

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS**

MÁRIO DE SOUZA ROSAS FILHO

**INFECÇÃO HUMANA POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM ÁREA
ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL:
UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E IMUNOLÓGICA.**

**Belém-PA
2010**

MÁRIO DE SOUZA ROSAS FILHO

**INFECÇÃO HUMANA POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM ÁREA
ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL:
UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E IMUNOLÓGICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof Dr Fernando Tobias Silveira

**Belém-PA
2010**

ABSTRACT

A transeccional study was carried out in a cohort of 946 individuals of both sexes, from one year old and upwards, living in endemic area of American visceral leishmaniasis (AVL), municipality of Barcarena, northeast Pará, Brazil. The major aim of this study was to identify individuals with the symptomatic and/or asymptomatic infection due to *Leishmania (L.) chagasi*, and to study the two types of infection, both clinically and immunologically. For diagnosis of infection there were used the indirect fluorescent antibody test (IFAT) and the leishmanin skin test (LST) with amastigotes and promastigotes antigens of *Leishmania (Leishmania) chagasi*, respectively. Results were scored as + to ++++: for the IFAT, serological titres (IgG) of 80-160 and 320-640 were given + and ++, with those of 1.280-2.560 and 5.120-10.240 as +++ and ++++ respectively. For the LST, exacerbated reactions (≥ 16 mm) were regarded as ++++, strongly positive (13-15mm) as +++, moderately positive (9-12mm) as ++, and weakly positive (5-8mm) as +. Analysis of the difference among the clinical-immunological profiles of infection was based on the programme BioEstat 4.0 and the X^2 and Binomial tests with confidence of 95%. During the study, 12 infected persons showed high serological titres (1.280 to 10.240 IgG) with negative LST reactions: 5 children and 2 adults developed of AVL with IFAT titres ≥ 2.560 (IgG) and a negative LST, and 2 children and 3 adults developed subclinical infections with IFAT titre of 1.280 (IgG) and a negative LST. In addition, the two tests enabled the identification of 5 different clinical-immunological profiles within the total of 231 cases of infection diagnosed, as follows: **1.** 77% with asymptomatic infection (**AI**), with LST ranging from +/++++ and a negative IFAT; **2.** 2% with symptomatic infection (**SI = AVL**) and **3.** 1.3% with subclinical oligosymptomatic infection (**SOI**), both groups with a negative LST and IFAT ranging from +++/++++; **4.** 9.9% with a subclinical resistant infection (**SRI**), showing both LST and IFAT with +/++, and **5.** 9.8% with an indeterminate initial infection (**III**), with a negative LST and IFAT +/++. Regarding evolution of infection, the major observation was that only a single case of **SI (= AVL)** evolved from the profile **III** (23 cases), from which most infections evolved to the profiles **SRI** (9 cases) or **SOI** (5 cases) while the lastly 8 cases remained as **III**.

Keywords: American visceral leishmaniasis. Infection. indirect fluorescent antibody test. L leishmanin skin test.

RESUMO

Foi realizado um estudo transeccional em um coorte de 946 indivíduos de ambos os sexos, acima de um ano de idade, residentes em área endêmica de leishmaniose visceral americana(LVA), no município de Barcarena, nordeste do Pará, Brasil. O objetivo deste estudo foi identificar indivíduos com a infecção sintomática e/ou assintomática causada pela *Leishmania(L.) chagasi* e estudar clinicamente e imunologicamente os dois tipos de infecção. Para o diagnóstico da infecção foi usado a reação de imunofluorescência indireta(RIFI) e a reação intradérmica de Montenegro(RIM), com amastigotas e antígenos de promastigotas de *Leishmania(L.) chagasi*, respectivamente. Os resultados foram marcados com + a ++++: Para a RIFI, os títulos sorológicos de 80-160 e de 320-640 foram dados de + a ++; em relação aos títulos de 1.280-2.560 e de 5.120-10.240 como +++ e ++++, respectivamente. Para a RIM, as reações exacerbadas (acima de 16mm) como ++++; as reações fortemente positivas(13-15mm) como +++; moderadamente positivas (9-12mm) como ++, e fracamente positiva (5-8mm) como +. A análise da diferença entre os perfis clínico-imunológicos da infecção foi baseada no programa BioEstat 4.0 e os testes Quiquadrado e Binomial com confiança de 95%. Durante o estudo, 12 pessoas infectadas mostraram os títulos sorológicos elevados (1.280 a 10.240 IgG) com reações negativas de RIM: 5 crianças e 2 adultos desenvolveram LVA com títulos de RIFI do 2.560 (IgG) e RIM negativa. Foram detectadas 2 crianças e 3 adultos que desenvolveram infecções sub-clínicas com títulos de RIFI de 1.280 (IgG) e RIM negativa. Além disso, os dois testes permitiram a identificação de 5 perfis clínico-imunológicos diferentes entre os 231 casos da infecção diagnosticados, como se segue: 1. 77% com infecção assintomática(IA), com a RIM que varia de +/++++ e RIFI negativa; 2. 2% com infecção sintomática(IS = LVA) e 3. 1,3% com infecção sub-clínica oligossintomática (IOS), grupos com RIM negativa e RIFI que varia de +++/++++; 4. 9.9% com uma infecção sub-clínica resistente (ISR), mostrando RIM e RIFI com +/++, e 5. 9.8% com uma infecção inicial indeterminada (III), com RIM negativa e RIFI +/++. A respeito da evolução da infecção, a observação principal era que somente um único caso IS(=AVL) evoluiu do perfil III(infecção inicial indeterminada), de uma amostra de 23 casos, enquanto a maioria das infecções evoluíram aos perfis ISR(9 casos) ou ISO(5 casos), sendo que os últimos 8 casos permaneceram como perfil III.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral americana. Infecção. Reação intradérmica de Montenegro. Reação de imunofluorescência indireta.

Dedico este trabalho

Ao professor e orientador Fernando Tobias Silveira, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, apoio irrestrito, amizade sincera, encorajamento contínuo e pelo “*insight*” sobre o tema que originou esta pesquisa.

À equipe de técnicos do laboratório de leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, pelo trabalho de campo realizado; ao Dr. Manoel Ayres, pela orientação na análise estatística dos resultados encontrados.

À minha amada esposa Carla que em nossa feliz convivência tem sido um oásis de amor, dedicação, sinceridade, carinho e paz, imprescindíveis à consecução deste trabalho.

Aos meus filhos Adriano e Felipe pela amizade, afeto e confiança nos valores que norteiam nossa trajetória de vida.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA (LVA)	10
1.2	HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA NO PARÁ	11
1.3	FORMAS CLÍNICAS DA INFECÇÃO HUMANA POR <i>L.(L.) chagasi</i>	13
1.4	UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) E REAÇÃO INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO (RIM) NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO HUMANA POR <i>L.(L.) chagasi</i>	15
2	OBJETIVOS	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	TIPO DE ESTUDO	18
3.2	ÁREA DE ESTUDO	18
3.3	EPIDEMIOLOGIA RECENTE SOBRE A LV NO MUNICÍPIO DE BARCARENA	19
3.4	DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ENVOLVIDA	19
3.5	CRITÉRIOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO HUMANA POR <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	20
3.6	PROCEDIMENTOS TÉCNICOS	21
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3.8	ASPECTOS ÉTICOS	22
4	RESULTADOS	22
4.1	PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO HUMANA POR <i>L.(L.) chagasi</i> NA VILA DE SANTANA DO CAFEZAL	23
4.2	FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO HUMANA POR <i>L.(L.) chagasi</i> DE ACORDO COM O SEXO, A IDADE E A ESPECIFICIDADE DA RIM E DA RIFI NA VILA DE SANTANA DO CAFEZAL	23
4.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA INFECÇÃO HUMANA POR <i>L.(L.) chagasi</i> NA VILA DE SANTANA DO CAFEZAL	25

5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8. APÊNDICES	41
8.1 APÊNDICE A – FICHA PROTOCOLO	42
8.2 APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO	44
9 ANEXO	46
9.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	47

LISTA DE FIGURAS

	(Título das Figuras)	(Página)
FIG. 1 -	Situação geográfica do município de Barcarena e da Vila de Santana do Cafezal, Pará, Brasil	19
FIG. 2 -	Distribuição da freqüência da infecção humana por <i>Leishmania (L.) chagasi</i> na localidade de Santana do Cafezal de acordo com a faixa etária	23
FIG. 3 -	Distribuição da freqüência das reações intradérmicas de Montenegro(RIM) segundo os intervalos das reações(mm)	24
FIG. 4 -	Distribuição da freqüência das reações de imunofluorescência indireta (RIFI) segundo os intervalos das reações sorológicas (IgG)	24
FIG. 5 -	Espectro clínico e imunológico da infecção humana por <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	26
FIG. 6 -	Distribuição da freqüência dos perfis clínico-imunológicos relativos a infecção humana por <i>Leishmania (L.) chagasi</i> na localidade de Santana do Cafezal, Barcarena, Pará	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA (LVA)

A leishmaniose visceral americana (LVA), também conhecida como calazar americano, é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica e arrastada, que pode cursar por vários meses, podendo ultrapassar até um ano. A transmissão do agente causal, um protozoário da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* e da espécie *Leishmania chagasi*, é feita através da picada do inseto flebotomíneo (Díptera: Psychodidae) *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON et al. 1985, 1990).

É uma doença parasitária com distribuição geográfica no antigo e no novo mundo, com uma incidência mundial estimada em 500.000 novos casos humanos em cada ano. A LVA é a mais grave forma clínica dentro do complexo leishmaniose, e é endêmica em 88 países em situação de risco, com uma população de aproximadamente 350 milhões de indivíduos. (FRANKE et al, 2002, p. 914)

No Brasil, a doença apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função da sua ampla distribuição, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste. Atualmente, na região Amazônica do Brasil, a LVA só é encontrada em dois Estados, Pará e Roraima (LAINSON et al. 1984).

