



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

JULIANA LIMA SILVA MORAES

**PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE FAMILIARES DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

**ARACAJU
2013**

JULIANA LIMA SILVA MORAES

**PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE FAMILIARES
DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

**ARACAJU
2013**

Lc **MORAES, Juliana Lima Silva.**

Perfil clínico, epidemiológico e imunológico de familiares de pacientes com leishmaniose visceral / Juliana Lima Silva, 2013.

f.: il.

Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde.

Universidade Federal de Sergipe - Aracaju - Brasil, 2013.

1. Leishmaniose visceral 2. Epidemiologia 3. Diagnóstico. 43. Assintomático..

CDU

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo carinho e amor constantes e pela educação que me proporcionaram; ao meu esposo pelo apoio, incentivo e paciência e a minha filha Melissa, pela imensa alegria e aprendizado que me proporciona diariamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as minhas conquistas.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio, incentivo e amor constantes.

Ao meu esposo por estar junto comigo nessa caminhada, motivando-me a seguir em frente nos momentos em que pensei em desistir.

A minha filha Melissa que torna meus dias mais felizes com seu sorriso, sua energia, suas descobertas.

Ao meu orientador Dr. Roque Pacheco de Almeida, idealizador desse trabalho, pela confiança, paciência e conhecimento transmitidos.

A minha companheira de pesquisa Danielle Sacramento, por estar sempre à disposição, ajudando no que fosse preciso. Agradeço a compreensão, pois em alguns momentos ficou praticamente sozinha na coleta de dados, quando da minha ausência por problemas na gestação.

A minha amiga Glauciene, pela grande ajuda na coleta de dados, além do apoio moral em todos os momentos.

A minha colega de trabalho e amiga Christina Guimarães, por percorrermos juntas esse difícil caminho, trocando ideias, palavras de incentivo e aflições.

Às professoras Dra. Ângela Maria da Silva, Dra. Maria Pontes de Aguiar Campos e Dra. Tatiana Rodrigues de Moura pelas valiosas sugestões para a melhoria deste trabalho.

A toda minha equipe da Enfermaria de Pediatria do HU, por compreender e aturar meus momentos de estresse.

Às colegas Regina e Suzy que, enquanto coordenadoras de Enfermagem do HU, fizeram o possível para viabilizar a realização do Mestrado.

Aos médicos da pediatria, especialmente Dra. Roseane pela amizade e apoio; Dr. Marco Valadares pelas sugestões; Dr. Enaldo pela contribuição na parte estatística; Dra Sônia por compartilhar ideias e informações importantes para esse trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, especialmente a Priscila, Cecília e Márcio por se mostrarem sempre dispostos a ajudar.

A todo o pessoal do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário, especialmente a Cândida, Flávia, Pâmela e Fábio pelo apoio.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu conseguisse chegar até o fim.

RESUMO

Perfil clínico e imunológico de familiares de pacientes com leishmaniose visceral. Juliana Lima Silva Moraes. Aracaju. 2013.

A leishmaniose visceral é uma doença que possui amplo espectro clínico, variando desde infecção clássica a formas subclínica e assintomática. Através de um estudo transversal feito com familiares de pacientes com leishmaniose visceral, determinamos a frequência de infecção assintomática por *Leishmania infantum chagasi*, utilizando Intradermorreação de Montenegro e/ou sorologia por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Questionário contendo dados sócio-demográficos, presença de sinais e sintomas, exame físico de 109 indivíduos foram analisados. Fatores ambientais como presença de cachorro, galinheiro e restos de madeira no domicílio também foram investigados. Níveis do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), Fator de Transformação do Crescimento (TGF- β) e as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 foram dosados em 59 destes indivíduos. A frequência de positivos foi detectada em 51,8% dos participantes, sendo maior no sexo masculino (61,9%). Testes com resultado positivo também foram mais frequentes em pessoas acima de 14 anos (79,7%). Todos os indivíduos positivos foram considerados assintomáticos e não retornaram ao serviço de saúde com queixas até o final da pesquisa, sugerindo que não evoluíram para outras formas clínicas. Não houve diferença entre o local de moradia: capital ou interior do Estado, porém mais casos positivos ocorreram na capital, confirmado a crescente urbanização da doença. Dentre os fatores ambientais ocorreu significância estatística quando analisamos presença de cachorro juntamente com restos de madeira ($p < 0,05$). TGF- β mostrou diferença significativa em favor dos negativos ($p = 0,002$), enquanto IL-10 e IL-12 foram maiores nos indivíduos com testes positivos ($p = 0,024$ e $0,038$). Diante dos achados, verificamos que medidas de controle da disseminação da leishmania devem ser efetivadas e direcionadas à população do nosso Estado, uma vez que a exposição ao parasita ainda é muito alta, colocando-a em risco de desenvolver a doença.

Palavras-chave: Assintomático. Diagnóstico. Epidemiologia. Leishmaniose visceral.

ABSTRACT

Clinical and immunological profile of family members of visceral leishmaniasis patients. Juliana Lima Silva Moraes. Aracaju. 2013.

Visceral leishmaniasis is endemic in many Brazilian states, including Sergipe. Through a cross-sectional study done with relatives of patients with visceral leishmaniasis, we determined the frequency of asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* using Montenegro skin test and/or *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Questionnaire containing socio-demographic data, presence of signs and symptoms, physical examination of 109 subjects were analyzed. Environmental factors such as the presence of dog, chicken and wood in the residence were also investigated. Finally, the levels of cytokines Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , Transforming Growth Factor (TGF)- β and Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 were measured in 59 of these individuals. The frequency of positivity was detected in 51.8% of participants, being higher in males (61.9%). Positive testes were also more common in people over 14 years (79.7%). All positive individuals were considered asymptomatic and did not return to the hospital with complaints until the end of the study, suggesting that did not progress to other clinical forms. There was no difference between the origin: capital or the state, but more positive cases occurred at the capital, confirming the growing urbanization of the disease. Environmental factors was statistically significant when analyzed presence of dog and waste wood together ($p < 0.05$). TGF- β showed a significant difference in favor of the negative individuals ($p = 0.002$), while IL-10 and IL-12 were higher in people with positive tests ($p = 0.024$ and 0.038). Control measures should be aimed to the population of our state, who is highly exposed to the parasite.

Key Words: visceral leishmaniasis, epidemiology, diagnostic, asymptomatic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMSP – Células Mononucleares do sangue periférico
ELISA – Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HIV – Virus da Imunodeficiência Adquirida
IDRM – Intradermorreação de Montenegro
IFI – Imunofluorescência Indireta
IFN – Interferon
IG – Imunoglobulina
IL – Interleucina
IP-10 – Proteína10 induzida por INF- γ
LPS – Lipopolissacarídeo
LVH – Leishmaniose Visceral Humana
LV – Leishmaniose visceral
MIG – Monoquina induzida por INF- γ
NK – Natural Killer
NO – Óxido Nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCR – Polymerase Chain Reaction
SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear
SRE – Sistema Retículo-Endotelial
TCD4+ - Células T apresentando a molécula CD4 na membrana celular
TCD8+ - Células T apresentando a molécula CD8 na membrana celular
TCLE – Termo de Consentimento Livre e esclarecido
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TGF – Fator de Transformação de Crescimento
TH-1 – T helper tipo 1
TH-2 – T helper tipo 2
TLR – Receptor toll-like
TNF – Fator de Necrose Tumoral
VS - Versus

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência de positividade para IDRМ, sorologia por ELISA ou ambos, dos familiares de pacientes com Leishmaniose visceral.....	39
Tabela 2 – Dados demográficos dos familiares dos pacientes com Leishmaniose visceral, segundo positividade à IDRМ e/ou ELISA.....	39
Tabela 3 – Distribuição dos casos-índices e familiares, segundo a faixa etária.....	40
Tabela 4 – Distribuição dos pacientes e positividade dos familiares segundo os bairros da capital Aracaju.....	43
Tabela 5 – Distribuição dos pacientes e positividade dos familiares de acordo com os municípios do interior.....	44
Tabela 6 – Frequência de positividade da amostra para os testes aplicados, de acordo com a presença de fatores de riscos ambientais.....	46
Tabela 7 – Distribuição dos níveis de citocinas nos familiares positivos e negativos aos testes aplicados.....	47
Tabela 8 – Resumo das correlações IL-12/TGF- β e IL-12/IL-10, em relação ao resultado do <i>ELISA</i>	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de positivos pelo IDRМ e/ou Sorologia de acordo com o sexo.....	42
Gráfico 2 - Distribuição de pacientes e familiares segundo a procedência....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico da Leishmaniose visceral.....	17
Figura 2 – Hepatoesplenomegalia na Leishmaniose visceral.....	21
Figura 3 – Razão entre as citocinas	48
Figura 4 – Correlação entre citocinas e <i>ELISA</i>	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Epidemiologia.....	14
2.2 Ciclo Biológico.....	15
2.3 Influência do ambiente	18
2.4 Aspectos clínicos.....	19
2.5 Imunofisiopatogenia	23
2.6 Diagnóstico.....	25
2.7 Tratamento	28
2.8 Medidas de Controle	29
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Geral.....	32
4.2 Específicos	32
5 MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 Delineamento do estudo.....	33
5.2 Amostragem	33
5.3 Seleção de pacientes	33
5.3.1 Definição dos casos confirmados (casos-índices).....	33
5.3.2 Definição dos casos assintomáticos.....	34
5.3.3 Critérios de inclusão	34
5.3.4 Critérios de exclusão	34
5.4 Logística	34
5.5 Variáveis pesquisadas.....	35
5.5.1 Sócio-demográficas.....	35
5.5.2 Sinais e sintomas	36
5.5.3 Fatores ambientais	36
5.5.4 Testes diagnósticos.....	36
5.5.5 Variável de desfecho	36
5.6 Dosagem de citocinas	36
5.7 Análise estatística	37

5.8 Aspectos éticos	37
6 RESULTADOS	38
6.1 Caracterização da amostra	38
6.2 Positividade para os testes diagnósticos utilizados: intradermorreação de Montenegro (IRDM) e sorologia por ELISA	38
6.3 Caracterização da amostra, de acordo com os resultados dos testes: IRDM e sorologia por ELISA	39
6.3.1 Positividade em relação à faixa etária	39
6.3.2 Positividade em relação ao sexo	40
6.3.3 Positividade em relação à procedência	41
6.4 Presença de sinais/sintomas	44
6.5 Fatores ambientais	45
6.6 Níveis séricos das citocinas	46
7 DISCUSSÃO	50
8 CONCLUSÕES	57
9 PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
APÊNDICE B – Formulário de consentimento para menores	69
APÊNDICE C - Questionário	70

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa que compreende uma das sete endemias mundiais com uma variada distribuição, atingindo 62 países com, aproximadamente, 200 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção. Há uma estimativa de 500 mil novos casos e mais de 50 mil óbitos a cada ano (WHO, 2010).

Embora esta distribuição seja ampla, sabe-se que, aproximadamente 90% dos casos ocorrem em 6 países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (WHO, 2010).

Suas formas clínicas podem variar desde infecções assintomáticas a infecções subclínicas ou oligossintomáticas e infecções clássicas (WHO, 2010).

Dados epidemiológicos em conjunto com achados clínicos e exames laboratoriais devem direcionar para a suspeita de leishmaniose visceral, sendo que o diagnóstico conclusivo só pode ser determinado com o achado do parasita em amostras colhidas do paciente (PASTORINO et al., 2002).

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) ou teste de Montenegro é um marcador de hipersensibilidade tardia utilizado em levantamentos epidemiológicos para detecção da *Leishmania*. Possui sensibilidade entre 86 e 100% e especificidade de aproximadamente 100%. O resultado positivo em áreas endêmicas pode indicar formas subclínicas ou assintomáticas (JOSÉ et al., 2001).

Estudos realizados por Badaró et al. (1986a) mostram que apenas 20% dos sujeitos infectados pela *Leishmania chagasi* desenvolverão a forma clássica. A maioria dos indivíduos adquire uma infecção subclínica ou permanecem completamente assintomáticos evoluindo para cura espontânea, dentro de um ou dois anos.

Pesquisas com os portadores de infecção assintomática tem aumentado sua importância nos últimos anos, pois eles significam potenciais reservatórios, podendo transmitir o parasita através da transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas contaminadas, transmissão congênita ou até mesmo, transmissão para vetores sadios (SILVA et al., 2013).

O presente trabalho tem como objetivos identificar a frequência de indivíduos portadores de infecção assintomática por leishmaniose visceral, em

familiares de pacientes diagnosticados com a doença, bem como buscar fatores clínico-epidemiológicos e ambientais associados à positividade dos testes utilizados para a detecção desses assintomáticos. Dessa forma, poderá servir como embasamento teórico para futura adequação de políticas preventivas, para melhoria no diagnóstico precoce e para busca de meios de combate a essa doença em franca expansão, como novos tratamentos e vacinas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Desde o início dos anos 80, a leishmaniose visceral no Brasil vem apresentando mudanças no seu perfil de ocorrência e incidência. Antes tida como uma doença típica das zonas rurais e silvestres, e de relativamente baixa incidência, sofreu um amplo processo de urbanização, com crescente expansão para cidades de médio e grande porte (MACHADO DE ASSIS; RABELLO; WERNECK, 2012; WHO, 2010). Cidades da região Norte (Boa Vista e Santarém), Sudeste (Belo Horizonte e Montes Claros), Centro-Oeste (Cuiabá e Campo Grande) e Nordeste (São Luís, Natal e Aracaju), têm sido foco da LV (GONTIJO; MELO, 2004).

É uma doença de notificação compulsória e de acordo com dados do Ministério da saúde, é mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular agravada pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV, devido às formas oligossintomáticas e assintomáticas, além das formas com expressão clínica (GONTIJO; MELO, 2004).

