorar os testes de diagnóstico, precisos e simples são necessários para identificar falhas no tratamento. Novas ferramentas de diagnóstico e estratégias de tratamento só terão um impacto se forem amplamente divulgadas para os pacientes (SUNDAR et al., 2005).

III PERSPECTIVAS

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são IFI e ELISA, sendo considerados, sobretudo o último, de escolha para inquéritos populacionais.

Embora a necessidade de diagnósticos precisos para LV seja óbvia, a inovação neste campo tem sido lenta. Desde a década de 1980, o objetivo principal de desenvolvimento de diagnóstico de LV não foi para substituir a demonstração direta do parasito em esfregaços de tecidos, técnica que é invasiva e requer considerável experiência, e sim para fazer combinação de testes, por um "teste de campo" que seja mais adequado para uso em contexto endêmico. Vários testes sorológicos têm sido desenvolvidos, mas nenhum é 100% específico, embora tenham sido úteis em combinação para uma definição de caso clínico (BOELAERT et al., 2007).

Novas ferramentas de diagnóstico são necessárias mais do que apenas a confirmação da doença. Não há alternativas de métodos parasitológicos disponíveis para estabelecer teste de cura em doentes tratados com LV. Os médicos não têm as ferramentas necessárias para distinguir a re-infecção de recaída em casos de reincidência, e programas de controle não têm testes validados para a vigilância de resistência a drogas em parasitos (BOELAERT et al., 2007).

Os testes sorológicos têm a facilidade de execução, possibilidade de automação, como a reação de ELISA, porém há necessidade de melhor sensibilidade e especificidade. Para isso, vários pesquisadores têm procurado utilizar antígenos recombinantes.

Os métodos convencionais, como difusão em gel, imunoeletroforese, teste de fixação de complemento, hemaglutinação indireta e imunoeletroforese contra-corrente têm precisão limitada de diagnóstico e / ou de viabilidade para uso em campo.

A avaliação clínica de novos testes é cheia de dificuldades. A falta de um padrão-ouro torna estudos de acurácia diagnóstica da LV extremamente complexa. Um padrão-ouro no diagnóstico LV existe – cultura do aspirado esplênico. No entanto, sua obtenção é invasiva, e técnicas de cultura normalmente não estão disponíveis nas áreas endêmicas de LV.

Entre as melhores perspectivas para preencher diversas lacunas do diagnóstico confirmatório, está a reação de PCR. Esta tem sido utilizada com várias finalidades além do diagnóstico, como monitoramento do tratamento, detecção de assintomáticos e estudos epidemiológicos. A técnica tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. Principal limitante da reação é ser um método caro e exigir técnico altamente especializado (WEISS, 1995).

Então, para a melhoria dos testes sorológicos, deve ser dada ênfase à pesquisa de componentes antigênicos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para obtenção de um diagnóstico específico, assegurando maior sensibilidade e especificidade aos testes. Nesse sentido, os esforços têm sido concentrados nas proteínas recombinantes e no uso de peptídeos sintéticos.

Na era pós-genômica, há um número crescente de sequências de nucleotídeos de DNA da *Leishmania*, obtidos não só no projeto Genoma, mas também em trabalhos individuais. Esses dados podem ser utilizados para estudar a função de diversos genes, podendo esclarecer aspectos da relação hospedeiro/parasita e, eventualmente, ser usados como instrumento de diagnóstico e, ainda, indicar possíveis alvos quimioterápicos (GONTIJO & MELO, 2004).

No campo do diagnóstico sorológico, a melhor perspectiva seria a identificação de antígenos altamente específicos que possam ser utilizados em testes simples, de aplicação em campo, dispensando o uso de equipamentos caros e técnicos altamente especializados, e ainda de baixo custo. Apesar de parecer uma utopia, alguns fatos indicam que se conseguiu caminhar um pouco nessa direção: o desenvolvimento de testes imunocromatográficos simples e rápidos e a evolução tecnológica que contribuiu para identificação, purificação e/ou produção de antígenos específicos, como os projetos GENOMA e PROTEOMA que possibilitam a identificação simultânea de centenas de prováveis alvos a serem testados.

Em conclusão, um horizonte ideal do ponto de vista de diagnóstico, seria aquele em que há testes eficientes para diagnosticar precocemente os casos clínicos, identificar os subclínicos para serem monitorados, fazer controle de cura e, ainda, a detecção de recidivas.

IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAR, J.; MOLINA, R.; ANDRÉS, M.S.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; ANDRÉS, M.D.S.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Trop Med and Parasit.*, v. 88, [s. n.], p. 371-378, 1994.
- ALVARENGA, D.G.; ESCALDA, P.M.F.; COSTA, A.S.V.; MONREAL, M.T.F.V. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 43, n. 2, p. 194-197, 2010.
- ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saúde Públ.*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- AMÓRA, S.S.A.; SANTOS, M.J.P.; ALVES, N.D.; COSTA, S.C.G.C.; CALABRESE, K.S.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Rural*. v. 36, n. 6, p. 1854-1859, 2006.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHCA, S.L.L. rk39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.*, v. 173, [s. n.], p. 758–761, 1996.
- BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; Mayrink, W.; SILVA, J.C.; PRATA, A.; Lorosa, E.S.; Fiúza, J.A.; GONÇALVES, C.M.; PAULA, K.M.; DIAS, E.S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.
- BOELAERT, M.; BHATTACHARYA, S.; CHAPPUIS, F.; EL SAFI, S.H.; HAILU, A.; MONDAL, D.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA, M.; PEELING, R.W. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nature Pub Group*, [s.v.], [s. n.], p. 30-39, 2007.
- BOELAERT, M.; Rijal, S.; Regmi S. Estudo comparativo da eficácia dos testes de diagnóstico para visceral leishmaniose. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 70, [s. n.], p. 72-93, 2004.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Caderno 11. Secretaria de Vigilância em Saúde /MS. s.a., p. 1-34.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. *Diário Oficial*, Brasília, 2006, p. 7- 111.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 2009, p. 10-50.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Controle, Diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral. *Fundação Nacional de Saúde*, Brasília, 1999.
- CALDAS, A.J.M.; SILVA, D.R.C.; PEREIRA, C.C.R.; NUNES, P.M.S.; SILVA, B.P.; SILVA, A.A.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis-MA, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34, n. 5, p. 445-451, 2001.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELIN, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Pub Group*, v. 5, [s. n.], p. 1-10, 2007.
- COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; ARAUJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil (1980-1986). *Rev. Saúde Públ.*, v. 24, [s. n.], p. 361-372, 1990.
- COSTA, C.H.N, VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* V. 27, [s. n.], p. 305–318, 2004.
- EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA,, J.M.; Mc. ULLIFE, I.T.; LOPES, U. G.; PEARSON, R. D.; VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 42, [s. n.], p.118-123, 1990.
- FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D., JESUS, A.C.; ALENCAR, J.T.A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Men. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 81, n. 2, p. 155-163, 1986.
- FRAGA, T.L.; BRUSTOLONI, Y.M.; LIMA, R.B.; DORVAL, M.E.C.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, A.N.L.; PIRMEZ, C. Polymerase chain reaction of

- peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 105, n. 3, p. 310-313, 2010.
- FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico [on line]. Resolução de 13 de dezembro de 2002. Ano 2, n 6, p. 1-11.
- GAMA, M.E.A.; BARBOSA, J.S.; PIRES, B.; CUNHA, A.K.B.; FREITAS, A.R.; RIBEIRO, I.R.; COSTA, J.M.L. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Públ.*, v. 14, n. 2, p. 381-390, 1998.
- GOMES, Y.M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Vet Journal*, v. 175, n. 2008, p. 45-52, 2006.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, n. 3, p. 338-347, 2004.
- IQBAL, P.R.; HIRA, J.; Saroj, G.; Felipe, R.; Madda P.J.; Importado da leishmaniose visceral: diagnóstico e dilemas análise comparativa de três ensaios. *J Clin Microbiol.*, v. 40, [s. n.], p. 475-479, 2002.
- LACERDA, M. The Brazilian leishmaniasis control program. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 89, [s. n.], p. 489-495, 1994.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.; American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 81, [s. n.], p. 517, 1987.
- MAALEJ, .IA.; CHENIK, M.; LOUZIR, H. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 68, [s. n.], p. 312-20, 2003.
- MANDAL, J.; KHURANA, S.; DUBEY, M.L.; BHATIA, P.; VARMA, N.; MALLA, N. Evaluation of Direct Agglutination Test, rk39 Test, and ELISA for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, n. 1, p. 76-78, 2008.
- MARZOCHI, M.C.A.; SABROZA, P.C.; TOLEDO, L.M.; MARZOCHI, K.B.F.; TRAMONTANO, N. C.; RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro – Brasil. *Cad. Saúde Públ.*, v. 1, n. 1, p. 5-17, 1985.
- MONTEIRO P.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, n. 3, p. 67-72, 1994.
- OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, A.C.; DORVAL, M.E.C.; ALVES, T.P.; FERNANDES,

- T.D.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.L.L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev. Soc. Med. Trop.*, v. 43, n. 2, p. 188-193, 2010.
- PASTORINO, A.C.; JACOB, C.M.A.; OSELKA, G.W.; SAMPAIO, M.M.S.C. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr.*, v. 78, n. 2, p. 120-126, 2002.
- ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J.F.; ANJUÈRE, F.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Tradução In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol.*, v. 1, n. 17, p. 1-7, 2001.
- SARMAN SINGH. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.*, v. 123, [s. n.], p. 311-330, 2006.
- SIDDIG, M.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, D. C.; PETERSEN, E. A.; KHIDIR, S. Visceral leishmaniasis in Sudan. Clinical features. *Trop. Geogr. Med.*, v. 42, [s. n.], p. 107-112, 1990.
- SINHA, R.; DATTA, U.; SEHGAL, S. Importance of bone marrow culture for diagnosis of kala azar. *Scand J Infect Dis.*, v. 25, [s. n.], p. 787-789, 1993.
- SUNDAR, S.; AGRAWAL, S.; PAI, K.; CHANCE, M.; HOMMEL, M. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 73, [s. n.], p. 269-271, 2005.
- TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn.*, v. 35, [s. n.], p. 89-99, 2003.
- VERMA, S.; KUMAR, R.; KATARA, G.K.; SINGH, L.C.; NEGI, N.S.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of Leishmaniasis Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*. v. 5, n. 4, p. 1-7, 2010.
- WEISS, J.B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.*, v. 8, [s. n.], p. 113-130, 1995.
- WERNECK, G.L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad. Saúde Públ.* v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.
- WORD HEALTH ORGANIZATION. Manual on visceral leishmaniasis control [online] <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leishmaniasis-manual.htm>> (WHO, Geneva, Switzerland, 1996).

WHO, World Health Report. Report of the Second WHO Meeting on Emerging Infectious Diseases, WHO/CDS/BVI/95.2, World Health Organization, Geneva, 1995.

WHO, World Health Report. 1996. Disponível em URL:
<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leishmaniasis-manual.htm>.

WHO, World Health Report. 2001. Disponível em URL:
<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>