A LVA é uma zoonose mais frequentemente estabelecida nas áreas rurais, onde a doença pode encontrar condições ambientais e sociais mais propícias para a manutenção do seu ciclo biológico. Na região Amazônica, a raposa do campo (*Cerdocyon thous*) é o principal reservatório silvestre da *Leishmania (L.) chagasi* (SILVEIRA et al. 1982). Enquanto que em área urbana e periurbana de cidades de pequeno e médio porte o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção.

No ser humano, a suscetibilidade à LVA é universal, atingindo indivíduos de todas as faixas etárias e sexo, porém acomete principalmente as crianças, sendo a maioria menor de cinco anos de idade, face ao seu estado de imaturidade imunológica. Quando a doença atinge os seus estágios mais avançados sem o devido diagnóstico e tratamento, pode levar o indivíduo parasitado em 95% dos casos ao óbito (BADARÓ et al. 1986).

Na maioria dos casos, a LVA tem evolução lenta, iniciando, geralmente, com febre, de caráter irregular, moderada, que pode ser acompanhada de perda do apetite, emagrecimento, distensão abdominal (por aumento das vísceras - fígado e baço), anemia e palidez cutânea. Além desses sintomas, os doentes desenvolvem frequentemente, infecções oportunistas, principalmente, as gastrintestinais e pulmonares; ocasionadas pelo comprometimento da medula óssea e órgãos linfóides (NETO & FARHAT, 1994).

No tocante à imunidade da LVA, há comprometimento dos macrófagos, células que participam da ativação dos linfócitos T CD4+. Ocorre desequilíbrio nas vias de ativação Th1 e Th2, com diminuição da resposta Th1 protetora. Observa-se diminuição de IL-2, IL-12 e interferon-gama (INF- γ), e elevação dos níveis de IL-4, IL-10 e do fator de necrose tumoral alfa (FNT- α ou caquectina). Os níveis do FNT- α parecem estar relacionados com a gravidade do caso (CARVALHO et al. 1992; PEARSON, 1995).

Os receptores eritrocitários tipo 1 do complemento (CIR) estão diminuídos durante a doença. E ainda, como conseqüência mais grave, observa-se a supressão das respostas mediadas por linfócito T. Estando a imunidade celular profundamente alterada na LVA, com ausência de resposta de hipersensibilidade celular do tipo IV. A imunidade humoral é ativada através dos linfócitos B, com elevação de anticorpos naturais. Há deposição de imunocomplexos circulantes com anticorpos específicos e antígenos parasitários nos hospedeiros, em órgãos de depuração, causando reação inflamatória crônica e lesão tecidual (CÂMARA et al. 1997; WHITNER et al. 1992).

Em trabalho experimental utilizando hamsters ocorreu apoptose em amastigotas no fígado e baço infectados com leishmaniose visceral 90 dias pós - infecção. DNA fragmentação também foi evidenciada no mesmo período de observação, sugerindo que a apoptose pode constituir um mecanismo que regula o crescimento da população do parasita durante certas fases da infecção (LINDOSO; COTRIM;GOTO, 2004).

1.2. HISTÓRICO DA LVA NO PARÁ

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma antropozoonose, descrita inicialmente na região da Amazônia Brasileira por Penna (1934) que, durante um

estudo extensivo de tecidos de viscerotomia pós-morte de indivíduos que teriam morrido de febre amarela em várias partes do Brasil, diagnosticou 3 casos de leishmaniose visceral no estado do Pará. Observou, também, que todos eram de uma região de selva do nordeste do Pará, dos municípios de Abaetetuba e Mojú onde, nos dois anos seguintes, outra informação relevante foi obtida a respeito da ecologia e da epidemiologia da doença, pois em 1937, Cunha e Chagas estudando casos desses municípios deram o nome de *Leishmania chagasi* ao agente etiológico da LVA, (posteriormente referido como *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, (LAINSON & RANGEL 2005). Em 1938, Evandro Chagas e outros descreveram mais 8 casos de LVA no município de Abaetetuba e a presença de cães infectados. Descobriram que o inseto mais comum no domicílio e no peridomicílio de indivíduos infectados eram os mosquitos flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis*, sugerindo que eles representavam o vetor mais provável do parasita.

A morte prematura de Evandro Chagas em 1940, fez com que as observações adicionais a respeito da LVA na Amazônia Brasileira ficassem temporariamente limitadas ao relato de algumas características clínicas e epidemiológicas a respeito de casos isolados nas regiões norte, nordeste e oeste do Pará (ALENCAR et al, 1962; COSTA, 1966). Por isso após quarenta e seis anos do primeiro relato da doença nesta região do Brasil (PENNA, 1934), apenas 32 casos tinham sido registrados. Em conseqüência a LVA passou a ser considerada como uma doença ocasional e esporádica na Amazônia. Entretanto uma mudança progressiva na epidemiologia da LVA na Amazônia brasileira estava ocorrendo, como ficaria claramente evidenciada com o passar dos anos. Assim, em somente 2 anos (1984-1985), foram registrados um total de 135 casos nos limites da cidade de Santarém, oeste do Pará (LAINSON et al.1984). Em um período recente de 5 anos (1999 a 2004) a Secretaria de Saúde do Estado do Pará (SESPA) registrou uma média de aproximadamente 235 casos/ano no estado de Pará (SESPA, 2004).

O aumento de casos diagnosticados de LVA durante anos recentes é multifatorial. O principal fator envolvido, entretanto, é o desmatamento desordenado, que resulta na invasão do ambiente peri-domiciliar pelo mosquito vetor *Lutzomyia longipalpis*. Entre outros fatores que elevam o número de diagnósticos de LVA, destaca-se também a presença de uma grande população de cães, que são altamente suscetíveis à infecção pela *L. (L.) chagasi*, e apresentam intenso parasitismo cutâneo, o que permite uma fácil infecção do mosquito, transformando

esses animais na principal fonte da infecção humana contribuindo para a manutenção do ciclo peri-domiciliar da endemia (LAINSON 1988; LAINSON & RANGEL 2005).

Os principais focos da doença no Pará estão distribuídos nas regiões norte, nordeste e oeste do Estado, com ênfase à região Nordeste, onde está concentrada a maior casuística da doença. Nessa região, os municípios mais acometidos são: Baião, Mocajuba, Cametá, Barcarena, Mojú, Igarapé-Miri e Tucuruí (LAINSON et al. 1984).

A migração de indivíduos não imunizados de outras regiões; o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e a consciência crescente dos médicos a respeito da importância de incluir LVA no diagnóstico diferencial de pacientes febris poderá contribuir para o diagnóstico mais precoce da doença (LAINSON 1989).

1.3. FORMAS CLÍNICAS DA INFECÇÃO HUMANA POR *L. (L.) chagasi*.

A interação entre a *Leishmania (L.) chagasi* e o sistema imunológico humano pode resultar em um largo espectro de manifestações clínicas, variando de um estágio assintomático da infecção nos indivíduos resistentes que apresentam uma resposta imune Th1(hipersensibilidade) para a um estágio sintomático nos suscetíveis, em que supressão específica da resposta imune Th1(anérgica), conduz à doença aguda sintomática, ou seja, à leishmaniose visceral americana (LVA). Entre estes dois estágios polares, entretanto, alguns indivíduos podem mostrar uma condição clínico-imunológica intermediária conhecida como a infecção subclínica oligossintomática, em que os sinais clínicos e as respostas imunológicas ainda não são claramente definidos.

No Brasil, foram realizados alguns trabalhos que tentam compreender os diferentes padrões da infecção (BADARÓ et al. 1986; JERÔNIMO et al., 2000; GAMA et al.2004), discutindo a interação clínica entre a resposta imune humana contra a infecção pela *L. (L.) chagasi*. A maioria desses trabalhos foi realizada somente em jovens de 15 anos de idade, e parte da premissa que os dados obtidos

aparentemente podem também ser aplicados a todos os indivíduos em diferentes faixas etárias. Embora a doença aguda sintomática (LVA) represente uma condição de imunossupressão que é encontrada mais freqüentemente nas crianças (SILVEIRA et al. 1997), há também um número significativo de casos em indivíduos adultos jovens que desenvolvem LVA. Essa é a situação de algumas localidades na Amazônia Brasileira, tais como, o município de Barcarena, no estado de Pará, que registrou aproximadamente 44% de pacientes de LVA acima de 15 anos (SESPA, 2004).

Baseada em evolução clínica a doença apresenta três períodos: período inicial, período de estado e período final (BRASIL, 2007).

- Período inicial – Caracteriza o início da sintomatologia, que varia de paciente para paciente, mas na maioria dos casos inclui febre com duração inferior a 04 semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Em área endêmica uma pequena proporção de indivíduos, geralmente crianças, pode apresentar quadro clínico discreto, com duração de aproximadamente 15 dias, evoluindo espontaneamente para cura (forma oligossintomática). A combinação de manifestações clínicas e alterações laboratoriais que melhor parece caracterizar a forma oligossintomática é: febre, hepatomegalia, hiperglobulinemia e velocidade de hemossedimentação elevada.

- Período de estado – Apresenta quadro clínico insidioso na maioria dos casos com evolução acima de 02 meses. Caracteriza-se por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e incremento da hepatoesplenomegalia.

- Período final – Caso a doença não seja diagnosticada e tratada a febre torna-se contínua e o estado geral fica ainda mais comprometido. O paciente apresenta desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca) e edema de membros inferiores que pode evoluir à anasarca. Podem surgir manifestações hemorrágicas (epistaxe, gengivorragia ou petéquias), icterícia e ascite. Nestes pacientes o óbito ocorre devido a sangramentos (freqüentemente a hemorragia digestiva) e/ou infecções bacterianas, tais como, otite média aguda, infecção do trato urinário, pneumonia, que podem evoluir para sepse (BRASIL, 2007).