No Brasil, a doença está distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões (BRASIL, 2010a). Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos eram provenientes da região nordeste, porém à medida que a doença se expandiu para as outras regiões, esta situação se modificou e, no período de 2000 a 2002, a região Nordeste já apresentava uma redução para 77% dos casos humanos do país (BRASIL, 2003). Desta forma, a partir dos anos 90, os estados de Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste), Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil (GONTIJO; MELO, 2004). Atualmente, a região nordeste é responsável por 48% dos casos (BRASIL, 2010a).

Segundo dados do Ministério da Saúde, no ano de 2009 foram registrados 3.693 casos de leishmaniose visceral no Brasil, sendo 47,5% (1.754) na região Nordeste, 19,2% (709) no Norte do País, 17,4% (641) no Sudeste, 7,4% (274) no Centro-Oeste e 0,2% (8) no Sul. O número de óbitos por LV notificados neste mesmo ano foi de 216, em todo o País.

Em 2010, foram confirmados 1.662 casos somente na região Nordeste. O Ceará liderou com 485 casos, seguido do Maranhão e da Bahia, com cerca de 360. A Paraíba com 23 casos foi o estado de menor incidência (BRASIL, 2011).

Dividido em 75 municípios, ocupando uma área de 22.050 km² e com uma população superior a dois milhões de habitantes, o estado de Sergipe corresponde a 2,8% do território do Nordeste do Brasil e, como representante desta região, a situação assemelha-se aos outros estados nordestinos. Desde 1934, casos da LV tem sido registrados (CHAGAS, 1936). Em 2009 foram registrados 39 casos de leishmaniose visceral no estado de Sergipe, com um coeficiente de incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes. A letalidade foi de 7,7% e o percentual de cura clínica de 84,6%. Tiveram diagnóstico laboratorial, 87,2% dos casos. Foram confirmados casos em 17,3% dos municípios do estado, sendo que Aracaju correspondeu a 41% do total, com a maioria dos casos na zona de expansão da capital (BRASIL, 2011).

Em 2010, foram registrados 75 casos, situando Sergipe em quinto lugar da região Nordeste, ficando atrás somente do Ceará, Maranhão, Bahia e Piauí (BRASIL, 2011).

Goes, Melo e Jeraldo (2012) observaram um comportamento epidemiológico cíclico da LV no estado, com aumento do número de casos a cada cinco anos, fato também detectado em outros estados (ALVES, 2009). Observou-se ainda que 81,6% dos 38 bairros de Aracaju apresentavam pelo menos um caso de LV humana, com uma média anual de 19,2 casos, classificando esta capital como zona de transmissão intensa (GOES, MELO e JERALDO, 2012).

2.2 CICLO BIOLÓGICO

A leishmaniose visceral é uma enfermidade causada por protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. As espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo Donovanii estão divididas

mundialmente em três gêneros: *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum*. A *L. infantum* e a *L. donovani* são os agentes causadores da doença nas áreas do Mar Mediterrâneo e do Oriente Médio e a *L. chagasi* é responsável pela forma clínica da leishmaniose visceral nas Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil (BRUSTOLINI, 2006).

Desde 1999, muitos autores tem considerado a *L. chagasi* e a *L. infantum* como sendo a mesma espécie e utilizam portanto, o nome *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (ASSIS, 2012).

O ciclo da *Leishmania* envolve o hospedeiro vertebrado e o vetor flebotomíneo (FIGURA 1). Nos hospedeiros mamíferos, a *Leishmania* é obrigatoriamente um parasita intracelular e existe na forma amastigota no interior de células do sistema mononuclear-fagocitário (COSTA, 2005).

Os parasitas são transmitidos pela picada das fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos, que são insetos que medem de 2 a 3 mm e possuem hábitos vespertinos e noturnos (WALTERS et al., 1989).

As fêmeas fecundadas se infectam durante o repasto sanguíneo necessário para a alimentação dos ovos, ao sugarem o hospedeiro vertebrado. Neste repasto são ingeridas as formas amastigotas do parasita, que se transformam em promastigotas e iniciam sua multiplicação, migração e amadurecimento. Estes processos duram sete dias, após os quais os parasitas infectantes ficam na região mais anterior da via digestiva do flebótomo, de onde são regurgitados no próximo repasto (WALTERS et al., 1989).

As fêmeas adultas vivem cerca de 20 dias e a postura realiza-se em 8 dias após o repasto sanguíneo. Os ovos são depositados em fendas, pedras, raízes tabulares e sobre substrato orgânico com pouca umidade, onde ficam aderidos devido à substância viscosa que acompanha a desova (WALTERS et al., 1989).

Estes vetores pertencem a várias espécies do gênero *Lutzomyia*, dentre as quais destacam-se a *L. longipalpis* e a *L. cruzi*. No Brasil, o principal vetor é o *Lutzomyia longipalpis* que, através de um novo repasto sanguíneo inocula junto à saliva as formas promastigotas metacíclicas infectantes em um novo hospedeiro. Na epiderme do hospedeiro estas formas são fagocitadas pelos macrófagos e no interior do vacúolo transformam-se em amastigotas e multiplicam-se até rompê-los.

As amastigotas são fagocitadas por novos macrófagos e ocorre a disseminação hematogênica (WALTERS et al., 1989).

Foi realizado um estudo em Aracaju para avaliar a fauna flebotomínea, sendo encontrada a *Lutzomyia longipalpis* como espécie mais abundante (90,4%); além disso, encontrou-se um grande número destes flebotomíneos dentro das casas, confirmando o comportamento endofílico dessa espécie e a possibilidade de transmissão intradomiciliar da LV (GOES; MELO; JERALDO, 2012).

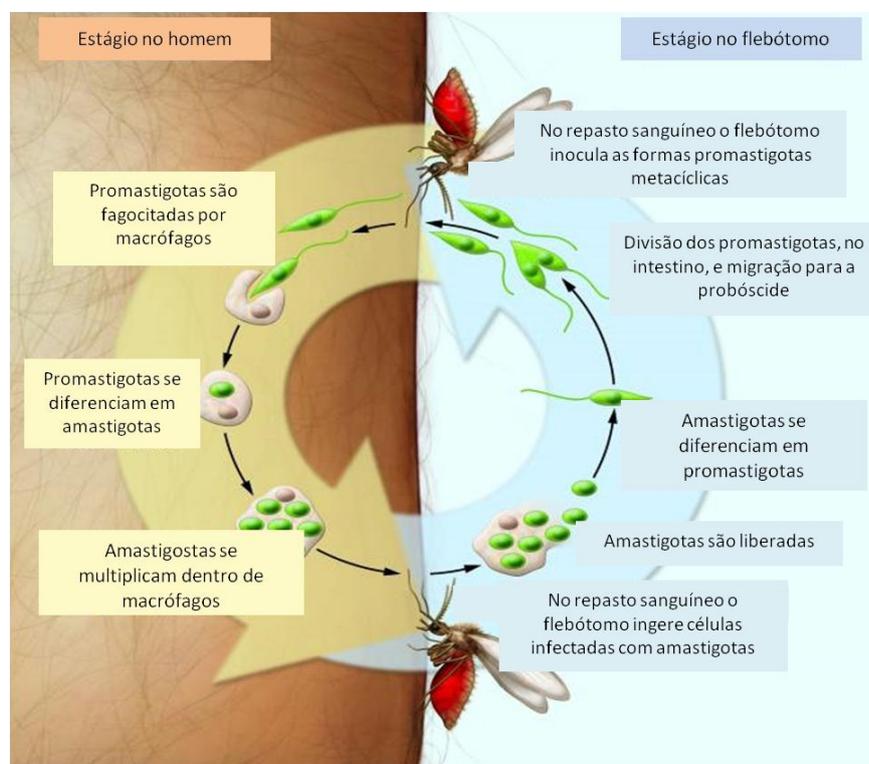


Figura 1 - Ciclo biológico da leishmaniose Visceral.

Fonte: Stuart et al. (2008)

Após a transmissão da *Leishmania* pelo mosquito para o homem ou o cão, o período de incubação, ou seja, da entrada do parasita no organismo até o surgimento dos primeiros sinais e sintomas da doença, é bastante variável. No homem varia de 10 dias a 24 meses; em média, de 2 a 6 meses, e, no cão, varia de 3 meses a vários anos, com média de 3 a 7 meses (GONTIJO; MELO, 2004; WHO, 2010).

No ambiente domiciliar, o cão doméstico, cujo intenso parasitismo cutâneo permite uma fácil infecção do vetor, é o reservatório mais importante. Já no ambiente silvestre, tem-se constatado que dois são os seus hospedeiros: raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRUSTOLONI, 2006).

Além da picada do mosquito, outros modos de transmissão incluem a transplacentária, doação de órgãos e transfusão sanguínea (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 2005).

A transmissão da LV através de transfusão sanguínea, embora possível do ponto de vista teórico, ainda não possui comprovação científica consistente (URIAS et al., 2009), embora haja relatos de casos em alguns países, inclusive na Índia (SINGH, 2006). Estudos recentes estão sendo realizados no intuito de avaliar a possibilidade deste tipo de transmissão da LV no Brasil.

2.3 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE

A urbanização da doença se deve à rápida migração dos moradores da zona rural para as cidades, aliada ao modo como a população se organiza em grandes aglomerações, com moradias sem saneamento adequado, conduzindo ao que tem sido referido por alguns autores como "ruralização das condições de vida" (GOES; MELO; JERALDO, 2012). Este alto contingente, bem como as alterações ambientais, feitas pelo próprio homem facilitam tanto a emergência como a reemergência de diversas doenças, entre elas a leishmaniose visceral (GONTIJO; MELO, 2004).

Além da urbanização, outras razões da expansão da leishmaniose visceral nos últimos anos podem ser destacadas: o desmatamento desordenado, que culmina com a invasão pelo mosquito flebotomíneo *Lutzomyia Longipalpis* ao ambiente peri-domiciliar; a presença de grande população do cão doméstico nas áreas endêmicas, susceptível à infecção pela *Leishmania chagasi*, contribuindo para a manutenção do ciclo; a migração de populações não imunizadas de outras regiões (MAIA-ELKHOURY, 2008; ROSAS-FILHO; SILVEIRA, 2007).

O tratamento de cães infectados não é permitido e as vacinas comercializadas ainda estão em fase de estudo, fazendo com que a medida de controle indicada seja o sacrifício do animal positivo, o que gera conflitos entre os proprietários, órgãos de saúde pública e veterinários.

Materiais como pilhas de tijolos, pedras, madeira e lixo, assim como a localização de galinheiros próximos ao domicílio também foram descritos como potenciais para criação e repouso do mosquito, aumentando seu contato com o cão e o homem, que ficam mais susceptíveis à infecção pelo parasita (MORENO et al., 2005; WHO, 2010).

De acordo com dados do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), recolhidos entre 2007 e 2011, o mosquito transmissor da leishmaniose está presente em 85% dos bairros de Aracaju.

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS

A leishmaniose visceral se caracteriza pelo comprometimento do sistema retículo-endotelial (SRE), onde os parasitos permanecem, multiplicam-se e disseminam-se. Reagindo ao parasitismo, o SRE exibe hipertrofia e hiperplasia. Os sinais e sintomas da doença plenamente manifesta são mais pronunciados naqueles órgãos cujo SRE é proeminente, como fígado, baço e medula óssea. Na medula, causa destruição traduzida por hipoplasia medular e consequente pancitopenia periférica. Assim, a neutropenia, a anemia e a plaquetopenia são decorrente não só de redução da reserva medular, mas também de sequestro esplênico ou de reações de auto-imunidade. No baço, é observada esplenomegalia exuberante devido à congestão dos sinusóides e hiperplasia do SRE, principalmente às custas de macrófagos e plasmócitos. No fígado, apesar da hepatomegalia com hipertrofia e hiperplasia difusa das células de Kupffer, há manutenção da consistência e das características regulares das bordas, sendo a superfície externa lisa (BACELAR; CARVALHO, 2005).

Essa protozoose apresenta um espectro clínico que pode variar desde manifestações clínicas discretas até as graves que, se não tratadas, podem levar ao óbito. Classicamente, pode-se reconhecer uma forma assintomática (apenas

infecção), uma subclínica (também denominada oligossintomática), uma forma aguda e outra chamada clássica (WHO, 2010).

Nas formas assintomáticas, não há evidência de manifestações clínicas e acometem, normalmente, pacientes vindos de áreas endêmicas da doença. O diagnóstico dá-se apenas pela avaliação laboratorial com sorologia ou intradermorreação de Montenegro positivas (D'OLIVEIRA et al., 1997).

A literatura não explica com exatidão porque alguns casos evoluem com sintomas clássicos e outros não. Tem-se tentado detectar alguns fatores que podem determinar esta suscetibilidade como, por exemplo, deficiência de vitamina A, idade e infecção associada com o vírus da AIDS (D'OLIVEIRA et al., 1997).

O que se tem como bem determinado é que a forma assintomática é a mais comum dentre todas e está, normalmente, associada com a presença de casos de leishmaniose visceral na família ou vizinhos, o que pode sugerir a exposição aos mesmos fatores de risco, principalmente quando comparados entre membros de uma mesma família. Cerca de 20% destes indivíduos podem apresentar manifestações clínicas, desenvolvendo a chamada forma aguda e os demais podem permanecer assintomáticos ou evoluir para a forma oligossintomática da doença (D'OLIVEIRA et al., 1997).

A forma oligossintomática acomete, geralmente, crianças de áreas endêmicas. O quadro clínico é discreto com manifestação de febre, pequena hepatomegalia, hiperglobulinemia e aumento do VHS. A forma subclínica não está associada à esplenomegalia ou leucopenias importantes. Na verdade, quando ocorrem estas alterações, costuma-se dizer que houve uma manifestação específica da doença clinicamente detectável. Tem-se demonstrado, também, que a maioria dos casos subclínicos evolui para a cura espontânea ao invés da doença clínica (KAFETZIS, 2003; TAVARES, 1999).

Na sua forma considerada clássica, o quadro inicial normalmente apresenta-se com febre que pode ser insidiosa ou abrupta, contínua ou intermitente e baixa ou elevada. É o sintoma mais presente nesta fase da doença e, geralmente, o diagnóstico é difícil porque a elevação da temperatura faz parte da abertura do quadro de uma série de outras doenças infecto-parasitárias. Associados podem estar anorexia, astenia e perda de peso (BRASIL, 2010a; KAFETZIS, 2003). Após este período, pode sobrevir o que se denomina período de estado caracterizado por febre irregular, associada ao emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e

aumento da hepatoesplenomegalia. Apresenta quadro clínico arrastado, geralmente com mais de 2 meses de evolução e, muitas vezes, comprometimento do estado geral (BRASIL, 2010a).

Em crianças da faixa etária de um a quatro anos de vida, esse período de estado é determinado pela presença de febre, anemia, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, além de linfadenomegalia, perda de peso, taquicardia e, menos frequentemente, tosse seca e diarreia. Os sinais e sintomas de desnutrição se desenvolvem com a progressão da doença, incluindo edema periférico, queda de cabelos e alterações de pele e das unhas (PASTORINO et al., 2002).

Importante ressaltar que a esplenomegalia é a manifestação clínica mais importante depois da febre com quadros clássicos apresentando baços extremamente grandes e de consistência firme aumentando muito a circunferência abdominal (figura 2). Porém, estas manifestações podem estar ausentes em 5% dos casos, sendo esta também a experiência de outros autores que não a encontram em 2 a 18% dos casos (BORGES et al., 1999; GONTIJO; MELO, 2004). Mesmo sabendo-se que os doentes com LV podem não apresentar todas as manifestações clínicas da doença, a ausência da esplenomegalia sempre dificulta o diagnóstico (BRASIL, 2006; PEDROSA; ROCHA, 2004).



Figura 2 - Hepatoesplenomegalia na leishmaniose visceral.

Fonte: Disponível em <http://fplsivroaberto.blogspot.com.br/2009/12/parasitas-leishmania-spp-e-leishmaniose.html>

Com a progressão da doença para o período final, a febre torna-se contínua e intensifica-se o comprometimento do estado geral. Instala-se a desnutrição com seus clássicos sinais de cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca. Baixas taxas de albumina levam a edema dos membros inferiores com ou sem anasarca e hemorragias são comuns: epistaxe, gengivorragia e petéquias (BRASIL, 2010a).

Raramente apresenta-se como uma síndrome icterícia de difícil prognóstico. O envolvimento renal, intersticial e/ou glomerular é um acometimento bem conhecido da infecção. Na maioria dos casos apresenta uma glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial e, em decorrência das lesões renais ocorrem distúrbios de sua função, podendo ser observado albuminúria e hematúria (SALGADO-FILHO; FERREIRA; COSTA, 2003). Nesses pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas (principalmente estafilococos aureus e pseudomonas aeruginosa) e/ou sangramentos, sendo as crianças mais suscetíveis a episódios de pneumonia. Otite média aguda, piodermites, traqueobronquites agudas, infecção urinária e complicações intestinais podem também, estar presentes. A hepatomegalia é outro achado que pode estar presente. Valores elevados das enzimas hepáticas sugerem o envolvimento hepático com apresentação clínica de icterícia e hepatite aguda que, em alguns casos, evoluem para insuficiência hepática e óbito (OLIVEIRA et al., 2010).

Finalmente, com a descoberta do primeiro caso de imunodeficiência humana adquirida e a sua propagação mundial, não é incomum encontrar-se casos de leishmaniose visceral associada à infecção pelo vírus HIV. Sabe-se que a presença de LV no indivíduo infectado pelo vírus HIV acelera a progressão desta infecção ao promover a replicação viral, agravando ainda mais o estado de imunossupressão. Por outro lado, é observado *in vitro* que o HIV induz a replicação de *Leishmania* pela diminuição de células T capazes de reconhecer os antígenos da mesma. A apresentação clínica, nestes pacientes, pode ser típica ou atípica, com sintomas gastrintestinais como os mais frequentes (CHAISSON et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2010). Há relatos ainda de casos de leishmaniose associados à infecção por HIV que podem demonstrar aspectos inusitados, com localizações dos parasitas em órgãos que raramente são acometidos na evolução das leishmanioses em pessoas HIV negativas, tais como o esôfago estômago, reto, pulmões, adrenais, miocárdio e, até mesmo, no sistema nervoso central (BORGES et al., 1999).

Em um estudo que avaliou a série temporal da leishmaniose visceral em Aracaju, Goes, Melo e Jeraldo (2012) concluíram que a sintomatologia mais frequente nos casos notificados foi: febre (95,8%), seguida de esplenomegalia (83,2%), emagrecimento (78,2%), sensação de fraqueza (76,5%), hepatomegalia (68,1%) e tosse (52,1%).

Alguns sinais de alerta são extremamente importantes para indicar a probabilidade de evolução para situações de gravidade. Destacam-se: idade inferior a 6 meses ou superior a 65 anos, desnutrição grave, febre há mais de 60 dias, presença de comorbidades, ocorrência de recidivas, número de leucócitos menor que 1.000/mL ou número de neutrófilos menor que 500/mm³, número de plaquetas menor que 50.000/mL, hemoglobina sérica menor que 7g/dL, creatinina sérica maior que duas vezes o valor de referência, albumina menor que 2,5mg/mL, atividade de protrombina menor que 70%, enzimas hepáticas acima de cinco vezes o maior valor de referência (BRASIL, 2006a).

Os critérios de cura são essencialmente clínicos. O desaparecimento da febre acontece por volta do segundo ao quinto dia de medicação e a redução do volume do baço e do fígado pode ser verificada nas primeiras semanas. Os parâmetros hematológicos melhoram a partir da segunda semana. A normalização das proteínas séricas se dá de forma lenta e pode levar meses. A melhora do estado geral e o ganho ponderal são evidentes desde o início do tratamento (BRASIL, 2006a).

Ao final do tratamento, a presença de eosinófilos no sangue periférico é um indicativo de bom prognóstico. O seguimento do paciente tratado deve ser feito aos 3, 6 e 12 meses após o tratamento. Ao final desse período, se permanecer estável, será considerado clinicamente curado (BRASIL, 2006b).

2.5 IMUNOFISIOPATOGENIA

As formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção e podem ser destruídas através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade enzimática e produção de óxido nítrico. Os neutrófilos

infectados começam a secretar quimiocinas como IL-8 e MIP-1, moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção (BACELAR; CARVALHO, 2005).

Embora, inicialmente pensou-se que a LV estivesse associada com a resposta imune tipo Th2, com elevação dos níveis de IL-4 e/ou IL-13 (NYLEN et al., 2007; SUNDAR et al., 1997) a maioria dos estudos supõe que não existe uma distorção clara da resposta Th2 na leishmaniose visceral humana. Tipicamente LV está associada com produção elevada de múltiplas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IP-10, MIG, IFN γ , e TNF α (ANSARI; SALUYA; SALOTRA, 2006; KURKJIAN et al., 2006; NYLEN et al., 2007). Elevados níveis de IFN γ mRNA tem sido encontrados no baço e medula durante a fase agudada infecção (NYLEN; SACKS, 2007). Estas observações sugerem que o desenvolvimento da LV não está direcionado pela anomalia da resposta Th2 por si só, mas que outros mecanismos contribuem para a patogênese da doença.

Em suporte a achados experimentais, estudos clínicos fortemente comprometem a IL-10 em muitos defeitos imunológicos associados ao calazar (NYLEN et al., 2007; NYLEN; SACKS, 2007). A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência da leishmania nas células. Ela inibe a síntese de citocinas produzidas pelos macrófagos como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α e inibe a função dessas células como apresentadoras de antígeno através da diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II. Outro efeito importante da IL- 10 nos macrófagos é a inibição dos eventos metabólicos associados com sua ativação. Esses efeitos, associados à capacidade dessa citocina de suprimir a produção de IFN- γ por células T CD4+ tipo Th1, fazem com que a IL-10 interfira na atividade leishmanicida do macrófago (BACELAR; CARVALHO, 2005).

Outra citocina que implica na progressão da leishmaniose visceral humana é TGF β (BARRAL-NETTO et al., 1992; SAHA et al., 2007). TGF- β tem efeitos anti-modulatórios nos macrófagos e seu bloqueio limita a replicação do parasita dentro das células (ANDERSON et al., 2008; REED, 1999).

A interleucina-12 (IL-12) tem sido apontada como um dos mais importantes componentes da fase inicial da infecção pela leishmania. É produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B) e sua principal atividade biológica é sobre células T e

células “natural killer” (NK), nas quais ela estimula a produção de citocinas, principalmente IFN- γ , proliferação celular e citotoxicidade.

2.6 DIAGNÓSTICO

O exame padrão ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral é a visualização da forma amastigota no esfregaço esplênico, de medula óssea, ou na cultura. O esfregaço esplênico apresenta sensibilidade de 93.1- 98.7% e o da medula óssea de 52-85%. Aspiração esplênica deve ser evitada, pois pode acarretar hemorragia potencialmente fatal em cerca de 0.1% dos indivíduos (SRIVASTAVA et al., 2011).

O diagnóstico sorológico se baseia na presença de resposta humoral específica. Uma grande variedade de métodos sorológicos, com diferentes sensibilidade e especificidade, são disponíveis para o diagnóstico de LV (SRIVASTAVA et al., 2011; WHO, 2010). Eles são demonstrados em estágios iniciais e são detectáveis seis a doze meses após a cura. O Teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o qual apresenta sensibilidade e especificidade de 96% e 98%, respectivamente, é considerado positivo em títulos superiores a 1:80 (BRASIL, 2010b; SRIVASTAVA et al., 2011; WHO, 2010). O ensaio imunoenzimático (ELISA) apresenta sensibilidade e especificidade dependentes do antígeno utilizado. Resultados promissores têm sido demonstrados com o antígeno rk39 com 96% sensibilidade e 100% de especificidade. Este apresenta também grande utilidade diagnóstica e prognóstica em pacientes coinfectados com HIV. O western blotting fornece resposta detalhadas para vários antígenos da *Leishmania* e apresenta sensibilidade superior à RIFI e ELISA, porém é um método mais caro e demorado (SRIVASTAVA et al., 2011).

Utilizando antígenos rk39 em formato de imunocromatografia de fluxo lateral, foi desenvolvido um teste rápido, que pode ser realizado à beira do leito, com uma gota de sangue colhida da polpa digital, com resultado em 20 minutos, apresentando, no Brasil, sensibilidade de 90% e especificidade de 100% (MELO, 2011).

O teste de aglutinação direta (DAT) é um teste altamente específico, sensível, baixo custo e simples de ser realizado. Em estudos de meta-análises utilizando DAT foi obtida sensibilidade de 94.8% (intervalo de confiança de 95%: 92,7-96,4) e especificidade de 85.9% (intervalo de confiança 95%: 72,3-93,4). A desvantagem principal é a necessidade de múltiplas pipetagens, tempo de incubação relativamente longo, custo elevado do antígeno e produção limitada (apenas dois laboratórios europeus). Assim como acontece com qualquer teste baseado em anticorpos o DAT permanece positivo por longo período após a cura da doença, não podendo, pois, ser utilizado como teste de cura ou diagnóstico de recidivas (SRIVASTAVA et al., 2011).

A padronização e validação de métodos de diagnóstico para leishmaniose visceral incluem geralmente pacientes com o quadro clínico clássico da doença. As técnicas padrão-ouro utilizadas para a detecção do parasita não são justificadas em casos assintomáticos da doença, porque podem representar um risco ou desconforto excessivo ao indivíduo, sem fornecer benefício evidente. Assim, métodos indiretos para a avaliação de exposição ao parasita têm sido amplamente utilizados como ferramentas para o diagnóstico da infecção subclínica (SILVA et al., 2011).

Em 1964, Manson-Bahr e Southgate chamaram atenção para um grupo de indivíduos com teste de Montenegro positivo (teste de hipersensibilidade tardia) e que nunca desenvolveram a doença. Desde então, esse teste se tornou uma ferramenta diagnóstica para a infecção anterior com *L. chagasi* em áreas endêmicas de leishmaniose visceral e pode ser utilizado para caracterizar infecção assintomática (SILVA et al., 2011). Na forma clássica da LV, entretanto, o Montenegro se mostra negativo durante atividade da doença, tornando-se positivo após semanas ou até dois após o tratamento, como consequência da restauração da resposta imune do indivíduo (BORGES et al., 2003).

Os exames sorológicos, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), são reativos e a Intradermorreação de Montenegro negativa em pacientes que apresentam a forma clássica da doença. Já na forma oligossintomática, a punção aspirativa de medula óssea pode ou não mostrar a presença da *Leishmania*, não sendo, a princípio, indicada a sua realização; a IDRM pode estar positiva e a sorologia é, invariavelmente, reagente (BRASIL, 2006c).

Alguns autores sugerem que a detecção das formas assintomáticas de LV em estudos de acompanhamento e em estudos de incidência, seria melhor evidenciada utilizando o IDRM do que as sorologias (COSTA et al., 2002). Este teste tem mostrado um bom desempenho quando utilizado para avaliar infecções assintomáticas, apresentando correlação variável com estudos sorológicos (RIERA et al., 2004).