1.4 UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) E REAÇÃO INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO (RIM) NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO HUMANA POR *L. (L.) chagasi*.

Nas áreas onde a leishmaniose visceral americana é endêmica a Reação de Imunofluorescência Indireta(RIFI) tem sensibilidade acima de 90%. A dificuldade na utilização de testes sorológicos como a RIFI no diagnóstico da LVA se refere a especificidade, pois alguns antígenos de leishmania tem reação cruzada em relação a antígenos da leishmaniose tegumentar americana(LTA) e de outros microorganismos, bactérias ou vermes tais como, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Mycobacterium* e *Schistosoma*. Posteriormente verificou-se que alterações nos antígenos utilizados para RIFI reduziram os resultados falso-positivos(LEE & GILBERT 1999).

Na região Amazônica, um dos fatores que têm contribuído para o adiamento do diagnóstico e tratamento dos casos recentes da LVA, comprometendo inclusive a sua notificação, refere-se à falta de definição clínica e laboratorial da forma subclínica ou oligossintomática da doença. A este respeito, o próprio documento oficial do Ministério da Saúde: Manual de Normas Técnicas sobre Controle, Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose Visceral (2004), informa, de maneira pouco objetiva, que esta forma da doença é pouco identificável, face aos sintomas discretos apresentados pelos doentes: febre baixa ou ausente, pouco comprometimento do estado geral, tosse, diarreia, emagrecimento, adinamia e hepatoesplenomegalia pouco palpáveis ou ausentes. Com relação aos exames laboratoriais, as provas inespecíficas são de pouca utilidade diagnóstica, enquanto que as provas sorológicas de imunofluorescência indireta e ELISA são sempre positivas.

Embora a casuística de LVA tenha aumentado drasticamente nos últimos anos, especialmente no estado do Pará, tem ocorrido pouca pesquisa de campo nesta região que indique a prevalência em termos das infecções sintomáticas (LVA aguda e formas subclínicas da doença) e/ou assintomáticas. Tal estudo é, sem dúvida, de fundamental importância para compreender de forma mais completa a dinâmica envolvida na transmissão da *L. (L.) chagasi* ao homem. De fato, a única informação disponível a respeito da interação da resposta imune humana à infecção com este parasita veio do estudo dos pacientes com a doença sintomática aguda

(LVA), uma condição de imunossupressão que representa apenas a ponta do *iceberg* nesta interação (LAINSON & SHAW 2005; SILVEIRA et al. 1997).

O cerne desta dissertação não compreende o estudo da LVA doença, ou seja, o desajustamento ou uma falha nos mecanismos de adaptação do organismo ou ausência de reação aos estímulos cuja ação está exposto, processo que conduz a uma perturbação da estrutura ou da função de um órgão, ou de um sistema ou de todo o organismo ou de suas funções vitais (JENICEK & CLÉROUX, 1982, APUD ROUQUAYROL, 1993, p. 533). Esta dissertação utiliza métodos diagnósticos que em conjunto possibilitem identificar a LVA infecção, a saber, a penetração e o desenvolvimento ou multiplicação de um agente infeccioso, no caso a *L. (L.) chagasi*, no organismo de uma pessoa (OPS, 1992, p.578).

Neste estudo, foi utilizada a intradermorreação de Montenegro (RIM) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detectar a prevalência da infecção e, secundariamente, para avaliar as manifestações clínicas e imunológicas dos indivíduos infectados, procurando uma compreensão melhor da infecção humana pela *L. (L.) chagasi*, que representa o objetivo principal deste trabalho. Ao utilizar estes métodos diagnósticos se pretende também estabelecer parâmetros específicos, de fácil constatação na prática diária, principalmente, no sentido de auxiliar as equipes de saúde das áreas endêmicas quanto ao diagnóstico, seguimento e, também, a intervenção terapêutica precoce para esse problema de saúde pública em nossa região.

A magnitude da LVA, como agravo à saúde das populações em áreas endêmicas e a escassez de informação sobre os aspectos clínico-imunológicos relacionados à interação entre a infecção da *L. (L.) chagasi* e a resposta imune humana na região Amazônica, avalizam a realização de um estudo transeccional na Vila de Santana do Cafezal no município de Barcarena, o qual apresentou uma média de 2.8 casos de LVA por ano (SESPA, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 PRINCIPAL:

- Caracterizar o espectro clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) chagasi* na região amazônica brasileira.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Identificar, através de marcadores imunológicos reação intradérmica de Montenegro (RIM) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os indivíduos portadores de infecção por *L. (L.) chagasi*, assintomática e/ou sintomática (LVA e formas sub-clínicas), em uma área endêmica de leishmaniose visceral no Estado do Pará;

- Caracterizar a infecção do ponto de vista clínico e imunológico;

- Determinar a taxa de prevalência da infecção na área em estudo;

- Comparar as taxas de prevalência da infecção entre indivíduos com resposta imune celular (hipersensibilidade tardia) e com resposta imune humoral (soro-reagentes).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO:

Esta investigação baseou-se em estudo epidemiológico do tipo transeccional em uma coorte de 946 indivíduos, residentes em área endêmica de leishmaniose visceral na localidade Santana do Cafezal, município de Barcarena, norte do Estado do Pará. Visando determinar a presença da infecção assintomática e/ou sintomática por *Leishmania (L.) chagasi*, os indivíduos foram avaliados pela reação intradérmica de Montenegro (RIM) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ambas realizadas com antígeno bruto e homólogo, formas promastigotas para RIM e amastigotas para RIFI.

3.2 ÁREA DO ESTUDO:

Este estudo foi realizado na localidade de Santana do Cafezal, que compreende uma comunidade de colonos residentes às margens do rio Cafezal, distante apenas 7 km da sede do município de Barcarena, que integra a região metropolitana de Belém, capital do Estado do Pará e cujas coordenadas geográficas são as seguintes: 01° 30' 24" latitude sul e 48° 37' 12" longitude oeste. O clima da região é do tipo equatorial, úmido, com temperatura média de 27°C e o índice pluviométrico fica acima de 2.500 mm/ano, sendo os primeiros seis meses do ano (Janeiro-Junho) o período de maior ocorrência. A cobertura vegetal da floresta primária foi quase totalmente substituída pela ação dos desmatamentos (cerca de 60%) para o plantio de culturas agrícolas de subsistência, dando ensejo à regeneração florestal com diferentes estágios de desenvolvimento da floresta secundária. A população do município de Barcarena foi estimada em 68.604 habitantes (IBGE, 2003), enquanto a população da localidade Santana do Cafezal era de 1.064 habitantes no momento do início do estudo, dos quais cerca de 70% residem em área de terra firme, em casas de madeira cercadas de floresta secundária e, o restante, na várzea, com vegetação baixa, inundada pelas águas do rio Cafezal duas vezes por dia (Fig. 1).

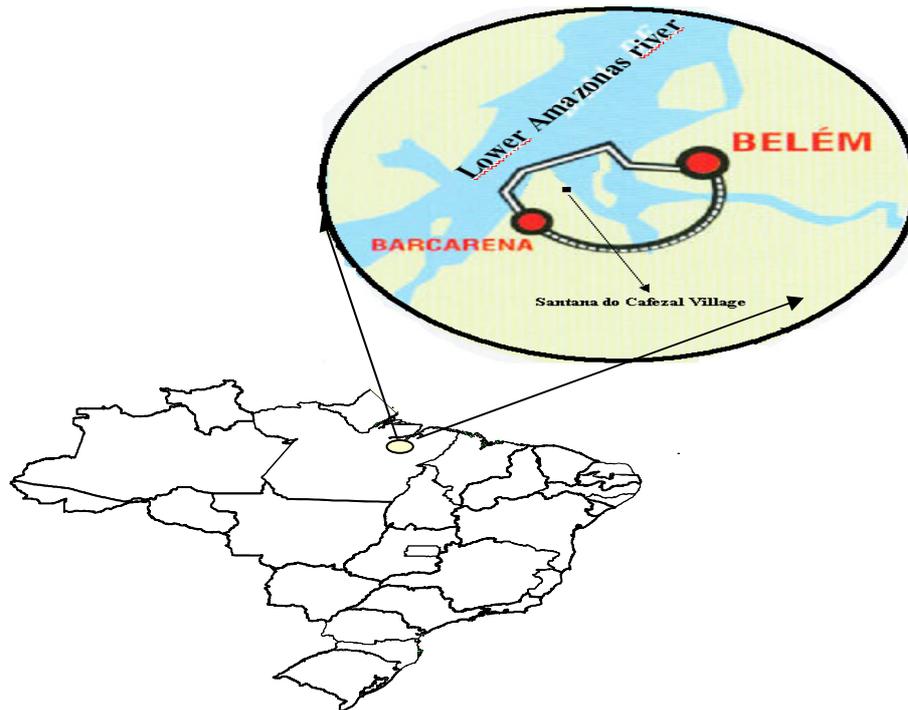


Figura 1. Situação geográfica do município de Barcarena e da Vila de Santana do Cafezal na região nordeste do Estado do Pará, Brasil.

3.3 EPIDEMIOLOGIA RECENTE SOBRE A LVA NO MUNICÍPIO DE BARCARENA:

No período compreendido de 2.000 a 2.004, o município de Barcarena registrou uma incidência média anual de 0.36 casos de leishmaniose visceral por 1.000 habitantes (SESPA, 2004), sendo 67% dos casos no sexo masculino e 56% em menores de 15 anos. No mesmo período, foram registrados 14 casos de LVA na localidade Santana do Cafezal, o que promoveu uma média anual de 2.8 casos da doença nesse período.