O Programa de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral (BRASIL, 2010b) tem o objetivo de reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade por meio do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, bem como diminuir os riscos de transmissão através do controle da população de reservatórios e do agente transmissor. Apresenta, pois, entre as suas Normas e Condutas a definição de casos suspeitos e confirmados de LV.

Caso suspeito de LV: febre com duração de até quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia ou todo indivíduo com febre irregular, associado a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia que apresenta evolução do quadro superior a dois meses, com comprometimento do estado geral. Associado a esse quadro, o paciente deve ser procedente ou deslocar-se de área endêmica ou de ocorrência de surto em humanos e/ou em animais no Brasil ou em outros países nos últimos dois anos.

Caso confirmado de LV: Critério clínico-laboratorial - Encontro do parasito no exame parasitológico direto ou cultura ou Imunofluorescência reativa com título de 1:80 ou mais, desde que excluídos outros diagnósticos diferenciais.

Critério clínico-epidemiológico - Paciente de área com transmissão de leishmaniose visceral, com suspeita clínica sem confirmação laboratorial.

Um estudo feito na Espanha utilizando uma combinação de técnicas diagnósticas para LV mostrou que a mais sensível foi o *Western Blot* (75%) seguido da IDRM (50%). Foram utilizadas também neste estudo outras técnicas como ELISA, culturas de creme leucocitário e hemocultura e testes moleculares (PCR), dentre as quais a positividade maior ocorreu com a IDRM (RIERA et al., 2004).

O IDRM mostra-se positivo nos pacientes em contato com os parasitas do gênero *Leishmania*. No caso da LV, é positivo nos indivíduos assintomáticos, nas formas oligossintomáticas e nos curados. No período de estado da doença, ele mostra-se negativo (IBRAHIM et al., 1999).

2.7 TRATAMENTO

Atualmente, as drogas disponíveis para o tratamento são potencialmente tóxicas, de administração parenteral e possuem várias contra-indicações. As mais usadas são os antimoniais e a Anfotericina B; entretanto, ultimamente a Miltefosina, uma droga de administração oral, vem sendo empregada com sucesso, na Índia (BRAGA, 2007).

Antimoniais pentavalentes são medicamentos de primeira linha em muitas partes do mundo (taxa de cura superior a 90%), inclusive no Brasil, mas a resistência é uma grande preocupação em Bihar, Índia e Nepal (WHO, 2010). Este tratamento é prolongado, apresenta toxicidade e no estado de Bihar, na Índia, apresentou até 60% de falha, sendo presumível a existência de resistência à droga (STAUCH et al., 2011; WHO, 2010).

Efeitos colaterais frequentes dos antimoniais pentavalentes são: anorexia, vômitos, dor abdominal, mialgia, cefaléia. Mas a principal alteração se refere ao sistema cardiovascular, sendo mais comum alterações eletrocardiográficas, como inversão de onda T, intervalo Q-T prolongado e arritmia. Cardiotoxicidade e morte súbita são graves, mas de ocorrência rara. Enzimas pancreáticas são comumente elevadas, mas pancreatite clínica é incomum (WHO, 2010).

Estudos farmacocinéticos sobre os derivados pentavalentes mostram que eles apresentam rápida eliminação renal (vida média de cerca de 2 horas). A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América têm incentivado nos últimos anos o uso de doses progressivamente maiores em razão do aparecimento de resistência do parasita a essas drogas, principalmente em países como Sudão, Índia e Quênia (BRASIL, 2006b).

A anfotericina B é droga de segunda escolha e a mais potente leishmanicida disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A experiência clínica acumulada com seu uso no tratamento da leishmaniose visceral vem aumentando ao longo dos últimos anos. Tem sido demonstrado que doses menores do medicamento podem ser utilizadas sem prejuízo da eficácia, com consequente diminuição de sua toxicidade.

É a única opção no tratamento de gestantes e está indicada como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou tenham apresentado toxicidade ou refratariedade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2006a).

A forma lipossomal da anfotericina B, também disponibilizada pelo Ministério da Saúde no Brasil, apresenta custo bastante elevado e menor toxicidade, sendo recomendada, por exemplo, nos pacientes que apresentam falha terapêutica, toxicidade, insuficiência renal ou transplantados renais (STAUCH et al., 2011; WHO, 2010).

Recentemente, a Miltefosina vem sendo utilizada na Índia, com resultados promissores no tratamento do calazar indiano. Sua eficácia em outras áreas endêmicas ainda necessita de comprovação. É uma droga originalmente desenvolvida como agente antineoplásico, sendo a primeira apresentação oral efetiva para o tratamento da LV, incluindo infecções resistentes ao antimônio; é usada durante 28 dias, ativa em crianças e adultos, com toxicidade tolerável e reversível, não podendo ser usada em gestantes ou mulheres em idade fértil devido ao seu potencial teratogênico (BRAGA, 2007; BRUSTOLONI, 2006).

Atualmente a terapia combinada encontra-se em discussão, parecendo bastante promissora. Uma combinação que tem sido considerada é a do antimonial com a Anfotericina B, os dois medicamentos mais eficazes no tratamento. Outra droga que está sendo testada na Índia é a Paromicina (único aminoglicosídeo com larga atividade leishmanicida) (BRUSTOLONI, 2006).

2.8 MEDIDAS DE CONTROLE

A prevenção da leishmaniose visceral envolve o controle do vetor e dos animais que atuam como reservatório do protozoário, além da elaboração de uma vacina efetiva, visto que, com a cura dessa doença, é normalmente observado o desenvolvimento de uma imunidade consistente, a qual previne re-infecções. (ROBERTS, 2006; SAHA et al., 2006).

Para o controle do vetor, têm sido utilizadas medidas como uso de repelentes, telagem de portas, janelas e canis, inseticidas, como DDT (Dicloro-

difenil-tricloroetano), e mosquiteiros impregnados com o composto químico piretroide, proteção essa que por si só tem reduzido o número de picadas de 64 a 100%. Por se tratar de uma doença zoonótica, cujo principal reservatório é o cão doméstico, o uso de coleiras impregnadas com deltametrina tem promovido uma proteção de até 80% nestes animais nas épocas de maior transmissão (ELKHOURY, 2006; ROBERTS, 2006).

Esforços para o desenvolvimento de uma vacina incluem pesquisas com diferentes antígenos, estudo dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro e ainda, a análise dos antígenos candidatos à vacina, sendo eles avaliados tanto sob sua forma bruta quanto sob a recombinante (ROBERTS, 2006).

Além da redução da população de flebotomíneos, as medidas a serem tomadas para o controle da doença envolvem o monitoramento e eutanásia dos cães sororreagentes, o diagnóstico precoce e o respectivo tratamento dos pacientes, e ainda, atividades educativas em saúde (ELKHOURY, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica em diversas partes do mundo incluindo o Brasil, estando na região Nordeste as maiores incidências.

Dentre o amplo espectro clínico, o diagnóstico da infecção assintomática tem se tornado cada vez mais importante, pois indivíduos com LV assintomática são potenciais reservatórios, especialmente para outras formas de transmissão como transfusão sanguínea, transmissão congênita ou transmissão para o próprio vetor. Além disso, a identificação desses indivíduos e suas características podem elucidar os fatores que os protegem.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar as características clínicas e imunológicas de familiares de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral.

4.2 ESPECÍFICOS

- Estimar a frequência de indivíduos com infecção assintomática para *Leishmania chagasi*, em familiares de pacientes diagnosticados com a doença.
- Identificar fatores clínicos e ambientais associados à infecção assintomática.
- Analisar os níveis séricos de citocinas em familiares de pacientes diagnosticados com a doença.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, transversal, descritivo, com dados coletados prospectivamente.

5.2 AMOSTRAGEM

A amostra foi não aleatória, com pacientes selecionados de forma consecutiva.

Foram pesquisados 109 familiares de 40 pacientes (casos-índices) diagnosticados com leishmaniose visceral e, que foram tratados no Hospital Universitário de Aracaju, no período de outubro de 2010 a setembro de 2012.

5.3 SELEÇÃO DOS PACIENTES

5.3.1 Definição dos casos confirmados (casos-índices)

Paciente com quadro clínico compatível com leishmaniose visceral: febre prolongada, hepato e/ou esplenomegalia, citopenia (anemia, leucopenia, plaquetopenia), hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, com sorologia rK39 positiva e/ou com presença de *Leishmania* em esfregaço de medula óssea, mielocultura ou qualquer outro material biológico.

5.3.2 Definição dos casos assintomáticos

Os casos de leishmaniose visceral assintomática considerados neste trabalho foram indivíduos que apresentaram intradermorreação de Montenegro e/ou sorologia *ELISA* positivos e que, no momento da coleta de dados, não apresentaram nenhum sintoma sugestivo da doença, ou seja, febre prolongada (mais de uma semana), associada ou não a perda de peso importante, fadiga excessiva, palidez, manifestações hemorrágicas; nem alterações significativas ao exame físico (especialmente fígado e baço aumentados) .

5.3.3 Critérios de inclusão

Familiares dos pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral, que estavam em tratamento ou tinham sido tratados no Hospital Universitário, no período da coleta de dados.

5.3.4 Critérios de exclusão

Pessoas que não retornaram para a leitura do teste de Montenegro e que também não tinham resultado de sorologia por *ELISA*.

5.4 LOGÍSTICA

Os familiares de pacientes com LV do HU foram avaliados para inclusão neste estudo. Receberam verbalmente uma explicação sobre a pesquisa, os procedimentos aos quais seriam submetidos e foram convidados a participar, sendo solicitada a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), confirmando sua participação (APÊNDICE A). Foi garantido, ainda, sigilo de sua identidade e o direito de deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem ônus para qualquer das partes.

Realizou-se avaliação clínico-epidemiológica através de um questionário, contendo perguntas fechadas (APÊNDICE C), seguido de exame físico e coleta de sangue. Foram coletados dados demográficos como nome, idade, sexo, local de moradia. Dados clínicos como presença dos seguintes sintomas: febre, perda de peso, fadiga, náuseas, diarreia e hemorragias. Em seguida foi realizado o exame físico no qual se buscou a presença de linfonodos, a existência de fígado e baço palpáveis e palidez cutânea. Foi realizada ainda coleta de 20ml de sangue periférico, o qual foi separado em tubos para centrifugação a uma velocidade de 3000 rpm, a 26 °C, por 10 minutos e, em seguida separação do soro. Os soros foram identificados com o código do indivíduo e armazenados em freezer a -70°C, para posterior exame sorológico.

Logo após a coleta do sangue, foi feita a aplicação do teste de Montenegro, com o antígeno do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) fabricado pelo Instituto de Saúde do Paraná.

O antígeno foi injetado na face anterior do antebraço, na quantidade de 0,1ml, via intradérmica, delimitando com caneta esferográfica, uma circunferência com raio de aproximadamente 2 cm, tendo como centro o local da punctura . Procedeu-se à leitura após 48 a 72 h. Foi considerada reação positiva quando o diâmetro da endureção era maior ou igual a 5 mm.

A intradermorreação foi escolhida por se tratar de um teste barato, de fácil aplicação e leitura, sem a necessidade de aparelhos para sua aplicação e tem alta especificidade como indicador de proteção para a doença.

5.5 VARIÁVEIS PESQUISADAS

5.5.1 Sócio-demográficas

- Idade
- Sexo
- Procedência

5.5.2 Sinais e sintomas

- Febre
- Fadiga
- Perda de peso
- Náuseas
- Palidez
- Diarreia
- Manifestações hemorrágicas

5.5.3 Fatores ambientais

- Presença de cachorro na residência
- Presença de galinheiro na residência ou proximidades
- Presença de restos de madeira no domicílio ou peridomicílio

5.5.4 Testes diagnósticos

- Intradermorreação de Montenegro (n=96)
- Sorologia por *ELISA* (n=80)

5.5.5 Variável de desfecho

- Positividade para um ou para ambos os testes utilizados: intradermorreação de Montenegro e sorologia por *ELISA*.

5.6 DOSAGEM DE CITOCINAS

A quantificação dos níveis séricos das citocinas TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 foi realizada pela FIOCRUZ/BA, usando a técnica CBA (Cytometric Bead Array), seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do questionário epidemiológico, do exame clínico e laboratorial da população estudada foram introduzidos em um banco de dados, utilizando-se o programa EXCELL. Análises dos dados foram realizadas através do programa estatístico SPSS, versão 17.0. As variáveis categóricas foram descritas como frequências simples e percentagens e as variáveis quantitativas como média e desvio padrão. Para analisar a associação entre as variáveis categóricas utilizou-se o teste do qui-quadrado (χ^2). Adotou-se intervalo de confiança de 95% e $p \leq 0,05$. Para a análise das variáveis quantitativas foi utilizado o teste T de Student, na comparação das médias dos indivíduos com e sem positividade.

A análise das citocinas foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism. As concentrações das citocinas produzidas pelos indivíduos com resultados positivos aos testes de Montenegro e *ELISA* foram comparadas com os negativos, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, uma vez que os testes de normalidade (D'Agostino e Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) constataram que os valores apresentados não obedeciam à distribuição Gaussiana.

As razões entre as citocinas foram analisadas e comparadas entre familiares positivos e negativos ao resultado do *ELISA*, pelo Teste t Não Pareado (quando dados paramétricos) e pelo teste de Mann-Whitney (quando dados não paramétricos). Correlação de Spearman também foi empregada.