3.4 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ENVOLVIDA:

Com base nos objetivos acima relacionados, ou seja;

- A identificação dos indivíduos portadores de infecção assintomática e/ou sintomática por *Leishmania (L.) chagasi*,

- A avaliação da infecção do ponto de vista clínico e imunológico,
- A estimativa da prevalência, no momento da realização da intervenção na comunidade, em amostra inicial de 946 indivíduos da população total de 1.064 pessoas da localidade Santana do Cafezal, de ambos os sexos (568 homens e 378 mulheres) e com idade ≥ 1 ano.

Com o intuito de obter um melhor entendimento da dinâmica de transmissão da infecção, a população foi estratificada em três grupos etários: 1 a 10 anos, 11 a 20 anos e ≥ 21 anos. Assim sendo, foi previsto serem utilizadas, simultaneamente, a RIM e a RIFI em todos os indivíduos previamente selecionados para a intervenção da prevalência, quando seria feito o diagnóstico inicial de todos os indivíduos portadores de infecção assintomática e/ou sintomática pela *Leishmania (L.) chagasi*. Além disto, foi previsto, também, que os indivíduos que apresentassem reatividade imunológica para RIM e/ou para RIFI, passariam por uma avaliação clínica, visando detectar qualquer tipo de sintomatologia compatível ou sugestiva da infecção por *Leishmania (L.) chagasi*, que pudesse ser associada a um dos perfis de resposta imunológica diagnosticados.

3.5 CRITÉRIOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO HUMANA POR *Leishmania (L.) chagasi*:

A definição de caso da infecção humana por *Leishmania (L.) chagasi* foi baseada em avaliação diagnóstica com dois parâmetros imunológicos, a reação intradérmica de Montenegro (RIM) e a reação de imunofluorescência Indireta (RIFI). Os dois testes imunológicos foram realizados com antígeno bruto e homólogo de *Leishmania (L.) chagasi* (MCAO/BR/2004/M22967/Barcarena, Pará), formas promastigotas para RIM e amastigotas para RIFI. Entretanto, como a RIFI evidencia a imunidade humoral, associada à resposta CD4+ Th2 (anticorpopogênese = susceptibilidade), e a RIM evidencia a imunidade celular, ligada à resposta CD4+ Th1 (hipersensibilidade = resistência), portanto, funções imunobiológicas específicas e opostas, a definição de infecção pela *Leishmania (L.) chagasi* foi assumida como a presença de reatividade para uma ou ambas as reações imunodiagnósticas, a RIM e/ou a RIFI. Além disso, na tentativa de expressar a especificidade da RIM e da RIFI foi realizada uma avaliação semi-quantitativa dos resultados com escores de + a

++++ cruces, da seguinte maneira: títulos sorológicos variando de 80 a 160 e de 320 a 640 receberam + e ++, enquanto que os títulos de 1.280 a 2.560 e de 5.120 a 10.240 (IgG) receberam +++ e +++++, respectivamente. Por outro lado, as reações intradérmicas (RIM) exacerbadas (≥ 16 mm) receberam +++++, as fortemente positivas (13-15 mm) +++, as moderadamente positivas (9-12 mm) ++ e as fracamente positivas (5-8 mm) +. Desse modo, foi assumido que as reações com título sorológico iguais a 80 (IgG) e aquelas que formaram pápulas ou endureções dérmicas iguais a 5 mm de diâmetro foram consideradas limitantes positivas (“cut-off”) para a RIFI e RIM, respectivamente (Lima et al. 2003, Silveira et al. 1991, 1998).

3.6 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS:

Os procedimentos metodológicos usados para realização da RIM visando evidenciar a resposta imune de hipersensibilidade contra a infecção humana por *Leishmania (L.) chagasi* foram semelhantes àqueles utilizados em trabalhos prévios sobre a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (Silveira et al. 1991, 1998), porém, com uma diferença bastante significativa relacionada à especificidade do antígeno empregado no presente trabalho. Ou seja, considerando que a localidade Santana do Cafezal, município de Barcarena, fica localizada em área de ocorrência de ambos os tipos de leishmanioses, tanto a LVA como a LTA, foi necessário a utilização de um antígeno altamente específico para ser reconhecido pela resposta imune de hipersensibilidade induzida pelo agente da LVA, a *Leishmania (L.) chagasi*. Por esta razão, visando garantir um alto grau de especificidade da RIM, foi usado um antígeno bruto, de formas promastigotas de fase estacionária de cultivo (meio RPMI 1640) de *Leishmania (L.) chagasi* (MCAO/BR/2004/M22967/Barcarena, Pará), na concentração equivalente a 10×10^6 parasitos/ml. O espectro de reatividade da reação já foi acima mencionado.

Por outro lado, para realização da RIFI tomou-se como referência o trabalho de Lima et al. (2003), que demonstrou ser o antígeno de formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* mais específico e mais sensível do que os de formas promastigotas da mesma espécie, formas promastigotas de *Leishmania (L.) major-like* (Bio-Manguinhos, Brasil) e formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Portanto, optou-se pela utilização, também, de um antígeno de alta especificidade

para ser usado através da RIFI, visando garantir uma resposta imune humoral (IgG) altamente específica. Mais uma vez, o espectro de positividade esperado para o teste já foi apresentado acima.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística dos resultados foi feita através do programa BioEstat 4.0 e os testes Qui-quadrado e Binomial foram usados para análise da significância das diferenças, com intervalo de confiança de 95%.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS:

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa de seres humanos do Instituto Evandro Chagas, sendo protocolado com o número CEP/IEC 16/2003. Além disso, para a realização do mesmo foi imprescindível a autorização dos pacientes atendidos, conforme termo de consentimento livre e esclarecido.

4 RESULTADOS

4.1 PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO HUMANA POR *L. (L.) CHAGASI* NA VILA SANTANA DO CAFEZAL:

Para avaliação da prevalência, foram examinados 946 indivíduos residentes na localidade Santana do Cafezal, sendo todos avaliados, simultaneamente, pela RIM e RIFI, cujo resultado mostrou que a taxa de Prevalência da infecção pela RIM de 11.2% (106/946) foi significativamente maior ($p < 0.0001$) que a obtida pela RIFI de 3.4% (32/946). Entretanto, quando essas taxas foram estimadas combinando as duas reações, foi observado que entre os 106 indivíduos RIM positivos, 18 (17%) eram também positivos pela RIFI e, que, entre os 32 positivos pela RIFI, os mesmos 18 (56.2%) eram positivos pela RIM. Esta combinação, usando os dois testes juntos,

permitiu a identificação de uma taxa atual de prevalência da infecção de 12.6% (120/946) na comunidade.

4.2 FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO HUMANA POR *L. (L.) chagasi* DE ACORDO COM O SEXO, A IDADE E A ESPECIFICIDADE DA RIM E DA RIFI, NA VILA SANTANA DO CAFEZAL:

De acordo com o sexo, a distribuição dos 120 casos da infecção diagnosticados por ocasião da intervenção da prevalência mostrou que não houve diferença ($p > 0.05$) entre a taxa de infecção encontrada para os homens de 55.8% e das mulheres de 44.2%. Por outro lado, quando a frequência da infecção foi examinada dentro dos grupos etários, também foi visto que não houve diferença ($p > 0.05$) entre as taxas dos dois grupos menores de idade, 1-10 vs.11-20 anos de idade, 19.2% e 25.8%, respectivamente. Contudo, quando essas taxas foram comparadas com aquela relativa ao grupo de faixa etária maior, ≥ 21 anos, as duas foram significativamente menores ($p < 0.05$), indicando que mais da metade dos indivíduos infectados (55%) fazia parte do grupo de faixa de idade maior (Fig. 2).

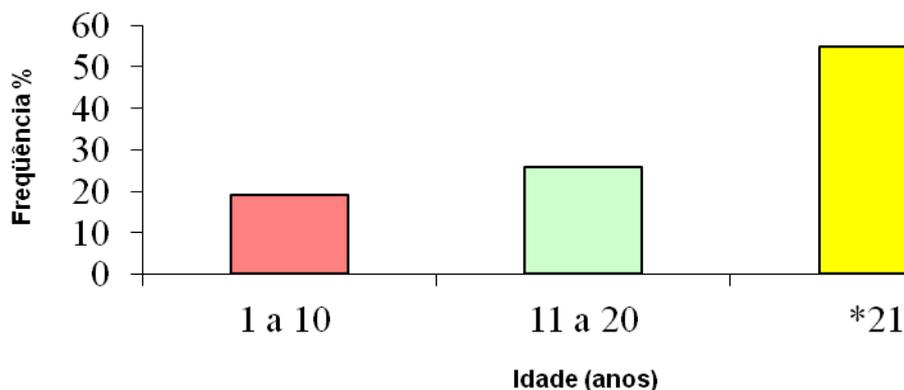


Figura 2 - Distribuição da frequência da infecção humana por *Leishmania (L.) chagasi* na localidade Santana do Cafezal, Barcarena, Pará, de acordo com a faixa de idade. * ≥ 21 a

Com relação à especificidade da RIM e da RIFI, foi observado que entre os 106 casos reativos pela RIM 41.5% apresentaram reação exacerbada (++++), 14.1% reação fortemente positiva (+++), 19.8% reação moderadamente positiva (++) e

24.6% reação fraca (+), indicando que 55.6% eram portadores de um forte (+++/++++) caráter de resistência imunológica (hipersensibilidade) contra a infecção (Fig. 3).

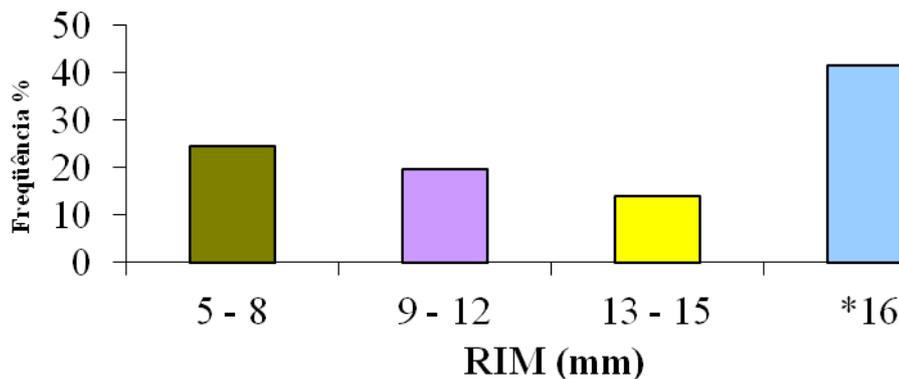


Figura 3 – Distribuição da frequência das reações intradérmicas de Montenegro (RIM), segundo os intervalos das reações (mm). * ≥ 16 mm.

Ao contrário, entre os 32 casos reativos pela RIFI, 21.8% apresentaram baixa reatividade sorológica (+), 53.1% moderada reatividade (++), 18.8% forte reatividade (+++) e 6.3% exagerada reatividade (++++) (Fig. 4).

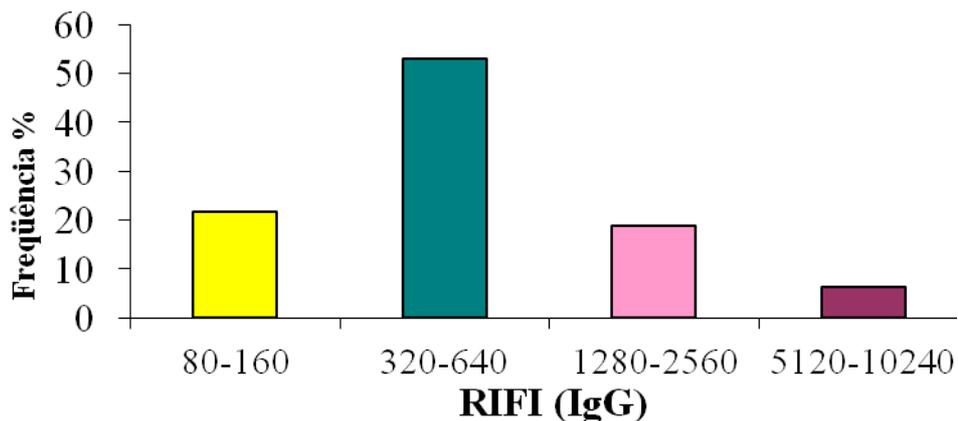


Figura 4 – Distribuição da frequência das reações de imunofluorescência indireta (RIFI), segundo os intervalos das reações sorológicas (IgG).

Desse modo, somente 25.1% dos casos apresentaram elevada reatividade humoral, variando de forte (+++) a exagerada (++++) resposta de anticorpos, demonstrando uma significativa característica de susceptibilidade imunológica para a

infecção. Da amostra estudada quatro casos eram típicos de LVA (duas crianças e dois adultos), o que gerou uma taxa de prevalência da LVA de 0.42%, enquanto outros quatro casos (um adolescente e três adultos) exibiam algumas manifestações clínicas, associadas ou não, de duração imprecisa, sugestivas de infecção subclínica oligossintomática, tais como: astenia, palidez, adenopatias e discreta hepatomegalia.

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA INFECÇÃO HUMANA POR *L. (L.) chagasi* NA VILA SANTANA DO CAFEZAL:

Considerando que o diagnóstico da infecção foi baseado em dois testes que expressavam atividades imunobiológicas específicas, a RIM ligada à resposta imune CD4+Th1 (hipersensibilidade = resistência) e a RIFI à resposta imune CD4+Th2 (resposta humoral = susceptibilidade) e, ainda, que foi previsto usar os dois testes, simultaneamente, visando estabelecer um diagnóstico do perfil da resposta imune dos indivíduos infectados, por estas razões foram feitas algumas combinações com os dois métodos (RIM x RIFI), objetivando conhecer as possíveis variáveis resultantes da interação entre a *L. (L.) chagasi* e a resposta imune CD4+ (Th1 x Th2) dos indivíduos infectados.

Desse modo, no momento da avaliação foram diagnosticados, simultaneamente, pela RIM e pela RIFI um total de 120 indivíduos infectados, o que gerou uma taxa de prevalência real da infecção de 12.8%. Destes, a grande maioria (73.4%) era assintomática, e com perfil de resposta imune caracterizado pela presença de hipersensibilidade e ausência de resposta humoral (RIM+/++++ e RIFI-), motivo, pelo qual, foi denominado de perfil clínico-imunológico de Infecção Assintomática (IA).

Por outro lado, a minoria (6.6%) apresentava perfil de resposta imune (RIM- e RIFI+++ /++++) que podia estar associado a, pelo menos, dois perfis clínico-imunológicos:

- 1) Infecção sintomática (IS= LVA) ou
- 2) Infecção sub-clínica oligossintomática (ISO).

A diferença entre os dois perfis foi puramente clínica, já que o primeiro foi diagnosticado em quatro (3.3%) casos típicos de LVA (duas crianças e dois adultos), o que caracterizou uma taxa de prevalência para a LVA de 0.42%. O segundo, em

outros quatro (3.3%) indivíduos (um adolescente e três adultos) que tinham diferentes manifestações, associadas ou não, de duração imprecisa, que não caracterizavam, entretanto, o quadro clínico típico da LVA, tais como: astenia, palidez, fraqueza, perda do apetite, adenopatias e hepatomegalia discreta (fígado a 2 cm abaixo do rebordo costal direito), porém, sem febre e/ou esplenomegalia. Apresentavam, ainda, algumas alterações hematológicas, associadas ou não, como anemia e leucopenia, leves ou moderadas.

Além desses, havia ainda 15% de indivíduos infectados cujo perfil de resposta imune era reagente para ambos os testes (RIM+ /++ e RIFI+ /++) e que, da mesma maneira dos casos do perfil IA, eram todos assintomáticos, sugerindo um perfil clínico-imunológico intermediário de resistência (RIM+ /+++), denominado infecção sub-clínica resistente (ISR).

Por último, restaram apenas 5% de indivíduos infectados, todos assintomáticos também, cujo perfil de resposta imune era, a princípio, principalmente do tipo humoral (RIM-e RIFI+ /+++), porém, com títulos sorológicos de baixa reatividade (80-640 IgG), razão pela qual foi considerado um grupo recém-infectado, ainda não definido do ponto de vista da sua evolução clínica e imunológica, assim, intitulado, perfil clínico-imunológico Infecção inicial indeterminada (III), com potencial para evoluir para os perfis de susceptibilidade imunológica IS (=LVA) e ISO (RIM-e RIFI+++ /++++) ou de resistência imunológica ISR (RIM+ /++ e RIFI+ /++) e IA (RIM+ /++++ e RIFI-). O espectro clínico-imunológico da infecção humana pela *L. (L.) chagasi* encontra-se expresso no quadro abaixo (Fig. 5).

Pólo Imunológico Susceptível Infecção Sintomática (LVA)	Pólo Imunológico Resistente Infecção Assintomática
RIM- RIFI +++/++++	RIM +/++++ RIFI-
Infecção Sub-clínica Oligosintomática	Infecção Sub-clínica Resistente
RIM - RIFI +++/++++	RIM +/++ RIFI +/++
Infecção Inicial Indeterminada	
RIM - RIFI +/++	

Figura 5: Espectro clínico e imunológico da infecção humana por *Leishmania (L.) chagasi*.

Detalhamento:

RIFI: reação de imunofluorescência indireta (IgG)

RIFI +++++: 5.120-10240 (IgG)

RIFI +++: 1.280-2.560 (IgG)

RIFI ++: 320-640 (IgG)

RIFI +: 80-160 (IgG)

RIFI -: negativo

RIM: reação intradérmica de Montenegro

RIM +++++: positiva exacerbada (≥ 16 mm)

RIM +++: fortemente positiva (13-15 mm)

RIM ++: moderadamente positiva (9-12 mm)

RIM +: fracamente positiva (5-8 mm)

RIM -: negativa

IA: Infecção Assintomática

IS: Infecção Sintomática (= LVA)

ISO: Infecção Sub-clínica Oligosintomática

ISR: Infecção Sub-clínica Resistente

III: Infecção Inicial Indeterminada

Estes resultados demonstraram que a taxa de freqüência do perfil clínico-imunológico IA de 73.4% foi significativamente maior ($p < 0.05$) que as taxas dos outros perfis, ISR (15%), III (5%), IS (=LVA) (3%) e ISO (3%), assim como, demonstraram ainda que a taxa de freqüência do perfil ISR foi maior ($p < 0.05$) também que as taxas dos outros três perfis, III, IS (=LVA) e ISO, entre os quais não houve diferença ($p > 0.05$) entre as suas freqüências (Fig.6).

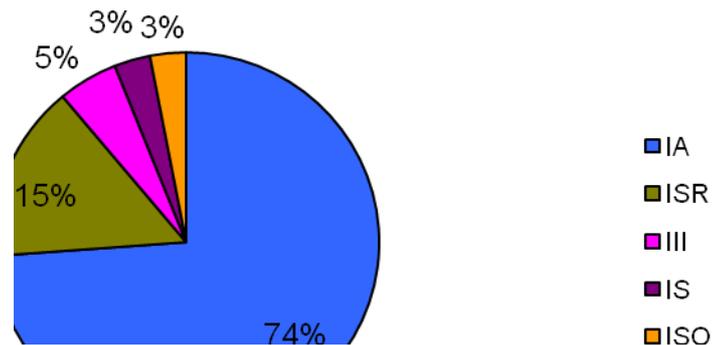


Figura 6 – Distribuição da freqüência dos perfis clínico-imunológicos relativos à infecção humana por *Leishmania (L.) chagasi* na localidade Santana do Cafezal, Barcarena, Pará.