5.8 ASPECTOS ÉTICOS

Para o desenvolvimento do estudo aqui proposto foi obtido consentimento por escrito de todos os pacientes maiores de 18 anos de idade e dos responsáveis pelos pacientes com menos de 18 anos; incluindo-se ainda o termo de assentimento para aqueles entre 12 e 18 anos de idade. O projeto do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFS com o número 0042.0.107.000-10.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 109 indivíduos, familiares de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral, já em tratamento. A média de idade foi $26,2 \pm 13,6$, com mínima de um e máxima de 82 anos. A frequência de participantes do sexo feminino foi superior a do sexo masculino (61,5% VS 38,5%; $p= 0,02$). Verificou-se também uma maior porcentagem de pessoas procedentes da capital (58,7%), seguida do interior (33,9%) e uma menor proporção (7,4%) de indivíduos advindos de outros Estados.

6.2 POSITIVIDADE PARA OS TESTES DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS: INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO (IDRM) E SOROLOGIA POR *ELISA*

A frequência de positividade da amostra estudada, considerando um ou ambos os testes empregados foi de 58,7%, com IC 95% de 49,5 a 67,9, como mostra a Tabela 1 abaixo. Dos 109 participantes, 64 tiveram resultado positivo para um ou para ambos os testes e 45 foram negativos. Considerando os testes, isoladamente, houve maior positividade em relação ao *ELISA* (46,3%), do que com IDRM (38,5%).

Tabela 1 - Frequência de positividade para IDRM, sorologia por *ELISA* ou ambos, dos familiares assintomáticos de pacientes com leishmaniose visceral. Sergipe, Brasil – 2010 a 2012.

VARIÁVEL	N	PERCENTUAL	IC 95%
IDRM positiva	96	38,5	28,9 – 48,0
<i>ELISA</i> positivo	80	46,3	35,2 – 57,6
IDRM e/ou <i>ELISA</i> positivos	109	58,7	49,5 – 67,9

IC 95%(Intervalo de confiança estimado pela técnica “Bootstrap”).

6.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA, DE ACORDO COM OS RESULTADOS DOS TESTES: IDRM E SOROLOGIA

A Tabela 2 resume os dados demográficos, considerando os resultados dos testes utilizados, sendo positivos aqueles indivíduos reagentes para um ou para ambos os testes e negativos, aqueles que não apresentaram reatividade a nenhum dos testes em questão. Os indivíduos positivos apresentaram uma média de idade superior aos negativos, porém sem significância estatística ($p=0,09$). Observou-se uma distribuição homogênea ($p=0,59$) dos sexos masculino e feminino entre os grupos. Da mesma forma, não houve diferença entre positivos e negativos em relação à procedência ($p=0,13$).

Tabela 2 – Dados demográficos dos familiares de pacientes com leishmaniose visceral, segundo positividade à IDRM e/ou *ELISA*. Sergipe, Brasil – 2010 a 2012.

VARIÁVEL	POSITIVOS	NEGATIVOS	P*
IDADE	28,4 ± 16,2	23,0 ± 16,1	0,09
SEXO			
Masculino	26 (40,6%)	16 (35,6%)	0,59
Feminino	38 (59,4%)	29 (26,6%)	
PROCEDÊNCIA			
Capital	40 (62,5%)	24 (53,3%)	0,13
Interior	22 (34,4%)	15 (33,3%)	
Outros Estados	02 (3,1%)	06 (13,3%)	

* Teste do qui-quadrado; Teste T Student.

6.3.1 Positividade em relação à faixa etária

A amostra foi dividida em faixas etárias para melhor visualização, sendo apresentada da seguinte forma: ≤ 5 anos; > 5 a < 10 anos; 10 a < 15 anos e ≥ 15 anos. Foi observado um maior percentual de indivíduos positivos na faixa etária ≥ 15 anos, considerando IDRM (41,0%) e *ELISA* (38,5%), isoladamente. Maior positividade também foi encontrada na mesma faixa etária quando analisados

ambos os testes (65,4%). A Tabela 3 mostra a distribuição dos familiares e os resultados dos testes em relação à faixa etária.

Tabela 3 – Frequência de positividade aos testes IDRM e *ELISA* dos familiares de pacientes com LV, segundo a faixa etária. Sergipe, Brasil - 2010 a 2012.

FAIXA ETÁRIA (ANOS)	N	IDRM			ELISA			IDRM E/OU ELISA	
		N (%)		SR	N (%)		SR	N (%)	
		+	-		+	-		+	-
≤5	11	1(9,2)	7(63,6)	3(27,2)	1(9,2)	5(45,4)	5(45,4)	3(27,3)	8(72,7)
>5 a < 10	06	1(16,7)	4(66,6)	1(16,7)	2(33,3)	3(50,0)	1(16,7)	3(50,0)	3(50,0)
10 a < 15	14	3(21,4)	8(57,2)	3(21,4)	4(28,6)	6(42,8)	4(28,6)	7(50,0)	7(50,0)
≥15	78	32(41,0)	40(51,3)	6(7,7)	30(38,5)	29(37,2)	19(24,3)	51(65,4)	27(34,6)
TOTAL	109	37(33,9)	59(54,2)	13(11,9)	37(33,9)	43(39,5)	29 (26,6)	64(58,7)	45(41,3)

6.3.2 Positividade em relação ao sexo

Nos 109 indivíduos submetidos ao Teste de Montenegro e sorologia houve positividade para um ou para ambos os testes em 64 familiares, o que corresponde a uma frequência de 58,7%.

Fazendo a análise da positividade em relação ao sexo, o grupo feminino apresentou positividade de 56,7% (38/67) e o masculino de 61,9% (26/42). Apesar de a maior frequência de positividade ter ocorrido no sexo feminino (59,4%) no total da amostra de positivos (38/64), os indivíduos masculinos apresentaram maior positividade, quando a análise foi feita considerando os grupos masculino e feminino, isoladamente, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p=0,34$).

A distribuição da positividade dos familiares, segundo o sexo, está representada no Gráfico 2, a seguir.

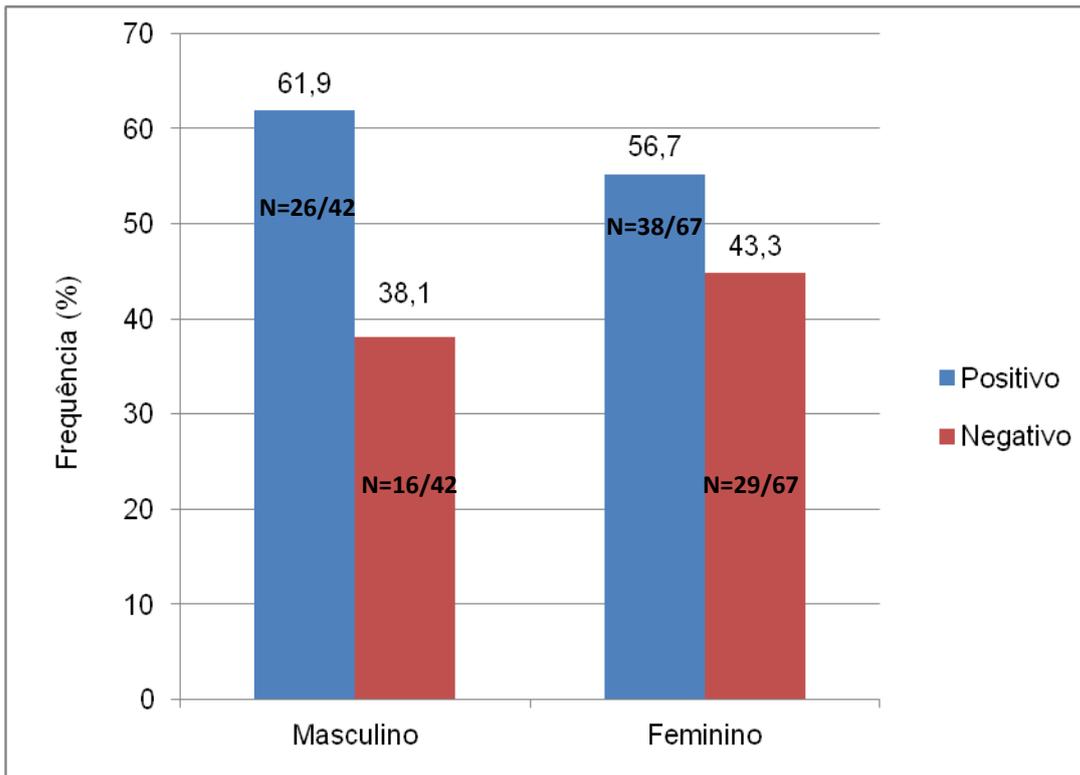


Gráfico 1 - Frequência de positivos pelo IDR e/ou Sorologia de acordo com o sexo.

Teste χ^2 $p = 0,34$.

6.3.3 Positividade em relação à procedência

Os pacientes (casos-índices) estavam distribuídos segundo local de moradia, da seguinte forma: capital (22/40), interior (15/40), outros Estados (3/40).

Os três casos-índices provenientes de outros Estados foram todos do interior da Bahia, sendo um de Paripiranga, outro de Jeremoabo e outro de Quixabá.

Já em relação aos familiares, 64 deles (58,7%) procediam da capital Aracaju, sendo 40 positivos (62,5%) e 24 negativos (53,3%) para IDR e/ou *ELISA*. Trinta e sete (33,9%) eram do interior de Sergipe, com 22 positivos (34,4%) e 15 negativos (33,3%) para os mesmos testes. Oito familiares provenientes do interior da Bahia foram examinados, resultando em dois positivos (3,1%) e seis indivíduos negativos (13,3%), também considerando um ou ambos os testes. O Gráfico 2 mostra a distribuição dos casos-índices e familiares, segundo a procedência.

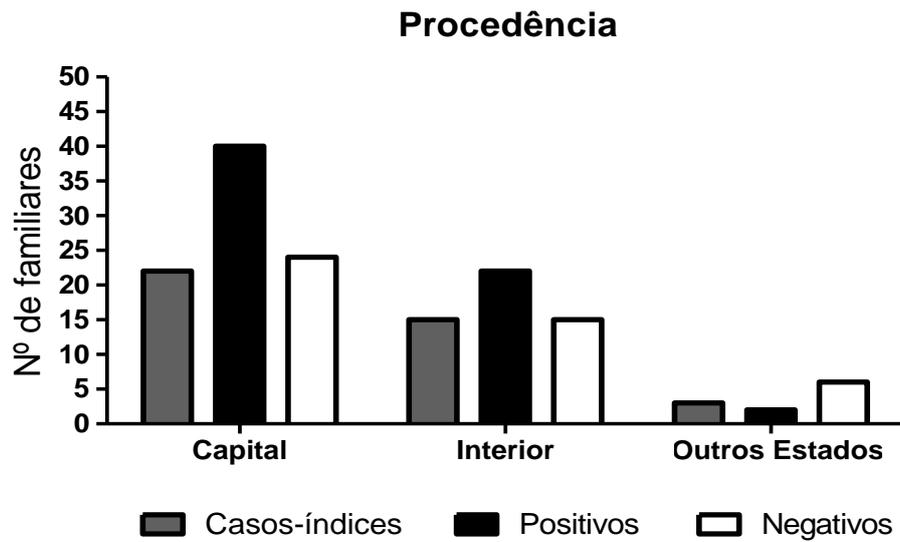


Gráfico 2 – Distribuição de pacientes (casos-índices) e positividade dos familiares para IDRM e/ou *ELISA*, segundo a procedência.

A seguir, a tabela 4 mostra a distribuição dos casos-índices e dos familiares, levando em consideração os bairros de Aracaju. A maioria dos pacientes, assim como dos familiares com infecção assintomática, era proveniente do bairro Mosqueiro, pertencente à zona de expansão de Aracaju, resultando numa frequência de positividade de 18,2 e 27,5%, respectivamente. Os demais familiares com testes positivos (IDRM e/ou *ELISA*) residiam, principalmente, no Santos Dummont, seguido por Atalaia Velha e bairro América.

Tabela 4 – Distribuição dos pacientes e positividade dos familiares segundo os bairros da capital Aracaju. Sergipe, Brasil - 2010 a 2012.

BAIRROS CAPITAL	CASOS-ÍNDICES		POSITIVOS		NEGATIVOS	
	N	%	N	%	N	%
América	03	13,6	05	12,5	06	25,0
Atalaia Velha	03	13,6	05	12,5	01	4,2
Bugio	02	9,2	-	-	02	8,3
Cirurgia	02	9,2	02	5,0	03	12,5
Mosqueiro	04	18,2	11	27,5	02	8,3
Novo Paraíso	01	4,5	01	2,5	02	8,3
Santos Dummond	02	9,2	06	15,0	02	8,3
São Conrado	01	4,5	01	2,5	01	4,2
Siqueira Campos	01	4,5	02	5,0	02	8,3
Soledade	01	4,5	02	5,0	-	-
Suissa	01	4,5	04	10,0	-	-
Industrial	01	4,5	01	2,5	03	12,5
TOTAL	22	100,0	40	100,0	24	100,0

No interior do Estado de Sergipe, os municípios com maior número de familiares com testes positivos, ou seja, com LV assintomática foram Itaporanga, Estância e Pacatuba. Oito contactantes eram do interior da Bahia (Paripiranga, Jeremoabo e Quixabá), sendo dois positivos (25,0%) e seis negativos (75,0%). A Tabela 5 mostra a distribuição de pacientes e positividade dos familiares, segundo os municípios do interior do Estado.

Tabela 5 – Distribuição dos pacientes e positividade dos familiares de acordo com os municípios do interior de Sergipe. Sergipe, Brasil - 2010 a 2012.