Legendas: IA: Infecção Assintomática; ISR: Infecção Sub-clínica Resistente; III: Infecção Inicial Indeterminada; IS: Infecção Sintomática (= Leishmaniose Visceral Americana) e, ISO: Infecção Sub-clínica Oligosintomática.

5 DISCUSSÃO

Inicialmente, deve ser enfatizado que este representa um dos poucos trabalhos epidemiológicos do tipo transeccional, realizado no Brasil que examinou uma coorte de 946 indivíduos (≥ 1 ano de idade), utilizando, simultaneamente, dois métodos de imunodiagnóstico, a RIM e a RIFI, associados à avaliação clínica, com o fim não só de obter informações sobre a dinâmica de transmissão da infecção humana por *L. (L.) chagasi* em área endêmica de AVL, com ênfase à prevalência, mas também, de tentar conhecer melhor o espectro de alternativas que a resposta imune utiliza na sua interação com o protozoário.

A esse respeito, embora já existam alguns trabalhos realizados no Brasil focalizando a transmissão da infecção humana por *L. (L.) chagasi* (BADARÓ et al. 1986; CALDAS et al. 2001, 2002; NASCIMENTO et al. 2005), há necessidade de lembrar que a maioria limitou-se a um enfoque epidemiológico em crianças até 15 anos de idade. Nesse sentido, merece ser enfatizadas certas características da população estudada no presente trabalho, uma vez que a vila Santana do Cafezal, no município de Barcarena, Estado do Pará, é uma comunidade com mais de um século de existência, cuja população esteve representada por indivíduos pertencentes há, pelo menos, quatro gerações, com grande experiência de vida com o meio ambiente local. Desse modo, são indivíduos que vivem a longo tempo expostos à transmissão da *L. (L.) chagasi*, o que, muito possivelmente, pode estar favorecendo o desenvolvimento de um estado de imunidade concomitante no seio da comunidade.

Em contrapartida, apesar de ser uma população de baixo poder aquisitivo, a base da sua alimentação é suprida pela agricultura de subsistência e pela pesca, razão, pela qual, nos indivíduos observados neste estudo mediante avaliação semiológica (anamnese e exame físico) a desnutrição foi um achado pouco comum. Desse modo, apesar de existirem evidências recentes sugerindo que a susceptibilidade à leishmaniose visceral parece fortemente controlada por mecanismo genético (BLACKWELL et al. 2004), é possível que os fatores ambientais e nutricionais referidos estejam contribuindo no sentido de promover um melhor desempenho da resposta imune contra a infecção pela *L. (L.) chagasi*, haja vista que a prevalência (0.42%) da doença foi pouco expressiva no presente estudo.

Com respeito à infecção humana pela *L. (L.) chagasi*, é importante salientar que, no presente estudo, esta questão recebeu dois tipos de abordagens. A

primeira, através da análise isolada das taxas de prevalência da infecção, pela RIM e pela RIFI, o que possibilitou uma visão específica e, ao mesmo tempo, comparativa entre os dois tipos de respostas imunes, celular e humoral. A segunda, através da combinação dos resultados da RIM e da RIFI, ou seja, dos indivíduos que reagiram, simultaneamente, pela RIM e RIFI, o que permitiu determinar a prevalência real da infecção, numa tentativa de representar a verdadeira situação da infecção na área estudada.

Com base no primeiro tipo de análise, foi visto que a taxa de prevalência da infecção pela RIM de 11.2% foi superior ($p < 0.05$) à da RIFI de 3.4%, respectivamente, demonstrando que, entre os indivíduos naturalmente infectados, havia uma parcela significativamente maior de casos da infecção com caráter de resistência imunológica (RIM positiva= hipersensibilidade), fato que pode ajudar a explicar os achados pouco expressivos referentes à prevalência (0.42%) da doença no presente estudo. Além disso, considerando que ambos os testes foram realizados com antígeno da mesma cepa de *L. (L.) chagasi*, forma promastigota para RIM e amastigota para RIFI, é absolutamente improvável que as diferenças encontradas nas avaliações de prevalência da infecção, entre a RIM e a RIFI, possam ser atribuídas a uma variabilidade na especificidade dos antígenos usados nesses testes.

Ainda no sentido de comparar as taxas da infecção entre um método de avaliação imune celular (RIM) e outro imune humoral (RIFI ou ELISA), sem dúvida merecem ser discutidos alguns trabalhos previamente publicados, porém, faz-se necessário lembrar que algumas diferenças de natureza metodológica e/ou epidemiológica podem influenciar nos resultados encontrados. A título de exemplo, faz-se oportuno mencionar um estudo prospectivo em área endêmica de alta transmissão de LVA no município de Jacobina, Estado da Bahia, nordeste do Brasil (BADARÓ et al.1986a, b). Onde utilizou-se o extrato solúvel de *Leishmania donovani chagasi* (= *Leishmania (L.) chagasi*) como antígeno para reação intradérmica de Montenegro (RIM), visando o diagnóstico da infecção. Portanto, diferentemente da metodologia do presente trabalho, os autores procuraram determinar a prevalência da infecção somente pela RIM, cuja taxa foi encontrada foi de 34.1%.

Desse modo, considerando que a expressão da infecção não se limita somente a um dos tipos de respostas imunes, celular ou humoral, ficou evidente que os resultados encontrados não refletiram a verdadeira situação epidemiológica da

infecção naquelas áreas de estudo. Além disso, os autores registraram, também, a taxa de prevalência da doença de 3.1% em crianças até 15 anos, a qual se mostrou mais elevada do que a encontrada neste trabalho (0.42%), fato que pode estar refletindo, possivelmente, dois aspectos inerentes à situação em Jacobina (Estado do Bahia):

a) um nível de transmissão da infecção mais elevado, cuja prevalência pela RIM foi 34.1%, e/ou

b) um potencial de susceptibilidade genética à doença maior na população infantil local.

Outro exemplo, diz respeito a dois trabalhos que estudaram a infecção por *L. (L.) chagasi* no município de Raposa, Estado do Maranhão, nordeste do Brasil, porém, com duas diferenças de natureza metodológica em relação a este trabalho; a primeira, relacionada à participação de crianças de até cinco anos de idade no estudo, o que representou uma limitação ainda maior em relação aos outros trabalhos; a segunda, pelo fato dos autores terem decidido utilizar dois antígenos bastante diferentes para o diagnóstico da infecção nos dois trabalhos: a) extrato solúvel de *Leishmania (L.) amazonensis* para diagnóstico pela RIM e, b) extrato solúvel de *L. (L.) chagasi* para diagnóstico sorológico por ELISA (CALDAS et al. 2001, 2002). Os resultados revelaram taxas de prevalência da infecção de 18.6% pela RIM e 13.5% por ELISA, sendo ambas maiores que as obtidas no presente trabalho, embora com perfil de resposta imune semelhante, ou seja, dentre os indivíduos infectados existia também uma parcela um pouco maior daqueles com resposta imune celular (RIM), com potencial de resistência à infecção. Entretanto, chamou a atenção uma prevalência (13.5%) quatro vezes maior (3.4%) que a deste trabalho entre os indivíduos com resposta humoral (anticorpopênese = susceptibilidade), o que talvez seja explicado pela concentração maior de indivíduos (crianças até 5 anos) mais susceptíveis do que os examinados neste trabalho.

Em outro trabalho (NASCIMENTO et al. 2005) realizado também no Estado do Maranhão, no município de São José de Ribamar, onde a prevalência da infecção foi estimada em crianças até 15 anos de idade, utilizou-se extrato purificado de *L. (L.) chagasi* para diagnóstico da infecção pela RIM, e antígeno bruto do parasito e proteína recombinante (rK39) para detecção por ELISA. Os achados obtidos revelaram taxa de prevalência da infecção pela RIM de 61.7%, a mais elevada de todos os trabalhos em discussão, assim como, por ELISA, 19.7% com

antígeno bruto e 19.4% com rK39, respectivamente, também as mais elevadas para a prevalência, o que sugere tratar-se de uma área com potencial de transmissão da infecção maior que em Jacobina, no Estado da Bahia, com prevalência da infecção pela RIM de 34.1%. De qualquer forma, deve ficar registrada a dificuldade de confrontar os resultados do presente trabalho com aqueles dos trabalhos citados (BADARÓ et al.1986; CALDAS et al. 2001, 2002; NASCIMENTO et al. 2005) não só pelas diferenças dos preparados antigênicos usados nos testes imunológicos, como também, pelas diferenças de idade das amostragens dos indivíduos envolvidos nos estudos. Portanto, as comparações apresentadas devem ser vistas com a devida consideração em virtude das diferenças metodológicas.

Na Europa, ao sul da Itália, na Sicília, região do Mediterrâneo, antigo foco de leishmaniose visceral, onde a doença tem como agente causal a *Leishmania (L.) infantum*. Demonstrou-se por intermédio da RIM, usando antígeno (promastigotas) homólogo do parasito, taxa de prevalência da infecção de 16.6% em indivíduos de todas as idades, constituindo um resultado mais próximo ao do presente estudo (prevalência pela RIM de 11.2%), e que pode estar refletindo alguma semelhança na dinâmica de transmissão entre *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (PAMPIGLIONE et al. 1975).

Na África, especialmente no Sudão, onde a leishmaniose visceral representa um grave problema de saúde pública, sendo responsabilizada pela morte de cerca de 100.000 indivíduos durante parte da década de 80 (ZILISTRA et al. 1994), a situação epidemiológica da infecção humana por *Leishmania (L.) donovani*, o agente causal da doença, parece, sem dúvida, bastante delicada, haja vista que, ainda recentemente, foi detectada taxa de prevalência da infecção pela RIM, com antígeno de promastigotas do mesmo parasito, variando de 33 a 56% na população total de duas localidades, Mushrau Koka e Um-Salala, respectivamente, o que sugere uma transmissão mais intensa da infecção nessa região da África (KHALIL et al. 2001), do que a existente na vila Santana do cafezal, município de Barcarena, estado do Pará na Amazônia brasileira.