MUNICÍPIOS	CASOS-ÍNDICES		POSITIVOS		NEGATIVOS	
	N	%	N	%	N	%
Carira	01	6,6	01	4,5	-	-
Estância	02	13,5	03	13,7	-	-
Gararu	01	6,6	01	4,5	-	-
Itaporanga	03	20,0	10	45,6	04	26,6
Pacatuba	01	6,6	03	13,7	-	-
Riachão do Dantas	01	6,6	01	4,5	02	13,4
Santo Amaro	01	6,6	01	4,5	02	13,4
São Cristóvão	02	13,5	01	4,5	01	6,6
Socorro	03	20,0	01	4,5	06	40,0
Outros estados	03	100,0	02	25,0	06	75,0
TOTAL	18	100,0	24	100,0	21	100

6.4 PRESENÇA DE SINAIS/SINTOMAS

Em relação às manifestações clínicas, não foi encontrada em nenhum dos 109 familiares estudados a presença de sinais ou sintomas como febre, perda de peso, manifestações hemorrágicas e diarreia; ao exame físico também não foi identificada presença de hepatoesplenomegalia. Foram encontrados, portanto, apenas indivíduos assintomáticos, não sendo observada a forma clássica da Leishmaniose visceral entre os familiares, assim como não foi identificado nenhum familiar com a forma subclínica da doença.

Aqueles que apresentaram resultado positivo aos testes aplicados foram caracterizados com portadores de leishmaniose visceral assintomática, ou seja, tiveram contato com o parasita, mas não desenvolveram a doença. Os que foram negativos aos mesmos testes, provavelmente não tiveram contato com a *Leishmania*.

6.5 FATORES AMBIENTAIS

Foram pesquisados três fatores considerados de risco para o aumento de infecção pela *Leishmania*, no ambiente de moradia dos familiares de pacientes com calazar e sua relação com a positividade para IDRMs e/ou *ELISA*. Presença de cachorro no domicílio, existência de galinheiro nas proximidades da casa e acúmulo de restos de madeira no quintal ou em volta casa. Cachorro estava presente em 62, dos 109 familiares questionados, sendo que destes 38 (61,3%) tinham positividade para os testes e 24 (38,7%) eram negativos. Trinta e uma pessoas informaram existir galinheiro no quintal ou nas proximidades, destas 21 (67,7%) eram positivas e 10 (32,3%) negativas para os testes aplicados. O número de familiares que afirmaram haver restos de madeira no domicílio foi 58, sendo 36 (62,1%) positivos e 22 (37,9%) negativos para Teste de Montenegro e/ou sorologia por *ELISA*. A análise dos fatores, isoladamente, não mostrou resultados estatisticamente significativos. Porém, ao analisarmos dois fatores simultaneamente, houve diferença significativa quando os familiares possuíam cachorro e restos de madeira, na residência ($p=0,04$), $OD=2,8$. A presença ou ausência dos três fatores, simultaneamente, também não mostrou resultados significativos. A Tabela 6 resume os fatores ambientais pesquisados e a relação com o resultado dos testes.

Tabela 6 – Frequência de positividade da amostra para IDRM e/ou *ELISA*, de acordo com a presença de fatores ambientais. Sergipe, Brasil – 2010 a 2012.

VARIÁVEL	POSITIVOS		NEGATIVOS		OR (IC95%)	*p
	N	%	N	%		
Cachorro						
Sim	38	59,4	24	53,3	1,3 (0,59-2,80)	0,56
Não	26	40,6	21	46,7		
Galinheiro						
Sim	21	32,8	10	22,2	1,7 (0,71-4,10)	0,28
Não	43	67,2	35	77,8		
Madeira						
Sim	36	56,2	22	48,9	1,3 (0,60-2,90)	0,55
Não	28	43,8	23	51,1		
Cachorro + Galinheiro						
Sim	17	26,6	6	13,3	2,4 (0,85-6,50)	0,15
Não	47	73,4	39	86,7		
Cachorro + Madeira						
Sim	22	34,4	7	15,5	2,8 (1,10-7,40)	0,04
Não	42	65,6	38	84,5		
Madeira +Galinheiro						
Sim	13	20,3	4	8,9	2,6 (0,79-8,60)	0,12
Não	51	79,7	41	91,1		
Todos						
Sim	11	17,2	2	4,4	4,5 (0,94-21,0)	0,07
Não	53	82,8	43	95,6		
Nenhum						
Sim	10	15,6	4	8,9	1,9 (0,56-6,50)	0,39
Não	54	84,4	41	91,1		

IC 95%: Intervalo de Confiança 95%; OR: Odds ratio.

*p – Teste exato de Fisher

6.6 NÍVEL SÉRICO DAS CITOCINAS

Foram pesquisadas as citocinas TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12, em amostras de soro adquiridas a partir do sangue periférico dos familiares de pacientes com leishmaniose visceral, colhido no mesmo momento da aplicação do questionário. TGF- β foi dosada em 63 familiares, sendo 42 positivos e 21 negativos.

As demais citocinas foram dosadas em 59 participantes, dos quais 39 eram positivos e 20 negativos aos testes de Montenegro e/ou sorologia por *ELISA*.

A partir dessas dosagens foi possível caracterizar a produção de citocinas nos indivíduos com infecção assintomática (positivos) e nos indivíduos com resultados negativos aos testes. A Tabela 7 apresenta os resultados dos níveis das citocinas em relação ao resultado dos testes de Montenegro e/ou *ELISA*.

Tabela 7 – Distribuição dos níveis de citocinas nos familiares de acordo com a positividade ao IDRM e/ou *ELISA*. Sergipe, Brasil – 2010 a 2012.

VARIÁVEL	n1	POSITIVOS	n2	NEGATIVOS	P
TNF- α (pg/ml)	39	1,31 (0,87; 2,46)	20	1,25 (0,87; 1,73)	0,39
TGF- β^1 (ng/ml)	42	50,8 \pm 13,2	21	62,0 \pm 12,1	0,002
IL-1 (pg/ml)	39	0,91 (0,46; 1,46)	20	0,83 (0,64; 1,14)	0,64
IL-6 (pg/ml)	39	1,51 (0,94; 4,54)	20	1,44 (0,81; 2,55)	0,45
IL-8 (pg/ml)	39	9,2 (5,6; 14,6)	20	7,3 (5,5; 16,7)	0,98
IL-10 (pg/ml)	39	2,18 (1,66; 3,57)	20	1,77 (1,35; 2,44)	0,024
IL-12 (pg/ml)	39	2,56 (2,21; 3,74)	20	2,10 (1,48; 2,77)	0,038

1. Valores expressos em média e desvio padrão, demais valores expressos como mediana (1º quartil; 3º quartil).

Observou-se que os indivíduos com positividade para IDRM e/ou *ELISA* apresentaram níveis séricos de TGF- β significativamente menores em relação aos que foram negativos aos mesmos testes, sendo a diferença de $11,2 \pm 3,4$, em prol dos negativos.

Do mesmo modo, os indivíduos positivos, ou seja, os portadores de infecção assintomática apresentaram diferença na distribuição das citocinas IL-10 e IL-12, em relação aos negativos. As medianas, isto é, a distribuição dos valores foi significativamente maior nos indivíduos positivos.

Em seguida, a partir do resultado do *ELISA* foram analisadas as razões entre as citocinas IL-12 e IL-10; IL-12 e TGF- β ; TGF- β e IL-10 e comparadas entre os grupos positivo e negativo (figura 3).

A razão entre IL-12 e IL-10, não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p=0,65$), Figura 3 (A). Já a razão entre IL-12 e TGF- β mostrou-se maior nos indivíduos positivos, ou seja, os familiares com infecção assintomática apresentaram valores maiores de IL-12 em relação ao TGF- β , do que os familiares negativos ($p=0,04$), como mostra a figura 3 (B). A razão TGF- β e IL-10 (figura 3-C) também mostrou-se homogênea ($p=0,19$) nos indivíduos com e sem positividade ao *ELISA*.

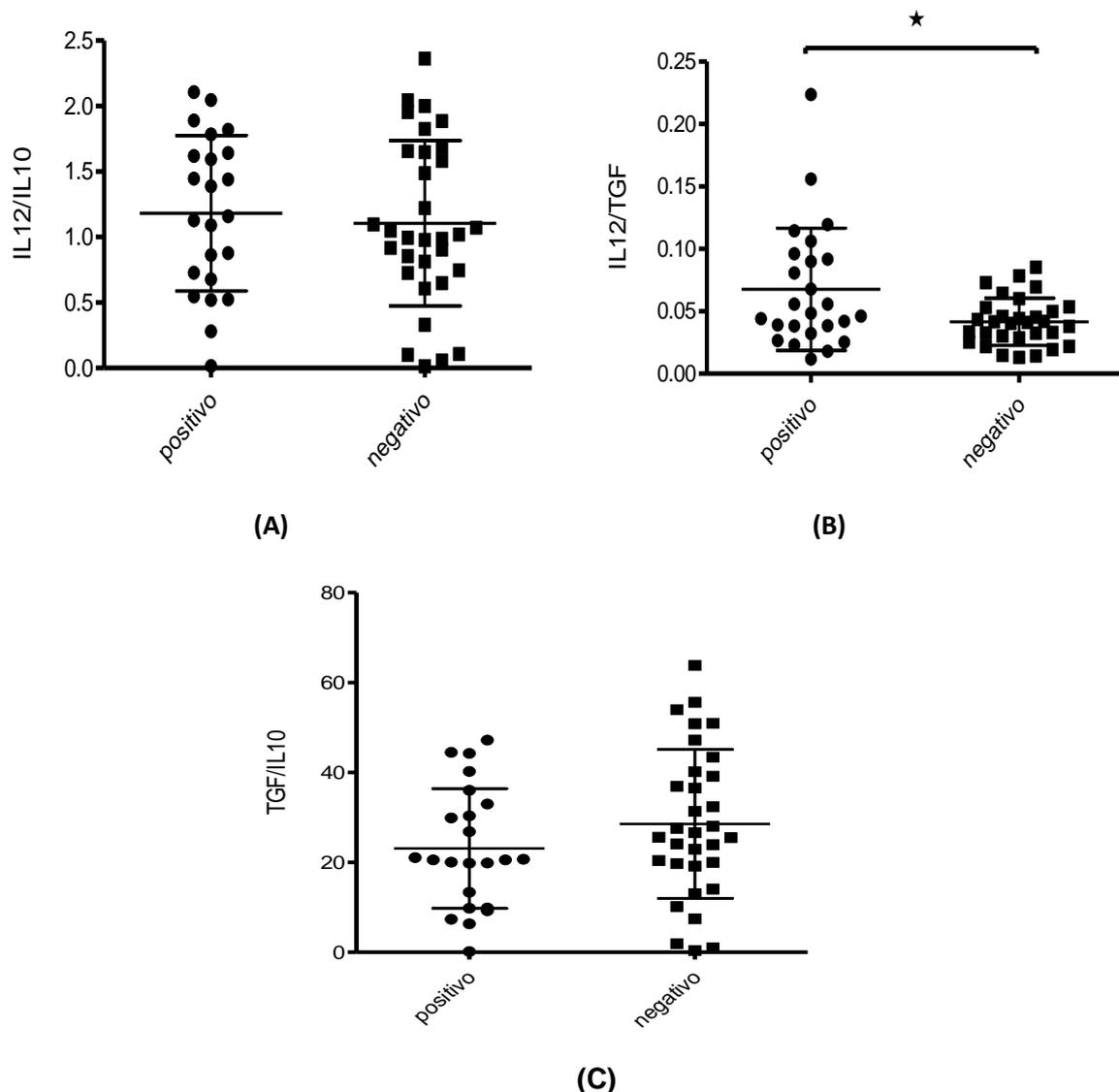


Figura 3 – Razão entre as citocinas. **(A)**: gráfico da razão entre as citocinas IL-12 e IL-10, em familiares com resultado positivo e negativo para *ELISA* ($p=0,65$). **(B)**: gráfico da razão entre as citocinas IL-12 e TGF- β , em familiares com resultado positivo e negativo para *ELISA* ($p=0,04$). **(C)**: gráfico da razão entre as citocinas TGF- β e IL-10, em familiares com resultado positivo e negativo para *ELISA* ($p=0,19$).

As correlações entre TGF- β e IL-12 e entre IL-10 e IL-12 foram estudadas entre os familiares em relação ao resultado do *ELISA*. A figura 4 (A), a seguir, mostra uma curva negativa na correlação TGF- β e IL-12 nos familiares pesquisados, ou seja, estas citocinas apresentaram aumento inversamente proporcional, a primeira diminuiu, ao passo que a segunda se elevou. Tal diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,0083$). Já a correlação entre IL-10 e IL-12 (figura

4-B), apresentou uma curva crescente, ou seja, ambas as citocinas aumentaram nos familiares em relação ao *ELISA*.

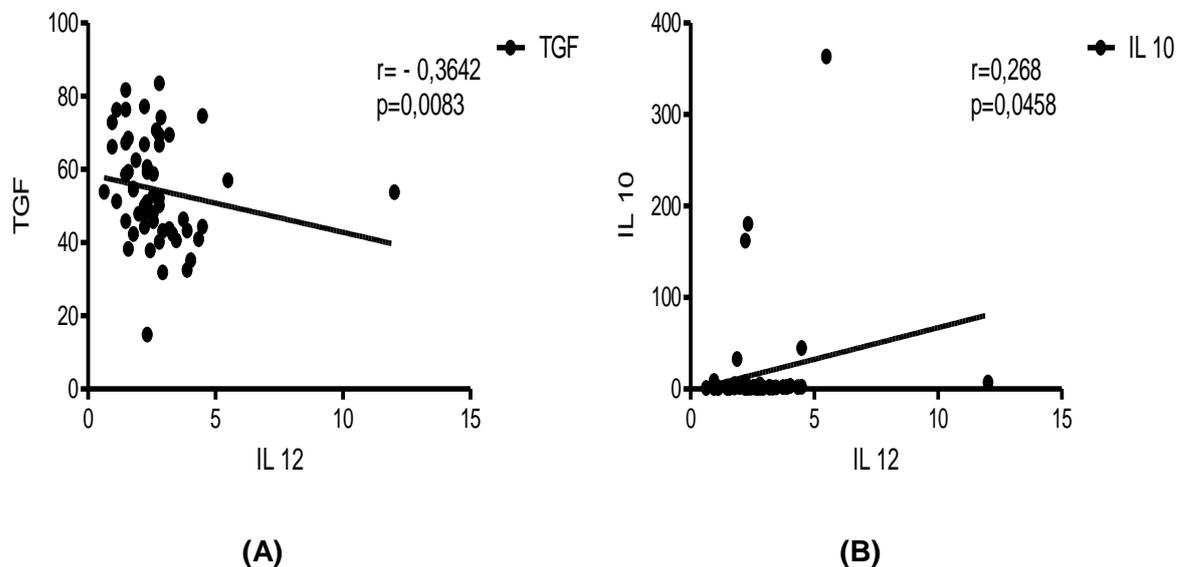


Figura 4 – Correlação entre citocinas e *ELISA*. **(A)**: Correlação entre os níveis de TGF-β e IL-12, na amostra total dos familiares com resultado do *ELISA*. **(B)**: correlação entre os níveis de IL-12 e IL-10, na amostra total dos familiares com resultado para *ELISA*.

A tabela 8, a seguir, resume os resultados das correlações na população total, nos indivíduos positivos e nos indivíduos negativos em relação ao *ELISA*.

Tabela 8 - Resumo das correlações IL-12/TGF-β e IL-12/IL-10, em relação ao resultado do *ELISA*. Segipe, Brasil – 2010 a 2012.

CITOCINAS	POPULAÇÃO TOTAL	POSITIVOS	NEGATIVOS
IL-12 / TGF-β			
CORRELAÇÃO	-0,34	-0,41	-0,22
P	0,008	0,042	0,23
IL-10 / IL-12			
CORRELAÇÃO	+0,27	+0,40	+0,13
P	0,04	0,05	0,46

Correlação de Spearman

7 DISCUSSÃO

Foram examinados 109 familiares de 40 pacientes que estavam em tratamento para leishmaniose visceral, com o objetivo de identificar os casos assintomáticos, bem como traçar o perfil clínico-epidemiológico desses indivíduos.

A identificação de portadores assintomáticos de *Leishmania* em VL está se tornando cada vez mais importante, por diferentes razões, incluindo a possibilidade de avaliar indivíduos assintomáticos como potenciais reservatórios do parasita, para determinar a eficácia de medidas de controle e avaliar o risco de transmissão por meio de doação de sangue ou transmissão vertical. Além disso, os casos que podem desenvolver a doença, especialmente entre pacientes imunodeprimidos, podem ser identificados precocemente.

Os testes utilizados para detecção dos casos assintomáticos foram Reação de Montenegro e sorologia por ELISA, considerando a positividade para um ou para ambos os testes. A frequência de familiares com resultados positivos foi de 58,7%. Isso significa que mais de metade dos familiares podem ter tido contato com o parasita e estavam em risco para desenvolverem a doença, fato preocupante, já que a LV é uma antroponose sistêmica grave que pode acarretar a morte de pacientes não tratados.

Em estudo com parentes e vizinhos de pacientes com LV, realizado em Monte Gordo e Barra do Jacuípe, na Bahia, D'Oliveira et al. (1997) mostraram que houve 39,7% de positividade para IDR e/ou sorologia. Já em Três lagoas – Mato Grosso do Sul, a porcentagem de assintomáticos foi de 36,4%, utilizando-se testes sorológicos (OLIVEIRA et al., 2008). Em Sobradinho, Distrito Federal, a prevalência de crianças e adolescentes assintomáticos, aferida pela intradermorreação de Montenegro foi de 33,3% (TAMAYO, 2010).

Estudos realizados na Bahia e Rio Grande do Norte encontraram 32% e 38%, respectivamente (CUNHA et al., 1995; JERONIMO et al., 2004). Fora do Brasil, pesquisas tem mostrado variações importantes, com valores desde 11% em doadores de sangue na Espanha (RIERA et al., 2004), até 77,1% em trabalhadores assintomáticos de um parque nacional no Sudão (IBRAHIM et al., 1999). Neste último, acredita-se que, por se tratar de uma área recente de infecção por *Leishmania*, exista suscetibilidade generalizada da população residente. A

positividade para IDRM no estudo de Moura et al. (2012) chegou a 71,3% e 9,7% para Elisa.

No que diz respeito à sintomatologia, os principais sinais e sintomas relatados na literatura para pacientes com leishmaniose visceral clássica são hepatoesplenomegalia, febre e aumento do volume abdominal (BRAGA, 2007; CASCIO et al., 2002; PASTORINO et al., 2002). Em nosso estudo foram pesquisados sinais e sintomas, alterações ao exame físico e alterações no hemograma, relacionado esses achados à positividade dos testes, no intuito de identificar algum possível caso de infecção subclínica, em meio a nosso objetivo principal que era a busca dos assintomáticos.

Os sinais e sintomas encontrados nesta amostra foram muito inespecíficos, já que os indivíduos que apresentaram febre e foram positivos (n=3), não tinham alterações ao exame físico e nem ao hemograma, no máximo associaram febre a náuseas e a palidez. Este último, talvez por ser um sinal mais subjetivo, foi encontrado em apenas um caso. Além disso, as febres relatadas não duraram mais que um dia e os próprios participantes relacionaram tal sintoma a um quadro gripal. Nenhum deles relatou diarreia, nem manifestações hemorrágicas.

Partindo da análise clínica, consideramos todos os indivíduos positivos como portadores de leishmaniose visceral assintomática. Todos os participantes da pesquisa foram orientados a retornar ao serviço de saúde, caso apresentassem qualquer alteração clínica, especialmente às diretamente relacionadas com a doença, como febre, aumento do volume abdominal, perda de peso acentuada. Nenhum deles retornou, até o final da pesquisa, sugerindo a evolução para cura espontânea.

Dos 40 pacientes em tratamento para LV, no Hospital Universitário, que foram o ponto de partida para a identificação dos assintomáticos, 40% tinham 15 anos de idade ou mais; 37,5% eram abaixo 6 anos e 22,5% tinham entre 6 e 14 anos.

A maioria dos estudos mostra que a faixa etária mais acometida pelo calazar é a de crianças menores de 6 anos (BADARÓ et al., 1986a; BRAGA, 2007; BRUSTOLONI, 2006; GOES; MELO; JERALDO, 2012; PASTORINO et al., 2002; SILVA, 2004; VÁZQUEZ, 2010; XAVIER-GOMES et al., 2009), fato que pode ser atribuído à imaturidade do sistema imune e maior exposição ao vetor no peridomicílio, por esta faixa etária (BRASIL, 2006b). O estudo de Moreno et al.

(2005) demonstrou que banhos ao ar livre e brincar fora de casa no período das 18 às 22h são fatores de risco em crianças, devido à maior exposição ao mosquito.

Já a proporção de pacientes assintomáticos aqui identificados foi maior na idade acima dos 14 anos. Badaró e colaboradores descreveram em Jacobina (BA) que a positividade para a intradermorreação de Montenegro aumenta a partir dos sete anos (BADARO et al., 1986b). No município de Raposa (MA), Caldas e colaboradores indicaram como ponto de corte associado a esta condição, a idade acima de 23 meses, mostrando que crianças em áreas endêmicas são infectadas precocemente (CALDAS et al., 2001). Em outro município do Maranhão, esta idade correspondeu a cinco anos, onde 56,7% das crianças e adolescentes foram positivos ao teste de Montenegro, frente a 35% abaixo desta idade ($p=0$). Em Teresina (PI) Werneck e colaboradores observaram que a positividade duplica depois dos dezanove anos em relação aos menores desta idade (WERNECK et al., 2002). Com relação à faixa etária, houve em nosso estudo maior frequência de positividade aos testes em indivíduos na faixa etária acima de 14 anos (51%), ou seja, esse grupo apresentou maior risco de infecção assintomática por *L. chagasi*. Em concordância, o estudo de Moura et al. (2012) em São Luís (MA) mostrou que um dos fatores associados com a infecção assintomática foi idade igual ou maior que 15 anos. Essa idade superior a outros estudos pode ser explicada pelo fato de a amostra ter sido de familiares de pacientes e não da população em geral. Esse achado pode indicar ainda que esse grupo de indivíduos é mais resistente à doença.

Embora o sexo feminino ter representado a maior parte da amostra, a maioria dos sujeitos com infecção assintomática foi do sexo masculino (61,9%). Estudos prévios indicam que mudanças hormonais podem influenciar a susceptibilidade para LV, já que a doença é mais prevalente em adolescentes depois da puberdade e em homens adultos (JERONIMO et al., 2004; NYLEN; SACKS, 2007). Já foi demonstrado, experimentalmente, que a testosterona aumenta a replicação do parasita (LIU et al., 2006).

Acredita-se também que o homem se expõe mais ao ambiente para fins laborais ou de lazer, aumentando assim a possibilidade de infecção pela *Leishmania* (GOUVÊA et al., 2007).

Assim como na infecção clássica, o sexo masculino apresentou maior frequência de infecção assintomática na presente pesquisa, levando a crer que os homens estão mais expostos a adquirir as diversas formas clínicas da doença.

No que se refere à localização geográfica das residências dos familiares, 61,9% localizavam-se na capital. Destes 43,8% apresentaram teste positivo. Nos participantes provenientes do interior (n=33) a frequência de positividade foi de 36,4%. É importante destacar o intenso processo de urbanização ocorrido a partir de meados da década de 80, onde a ocupação rápida e desordenada do meio urbano favoreceu a disseminação da doença, antes restrita à área rural (BOTELHO; NATAL 2009; GONTIJO, MELO 2004; MELO, 2011; TORRES, 2006).

Analisando-se a distribuição dos casos quanto à procedência, observou-se que tanto o número de pacientes, quanto o número de familiares da amostra estudada foi ligeiramente maior na capital Aracaju, 55% e 58,7%, respectivamente. Os casos-índices, bem como contactantes positivos apresentaram uma distribuição heterogênea nos bairros da capital, com maior concentração nas zonas norte e de expansão, localizadas mais na periferia da cidade, coincidindo com o boletim informativo do NVEH (set/ 2012). No estudo de Goes, Melo e Jeraldo (2012), 81,6% dos 38 bairros da capital apresentavam pelo menos um caso da doença. Provavelmente, devido à posição ocupada pelo HU-UFS, como instituição de referência para tratamento da LV, muitos pacientes (casos-índices) provinham também de vários municípios do interior de Sergipe e alguns, até mesmo, da Bahia. Quanto à distribuição no interior de Sergipe, os pacientes residiam principalmente nos municípios de Itaporanga d'Ajuda e Socorro e a maior frequência de positividade dos familiares ocorreu em Itaporanga, que está localizada a 29 Km de Aracaju. Novos estudos nessa região fazem-se necessários para melhor esclarecimento dos fatores de risco para a população desse local.

A maioria de casos de infecções clássica e assintomática procedentes da zona urbana com relação à zona rural reflete o processo de migração da LV para as áreas urbanas e periurbanas. Estes achados confirmam o fato de que a transmissão do calazar em áreas urbanas está se tornando cada vez mais comum, principalmente na periferia das grandes cidades onde as condições socioeconômicas são baixas, não há saneamento básico e a saúde é precária. Por outro lado, atualmente observa-se que com a urbanização, esta enfermidade está mudando seu comportamento, atingindo cada vez mais pessoas independentemente

de seu nível socioeconômico ou cultural (BRUSTOLONI, 2006), fato confirmado em nosso estudo pela presença desta doença e da infecção assintomática, em praticamente todas as zonas de Aracaju. Como o universo onde foi realizado o estudo é um hospital público, não pôde ser observada a ocorrência da LV nas classes mais abastadas.

Neste estudo, também foram analisados três fatores ambientais considerados de risco para infecção por *Leishmania*: presença de cachorro, galinheiro e madeira, no domicílio dos familiares.

Cachorros são considerados os maiores reservatórios peridomésticos. No estudo de Oliveira et al. (2008), a presença de cão na residência mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0.03$) para infecção por calazar. Gouvêa et al. (2007), mostrou que a presença de cachorro por um período igual ou superior a três anos esteve associada a um aumento na prevalência da infecção (26%), dado compatível com outro estudo realizado no Nordeste brasileiro por Caldas et al. (2001). Em contrapartida, uma pesquisa realizada em 2004 por Jeronimo e colaboradores, na mesma região, não foi possível definir se a presença do cachorro na residência era realmente um fator contribuinte para o aumento da infecção. Da mesma forma, em nosso trabalho não obtivemos resultados significativos, ao analisarmos esse fator, isoladamente. A explicação pode estar no fato de termos investigado somente as residências e não a vizinhança ou ainda, as informações obtidas dos familiares não condiziam com a realidade. Uma observação direta das casas, no momento da coleta de dados, poderia ter dirimido essas indagações.

Criação de animais nos quintais, especialmente galinhas, leva a uma abundância de fontes de alimentação que aumenta a densidade dos flebótomos numa área (ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996) aumentando, inclusive a infecção canina por *Leishmania* (MOREIRA et al., 2003). Na Bahia, observou-se que as casas de pacientes com LV, tem 4,21 mais probabilidades de ter galinhas nos quintais comparadas com as moradias sem casos da doença. Não foi possível, no presente estudo, associar a presença de galinheiro nos quintais com positividade aos testes aplicados. A pequena quantidade de galinhas nesses quintais, talvez não tenha sido suficiente para aumentar, consideravelmente, a quantidade de mosquitos transmissores. Outras situações presentes no ambiente, ou no próprio homem, podem estar contribuindo para a alta positividade dos testes.