O segundo tipo de análise epidemiológica foi baseado na combinação dos resultados entre a RIM e a RIFI, o que permitiu determinar a prevalência real da infecção, a qual representou a coordenada mais fidedigna da verdadeira situação epidemiológica da infecção na área estudada. Até o presente, parece que esse tipo de abordagem sobre a prevalência da infecção humana por *L. (L.) chagasi* constitui

uma observação inédita nas Américas. Assim sendo, com base nesse tipo de análise, foi encontrada uma prevalência real da infecção de 12.6% (120/946), o que representa, possivelmente, um achado único no Brasil. Dessa casuística, 55.8% dos casos pertenceram ao sexo masculino e 44.2% ao feminino, não havendo diferença significativa ($p > 0.05$) entre os grupos infectados, confirmando que o sexo não representa uma variável influente na distribuição da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi*. No tocante à prevalência da infecção por faixa de idade, foi interessante observar que os dois grupos de faixa menor, 1 a 10 e 11 a 20 anos, apresentaram taxas semelhantes ($p > 0.05$) da infecção, 19.2% e 25.8%, respectivamente, e ambas menores ($p < 0.05$) que a taxa de 55% encontrada no grupo de faixa maior (≥ 21 anos), sugerindo que a infecção vai sendo acumulada, progressivamente, com a idade. Esse achado, também foi observado na infecção humana por *L. (L.) infantum* na região da Sicília, ao sul da Itália (PAMPIGLIONE et al. 1975).

Com relação à especificidade da RIM e da RIFI no contexto da prevalência da infecção, foi demonstrado que, dos 106 casos positivos pela RIM, 55.6% dos indivíduos apresentavam um forte caráter imunológico de resistência à infecção (hipersensibilidade +++/++++), fato que, possivelmente, está expressando uma amostra significativa de indivíduos infectados que, ao longo do tempo, vem recebendo, naturalmente, estímulos antigênicos repetidos através da picada infectante do flebotômíneo vetor (*Lutzomyia longipalpis*) na área do estudo. Nesse sentido, é possível que essas “doses infectantes naturais” representem uma estratégia importante para ser considerada em um futuro programa de prevenção com uma vacina contra a infecção.

Por outro lado, dos 32 casos positivos pela RIFI, observou-se que apenas 25% apresentavam perfil de susceptibilidade à LVA (≥ 1280 IgG), enquanto 75% mostraram baixa reatividade sorológica (80-640 IgG), sugerindo que, na situação estudada, apenas uma minoria dos indivíduos com expressão de resposta imune CD4/Th2 era candidata a desenvolver a LVA, fato que só foi confirmado em 12.5% dos indivíduos soro-reagentes. Ainda nesse sentido, dentro do contexto da prevalência real da infecção (12.6%), cabe lembrar que a razão entre doença e infecção foi 1:30, enquanto em Jacobina, no Estado da Bahia, onde a prevalência da infecção pela RIM foi 34.1%, essa razão foi 1:18.5 (BADARÓ et al. 1986a,b), e em Raposa, no Estado do Maranhão, com prevalência da infecção também pela RIM de 18.6%, a razão foi 1:119 (CALDAS et al. 2001). Entretanto, faz-se necessário

lembrar, novamente, que nessas localidades as taxas de prevalência da infecção foram obtidas de crianças com até 15 anos de idade.

Além das avaliações relativas à prevalência da infecção, cabe enfatizar ainda que a combinação dos resultados da RIM e da RIFI, com a respectiva avaliação semi-quantitativa da escala de escores, junto com a avaliação clínica, foi capaz de identificar um largo espectro clínico e imunológico da infecção humana por *L. (L.) chagasi*, representado por 5 perfis clínico-imunológicos:

- 1) Infecção assintomática (IA) (RIM+/++++ e RIFI-),
- 2) Infecção sintomática (IS= LVA),
- 3) Infecção sub-clínica oligossintomática (ISO), com perfis imunes iguais (RIM- e RIFI+++ /++++),
- 4) Infecção sub-clínica resistente (ISR) (RIM+ /++ e RIFI+ /++), e,
- 5) Infecção inicial indeterminada (III) (RIM- e RIFI+ /++).

Estes perfis permitiram estabelecer um diagnóstico clínico da presente situação da infecção na área do estudo.

Desse modo, durante a intervenção da prevalência, esse tipo de abordagem permitiu identificar a seguinte ordem de freqüência das taxas desses perfis clínico-imunológicos:

1. O perfil IA foi o mais freqüente, com os 73.4% dos casos;
2. O perfil ISR foi o segundo mais freqüente, com os 15% dos casos;
3. O perfil III foi o terceiro mais freqüente, com os 5% dos casos;
4. O perfil IS (= LVA) foi o penúltimo nessa ordem, com os 3.3% dos casos;
5. O perfil ISO foi o último, com 3.3% dos casos na prevalência da infecção.

Este estudo mostrou, ainda, que a grande maioria (73.4%) dos indivíduos infectados residentes na área endêmica apresenta um perfil de resposta imune de resistência contra a infecção (RIM+ /++++ e RIFI-), confirmando a importância da resposta imune Th1 (hipersensibilidade) no controle da infecção. Como resultado, todos os indivíduos identificados nesse perfil eram assintomáticos.

O perfil novo ISR (Infecção sub-clínica resistente), que também apresentou um importante nível de resistência imunológica (RIM+ /++) contra a infecção, foi representado por significativa parcela (15%) de indivíduos infectados na área. Desse modo, se considerarmos os dois perfis juntos, IA e ISR, ambos representaram quase

90% (88.4%) de todos os indivíduos portadores da infecção na área endêmica.

Outro achado significativo deste estudo foi identificar os indivíduos infectados no perfil III (Infecção inicial indeterminada), já que os mesmos apresentavam o mais incipiente estágio da infecção, com uma aparente tendência em desenvolver, preferencialmente, a resposta humoral, porém sem uma definição ainda do seu perfil de resposta imunológica. Esta condição foi fundamental para considerá-la como uma infecção inicial indeterminada, com potencial para desenvolver-se tanto para os perfis de resistência imune, IA e ISR, como para os perfis de susceptibilidade imune, IS (= LVA) e ISO. Esta condição dúbia confere ao perfil III uma importância crucial em programas de controle da LVA humana, já que pode servir no monitoramento de indivíduos recém-infectados na área endêmica. Neste estudo foi observado, também, que a idade pode influenciar o desenvolvimento da infecção. A este respeito, a maioria dos autores tem mostrado um número maior de casos com infecção sub-clínica oligossintomática do que com LVA, em crianças com até 15 anos de idade (BADARÓ et al, 1986a, b) ou até 5 anos (GAMA et al, 2004). No presente trabalho, foram mostradas taxas de freqüência iguais de 3.3% para os perfis clínico-imunológicos IS (= LVA) e ISO, provavelmente, porque foram avaliados indivíduos de diferentes idades, sem prestigiar uma determinada faixa etária, sugerindo que nos trabalhos citados pode ter havido uma concentração de indivíduos susceptíveis na amostra examinada. De fato, a influência da idade no desenvolvimento da infecção foi demonstrada comparando-se a idade entre os dois perfis, já que a média de idade do perfil ISO (33.6 anos) foi maior ($p < 0.05$) que a do perfil IS (10.7 anos), sugerindo que indivíduos maiores de idade parecem desenvolver uma resposta imune Th1 mais eficiente contra a infecção e uma condição menor para desenvolver o perfil IS (= LVA).

Por último, em trabalho recente também do tipo transeccional realizado em outra localidade do nordeste do Estado do Pará, município de Cametá (ROSAS FILHO et al, 2007), que apresenta incidência de LVA maior que a do município de Barcarena (SESPA, 2004), foi possível confirmar a utilidade deste tipo de abordagem para avaliar a transmissão e o espectro clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) chagasi* na referida localidade. A prevalência da infecção de 18.4% foi maior ($p < 0.05$) que a encontrada em Santana do Cafezal (Barcarena) de 12.6%, e as taxas de freqüência dos perfis clínico-imunológicos ficaram estabelecidas na seguinte ordem: IA 47.5%, III 25.7%, ISR 22.3%, ISO 3.9% e IS (=

LVA) 0.5%. Estes resultados sugerem que em uma área com elevado nível de transmissão da infecção, onde as taxas de freqüência dos perfis III e ISR são também altos, deve existir uma grande concentração de casos recentes da infecção (25.7%), sendo superada somente pela freqüência dos casos estabelecidos no perfil de resistência imunológica IA (47.5%).

6. CONCLUSÃO

Este estudo representou a primeira experiência no sentido de propor o mais

largo espectro clínico-imunológico da infecção humana do *L. (L.) chagasi* no Novo Mundo, usando uma metodologia simples, barata e reproduzível. Conforme referido, essa abordagem permitiu a identificação de cinco perfis clínico-imunológicos, dois a mais, o ISR (Infecção sub-clínica resistente) e o III (Infecção inicial indeterminada), que os três, IA (Infecção assintomática), IS (Infecção sintomática= LVA ativa) e ISO (Infecção sub-clínica oligossintomática), previamente já reconhecidos por outros autores (BADARÓ et al. 1986b; JERÔNIMO et al. 2000; GAMA et al. 2004). O espectro proposto tem a vantagem de promover uma visibilidade melhor sobre as alternativas clínicas e imunológicas que tomam parte na interação entre a *L. (L.) chagasi* e a resposta imune do homem, além de representar uma ferramenta importante para ser usada em programas de controle da LVA. Além disso, a amplitude desse espectro com cinco perfis clínico-imunológicos pode estar refletindo, também, o polimorfismo genético associado aos mecanismos imunológicos responsáveis pela resistência contra a infecção humana por espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose visceral (PEACOCK et al. 2001, 2002; BLACKWELL et. al; 2004, JAMIESON et al. 2007).

Complementarmente esta dissertação poderá incentivar a realização de estudos com metodologia semelhante em outras localidades, proporcionando uma abordagem que possibilite avaliar a real dimensão da infecção pela *L. (L.) chagasi* nas populações residentes em áreas endêmicas de leishmaniose visceral americana, sobretudo na Amazônia Brasileira.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, JE. Kala-zar in Brazil. **Sci Rep Inst Sup Sanitá.** 1962; 2: p. 116-123.

AWASATHI, A; MATHUR, RK; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res.** 2004; 119: p. 238-258.

COSTA, O. Calazar no município de Cachoeira do Arari, estado do Pará. **Rev Serv Esp Saúde Pública.** Rio de Janeiro, 1966; 12: p. 91-98.

BADARÓ, R et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis.** 1986a; 154: p. 639-649.

_____. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.** 1986b; 154: p. 1003-1012.

BLACKWEEL, JM, MOHAMED, HS, IBRAHIM, ME. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. **Trends in Parasitol.** 2004; 6: p. 268-274.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 6. ed. Brasília: MS, 2005. 816p.

BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Contagem nacional de populações. **Superintendência de Estudos Geográficos e Sócio-econômicos.** Rio de Janeiro, RJ, 2004.

CALDAS, AJM et al. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na ilha de São Luis-MA, Brasil. **Rev Soc Brás Méd Trop** 2001; 34: p. 445-451.

_____. Risk factors associated with infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg.** 2002; 96: p. 21-28.

CHAGAS, E, et al. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1938; 33: p. 89-229.

CUNHA, AM, CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. **Nota prévia. Hospital (Rio de Janeiro).** 1937; 11: p. 3-9.

DE JESUS, RCS et al. Comparação das técnicas de RIFI (ag. IEC x ag. Bio-Manguinhos) e ELISA no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), Estado do Pará, Brasil. **Rev Soc Brás Méd Trop.** 2003; 36 (Sup I): 311.

FRANKE CR, Ziller M, STAUBACH C, LATIF M. Impact of El Niño/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2002;vol8:n. 9: p. 914-917.

GAMA, MEA et al. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2004; 99: p. 889-893.

HOLADAY, BJ et al. Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. **J Inf Dis.** 1993; 167: p. 411-417.

JAMIESON, SE et al, Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. **Genes Immun;** 2007; 8: p. 84-90.

JERÔNIMO, SMB et al. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: Long-term follow-up. **Clin Infec Dis.**2000; 30: p. 608-609.

KHALIL, EA et al. Epidemiology and clinical manifestations of *Leishmania donovani* infection in two villages in an endemic area in easter Sudan. **Trop Med Int Health.** 2001; 7: p. 35-44.

LAINSON, R et al. Presente situação da leishmaniose visceral na Amazônia, com especial referência a um novo surto da doença ocorrido em Santarém, Estado do Pará, Brasil. **Boletim Epidemiológico, Fundação SESP.** Rio de Janeiro, 1984; vol. 1: p. 1-8.

LAINSON R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 1988; 321: p. 389-404.

_____. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In M Service, **Demographic and Vector Borne Disease**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989; p. 85-106.

LAINSON, R; RANGEL, EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2005; 100: p. 811-27.

LAINSON, R; SHAW. JJ. Leishmaniasis in the New World. In L Collier, A Balows, M Sussman (eds. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 10th ed., Vol 5, *Parasitology*, Arnold, London, 2005; p. 313-349.

LIMA, LVR et al. Comparação da reatividade entre antígenos de *Leishmania (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* no sorodiagnóstico (RIFI) da leishmaniose visceral humana no estado do Pará. **Rev Soc Brás Méd Trop**. 2003; 36 (Sup I): 312.

LINDOSO JA, COTRIM PC & GOTO H, 2004. Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. **Int J Parasitol**. 2004 Jan;34(1):p.1-4.

NASCIMENTO, MDSB et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 2005; 21: p. 1801-1807.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD(OPS), Washington. BAS (ed). **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre**. 15 ed. Washington: OPS, 1992, 618 p., p. 577-592.

PAMPIGLIONE, S et al. Studies in Mediterranean leishmaniasis: 3. The leishmanin in skin test kala-azar. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**. 1975; 69: p.60-68.

PARÁ. SECRETARIA EXECUTIVA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ (SESPA). Leishmanioses visceral e tegumentar americana. **Boletim Epidemiológico, Departamento de Controle de Endemias**, Belém, 2004; p. 6-8.

PEACOCK, CS et al. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. **Genet Epidemiol**. 2001; 20: p. 383-396.

_____. Genetic analysis of multicase families of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: no major role for class II or class III regions of HLA. **Genes Immun**. 2002; 3: p. 350-358.

PENNA, HA. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brás Méd**, 1934; 48: 949-950.

ROUQUAYROL, MZ & ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & Saúde**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 570 p.

ROSAS FILHO, MS et al. Caracterização das manifestações clínicas dos perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no Pará, Brasil. **Rev Soc Brás Méd Trop.** 2007; 40 (Sup 1): 115.

SILVEIRA, FT et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1991; 85: p.735-738.

_____.Leishmaniose visceral americana. In: LEÃO Raimundo Nonato Queiroz. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**, Belém, PA, CEJUP, 1997; p. 631-644.

_____.T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. **Parasite Immunol.** 1998; 20: p. 19-26.

ZILISTRA, EE et al. Endemic kala-azar in eastern Sudan: A longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** 1994; 51: p. 826-836.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Projeto de pesquisa: “**INFECÇÃO HUMANA POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL: UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E IMUNOLÓGICA**”.

FICHA PROTOCOLO

FICHA Nº _____

DATA ___ / ___ / ___

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Apelido: _____

Sexo: _____ Idade: _____ Nascimento: _____ / _____ / _____

Naturalidade: _____

Ocupação: _____

Endereço

Atual: _____

Em Caso de Crianças:

Pai: _____ Apelido: _____

Mãe: _____ Apelido: _____

DADOS CLÍNICOS

Febre: _____ Caso sim, caracterizar: _____

Diarréia: _____ Caso sim, caracterizar: _____

Tosse: _____ Caso sim, caracterizar: _____

Adinamia: _____ Caso sim, há quanto tempo? _____

Perda de peso: _____ Caso sim, há quanto tempo? _____

Outros sintomas: _____

Doenças associadas: _____

Mucosas: Normocoradas () Hipocoradas () Quantificar (De + a +++) : _____

Palidez cutânea: Sim () Não () Quantificar ((De + a +++)): _____

Hepatomegalia: Sim () Não () Quantificar (De + a +++) : _____

Esplenomegalia: Sim () Não () Quantificar (De + a +++) : _____

Especificar outros sinais: _____

RESULTADO DE EXAMES

Imunofluorescência indireta: _____

Intradermorreação de Montenegro: _____

Responsável pelo preenchimento_____
Investigador

APÊNDICE B

:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Baseado na Resolução Nº 196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde)

Pelo presente **Termo de Consentimento**, declaro que fui informado(a) de forma clara, detalhada e por escrito, da justificativa, dos objetivos, e dos procedimentos da pesquisa intitulada “**INFECÇÃO HUMANA POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL: UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E IMUNOLÓGICA**”. Tendo como investigador o médico Mário de Souza Rosas Filho, com o patrocínio da Universidade Federal do Pará (UFPA) e do Instituto Evandro Chagas (IEC).

Fui informado (a) ainda:

I. Que a participação neste estudo é voluntária, assim como a sua recusa e, que não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios caso resolva sair da pesquisa durante sua realização;

II. Que, havendo concordância para a participação no estudo, me comprometo a realizar as seguintes atividades:

1. Responder um questionário e ser examinado clinicamente pelo pesquisador e por acadêmicos de medicina da Universidade Federal do Pará (UFPA) devidamente supervisionados pelo primeiro.

2. Realizar uma coleta de sangue, usando-se material descartável, objetivando a realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e da Intradermoreação de Montenegro (IRM) exames recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico do Calazar, cujo resultado será entregue pelo pesquisador em meu domicílio;

III. Da segurança de que não serei identificado (a) e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade e a proteção da minha imagem;

Nestes termos e considerando-me livre e esclarecido (a), consinto em participar da pesquisa proposta, resguardando ao autor do projeto a propriedade intelectual

das informações geradas e expressando a concordância com a divulgação pública dos resultados.

Data:/...../.....

Nome completo do participante

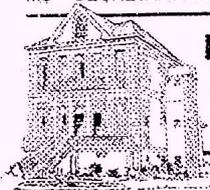
Idade

sexo

Assinatura do participante ou responsável

ANEXO

MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

**INSTITUTO
EVANDRO
CHAGAS**

Belém, 18 de março de 2004.

Protocolo CEP/IEC - Nº 16/2003

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Protocolo: “Estudo da influencia da densidade populacional do vetor *Lutzomyia longipalpis* sobre a infecção humana e canina por *Leishmania (L) Chagasi*”.

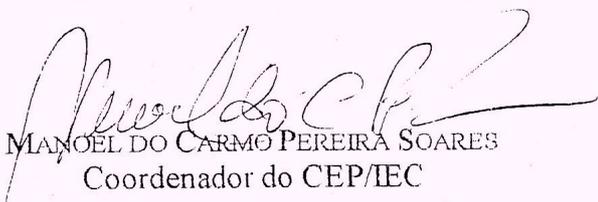
Pesquisador Responsável: ELZA ALVES PEREIRA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, em reunião ordinária realizada no dia 17/03/2004, cientificamos que o referido projeto foi considerado **APROVADO**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.



MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