A presença de restos de madeira tem sua importância no fato de as fêmeas do mosquito flebótomo, após o repasto sanguíneo, depositarem seus ovos em locais com pouca umidade e temperatura adequada à maturação desses ovos, como por exemplo, fendas, pedras, cascalhos, raízes e substrato orgânico (LAISON et al., 1990; MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008; YOUNG; ARIAS, 1992). Em nosso estudo, a presença de madeira mostrou associação significativa quando analisada com a presença simultânea do cão, na residência. Nesses ambientes deve haver maior quantidade de mosquitos infectados, levando também infecção ao cão e ao homem.

No que diz respeito aos níveis séricos das citocinas, houve diferenças significativas quando analisados TGF- β , sendo maior nos familiares negativos; IL-10 e IL-12, sendo maiores nos familiares positivos.

TGF- β tem efeito modulatório supressor sobre macrófagos e seu bloqueio foi encontrado como limitador da replicação do parasita nestas células (REED, 1999; ANDERSON et al., 2008). No presente estudo, os baixos níveis de TGF- β em indivíduos com infecção assintomática pode confirmar o efeito supressor que esta citocina ocasiona nos indivíduos com a doença. Uma vez que esses assintomáticos conseguiram controlar a replicação do parasita, tal citocina não teve destaque nessa população.

Por se tratar de um inibidor da ativação dos macrófagos, a produção elevada da IL-10 promove uma resposta inadequada do hospedeiro perante a invasão do parasito ao organismo, instalando-se assim a doença (Peruhype-Magalhães et al., 2005). Um estudo na Índia demonstrou que bloqueio em IL-10 tem efeito anti-parasitário em aspirado do baço de pacientes com LV (GAUTAM et al., 2011). Este resultado reforça, fortemente, o importante papel da IL-10, na patogênese da leishmaniose visceral e sugere que atingir a IL-10 seria um método eficaz para melhorar a terapia contra LV (KUMAR; NYLEN, 2012).

IL-12, que é produzida pelas células do sistema fagocítico mononuclear é importante para a indução da produção de IFN- γ , porque ele interage com as células NK e células-T. A IL-12 também desempenha um importante papel na iniciação e manutenção da resposta Th1 e na produção subsequente de IFN- γ (Ghalib et al., 1995). No entanto, estudos utilizando os soros de pacientes com LV do Irã (Khoshdel et al., 2009), sudeste da Etiópia (Hailu et al., 2005) e no Brasil (Caldas et al., 2005) mostraram níveis significativamente mais elevados de IL-12 em pacientes

com a doença ativa em relação à verificada em indivíduos assintomáticos e saudáveis.

Em contrapartida, no estudo de Costa et al. (2012) feito no Maranhão, níveis mais baixos de IL-12 foram observados em pacientes com LV ativa, em relação a pacientes assintomáticos e curados. Níveis basais de IL-12 foram detectados em pacientes com LV ativa da Índia (ANSARI et al., 2006) e Brasil (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005), sugerindo a ausência de ativação de linfócitos eficaz durante a doença ativa.

No presente estudo, encontramos níveis mais elevados de IL-10 e IL-12 nos indivíduos com infecção assintomática, em comparação com os que foram negativos aos testes de Montenegro e *ELISA*. Nesse caso, parece estar havendo um equilíbrio, já que a primeira citocina está relacionada com a instalação da doença e a última favorece o controle da infecção, sugerindo que o sistema imune desses indivíduos foi ativado, elevando os níveis de IL-12 e IL-10, simultaneamente e em proporções equilibradas, não permitindo a instalação da doença.

Além disso, a razão entre as citocinas mostrou que níveis de IL-12 foram maiores que TGF- β , nos positivos em relação aos negativos ao *ELISA*. Correlação negativa entre TGF- β e IL-12 e correlação positiva entre IL-10 e IL-12 foram encontradas. Tais resultados apontam para o fato de que, na população estudada, a citocina TGF- β pode ter um efeito supressor mais forte do que a IL-10, já que o aumento desta última não favoreceu o aparecimento de sintomas. Novos estudos com TGF fazem-se necessários para confirmar essa hipótese.

8 CONCLUSÕES

O presente trabalho evidenciou que a forma assintomática da Leishmaniose é a mais prevalente, sendo uma doença que apresenta disseminação crescente na área urbana.

A presença da infecção, determinada pela positividade ao Teste de Montenegro e Sorologia por *ELISA*, foi maior no gênero masculino e em indivíduos com 15 anos de idade ou mais.

Ao avaliar a presença de fatores de risco relacionados à positividade aos testes observou-se que a presença de cachorro e restos de madeira, simultaneamente, apresentou significância estatística.

A análise da resposta imunológica mostrou que há uma maior quantidade das citocinas IL-10 e IL-12 nos indivíduos com infecção assintomática (testes positivos) e uma menor quantidade de TGF- β , quando comparados aos familiares com testes negativos. Além disso, a razão IL-12 por TGF- β mostrou valores significativos nos indivíduos com infecção assintomática, em relação aos familiares negativos. Correlação positiva entre IL-12 e TGF- β e correlação negativa entre IL-10 e IL-12 foram encontradas tanto na população total estudada, quanto apenas nos indivíduos com infecção assintomática.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados dessa pesquisa mostram a necessidade de ações que permitam reduzir o risco de transmissão da leishmaniose visceral. A alta frequência de indivíduos com infecção assintomática por *Leishmania* chagasi mostra que a população está exposta a fatores que permitem que o parasita chegue até o organismo humano, aumentando a quantidade de pessoas com possibilidade de desenvolverem a doença.

Novos estudos, especialmente nos locais onde ocorreu maior positividade aos testes utilizados, levando-se em consideração a tríade vetor-hospedeiro-ambiente, poderão melhor elucidar características associadas à infecção pela *Leishmania*, para que, a partir desses resultados, sejam construídas estratégias eficazes para o combate à doença, seja controlando fatores ambientais, seja produzindo medicamentos e vacinas.

REFERÊNCIAS

ALVES, W.A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista (Bepa)**, São Paulo, v.6, n.71, p.25-29, 2009.

ANDERSON, C.F.; LIRA, R.; KAMHAWI, S. et al. IL-10 and TGF-beta control the establishment of persistent and transmissible infections produced by *Leishmania tropica* in C57BL/6 mice. **J. Immunol.**, v.180, p.4090–4097, 2008.

ANSARI, N.A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin- 10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala-azar. **Clin. Immunol.**, v.119, p.339–345, 2006.

ARIAS, J.R.; MONTEIRO, O.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.2, n.2, p 145-146, Apr./June 1996.

ASSIS, T. S. M. **Avaliação de diferentes abordagens para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana**. 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e parasitárias) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de pesquisas René Rachou, Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/4287/1/Tese_versao_final_T%C3%A1lia.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2013.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, p.24-34, 2005.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R. et al. A prospective Study of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area of Brasil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, out. 1986b.

BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. v. 2. p.1234-1259.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Inf. Dis.**, v. 154, p. 1003-1011, 1986a.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E. et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v.257, p.545–548, 1992.

BORGES, A. S.; MACHADO, A. A.; FERREIRA, M. S. et al. Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 6, p.713-719, nov./dez. 1999.

BORGES, V.C.; RUIZ, M.C.M.; GOMES, P.M.; et al. Intradermorreação de Montenegro após sucessivas repetições do teste em Porteirinha, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, n.2, p. 249-51, mar./abr. 2003.

BOTE.;;LHO, A.C.A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.42, n.5, p.503-508, set./out. 2009.

BRAGA, Alexandre Sérgio da Costa. **Fatores associados à evolução clínica da leishmaniose visceral em crianças hospitalizadas em centro de referência de Belo Horizonte, 2001 a 2005**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ECJS-7KLPJJ/alexandre_s_rgio_da_costa_braga.pdf?sequence=1 > Acesso em: 16 jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Normas e Manuais Técnicos. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2003. 120p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006a.

_____. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006b.

_____. SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo** /Coordenação Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves São Paulo: A Secretaria, 2006c.

_____. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

_____. Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. Superintendência de Vigilância em Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Protocolo de Vigilância Epidemiológica**, Manejo clínico e aspectos laboratoriais para Leishmaniose visceral. set. 2010b.

_____. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório de Situação – Sergipe**. 5 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRUSTOLONI, Y. M. **Leishmaniose visceral em crianças no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**: contribuição ao diagnóstico e ao tratamento. 2006. 144f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Rede Centro - Oeste UnB/UFG/UFMS, Campo Grande.

CALDAS, A.J.M.; SILVA, D.R.; PEREIRA, C.C. et al. Infecção por *L. chagasi* em crianças de uma área endêmica de LV em São Luiz do Maranhão, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.34, n.5, p.445-51, set./out. 2001.

CASCIO, A.; COLOMBA, C.; ANTINORI, S. et al. Pediatric visceral leishmaniasis in western sicily, Italy: a retrospective analysis of 111 cases. **European Journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v.21, n.4, p.277-282, 2002. Epub2002Apr13. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072938>>. Acesso em: 10 abr. 2013.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, Rio de Janeiro, v.50, p.221-222, 1936.

CHAISSON, R. E. et al. Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *Of J. Int. AIDS Soc*, v.12, Issue 1, p.29-33, 1 Jan. 1998.

COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, n.1, p.3-17, 2005.

COSTA, C.H.; STEWART, J.M.; GOMES, R. B. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.66, p.334–337, 2002.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C. et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan área of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 89, n..2, p. 155-158, mar./abr., 1995.

DANTAS-TORRES, R; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

D'OLIVEIRA, A.J.; COSTA S.R.M.; BARBOSA, A.B. et al. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n.1, p.15-20, jan./fev. 1997.

ELKHOURY, A. N. S. M. Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. 2006. p 24-26.

GOES, M. A. O.; MELO, C.M.; JERALDO, V. L. S. Série temporal da leishmaniose visceral em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil (1999 a 2008): aspectos humanos e caninos. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo, v. 15, n. 2, jun. 2012 .

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo, v.7, n.3, set. 2004.

GOUVÊA, M.V.; WERNECH, G.L; COSTA, C.H.N. et al. Factors associated to Montenegro skin test positivity in Teresina, Brazil. **Acta Tropica**, v.104, n.2-3, p.99-107, nov./dez. 2007.

GAUTAM, S., KUMAR, R., MAURYA, R.. (2011). IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 204, 1134–1137.

GHALIB, H.W., WHITTLE, J.A., KUBIN, M. (1995). IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *J. Immunol.* 154, 4623–4629.

IBRAHIM, M.E.; LAMBSON, B.; YOUSIF, A.O. et al. Kalazar in a high transmission focus: an ethnic and geographic dimension. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 6, p. 941-944, Dec. 1999.

JERONIMO, S.M.B.; DUGGAL, P.; BRAZ, R.F.. et al. An Emerging Peri-Urban Pattern of Infection with *Leishmania chagasi*, the Protozoan Causing Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. **Scandinavia Journal of Infectious Diseases**, v.36, p. 443-449, 2004.

JOSÉ, F.F.; SILVA, I. M. D.; ARAÚJO, M. I. et al. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.34, p.537-542, nov./dez. 2001.

KAFETZIS, D.A. An overview of paediatric leishmaniasis. **J Postgrad Med**, v.49, n.31, 2003. Disponível em: <<http://www.jpgmonline.com/text.asp?2003/49/1/31/930>>. Acesso em: 24 de maio 2013.

KURKJIAN, K.M.; MAHMUTOVIC, A.J.; KELLAR, K.L. et al. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry A**, v.69, p.353–358, 2006.

KUMAR R., NYLÉN S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, v3, n.251, p. 1-10, 2012.

LAISON, R.; DYE, C.; SHAW, J.J. et al. Amazonian visceral leishmaniasis distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.85, n.1, p.135-137, jan./mar. 1990.

MACHADO DE ASSIS, T.S.; RABELLO, A.; WERNECK, G.L. Predictive Models for the Diagnostic of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS Neglect Tropical Diseases**, v.6, n.2, fev. 2012.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, dez. 2008.

MEDEIROS, I.M.; CASTELO, A.; SALOMÃO R. Presence of Circulating Levels of Interferon , Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α in Patients with Visceral Leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 1, p.31-34, 1998.

MELO, L.C.S. **Estudo clínico para tratamento de pacientes com Leishmaniose visceral com n-acetilcisteína associada ao antimônio pentavalente**. 2011. Monografia (Graduação em 2011) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju.

MICHEL, G.; POMARES, C.; FERRUA, B. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. **Acta Trop**, v.119, p.69-75, 2011.

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 4, p. 365-368, jul./ago., 2008.

MOREIRA, ED Jr.; SOUZA, V. M.; SREENIVASAN, M. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **Am J Trop Hyg**, v. 69, n. 4, p. 393-397, Oct. 2003.

MORENO, E.C.; MELO M.N.; GENARO, O. et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38, n.6, p.456-63, nov.-dez. 2005.

MOURA, G. S.; SANTOS, A. M.; AQUINO, D. M. C.; SILVA, A. et al. Factors associated with asymptomatic infection in family members and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.28, n.12, p.2306 - 2314, dez. 2012.

MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p.1561-1577, 2005.

NYLEN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v.28, n.9, p.378-384, Sept. 2007.

- NYLEN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v.204, p.805–817, 2007.
- NUNES, W.S.; ARAÚJO, S.R.; CALHEIROS, C.M.L. Epidemiological profile of leishmaniasis at a reference service in the state of Alagoas, Brazil, from January 2000 to September 2008. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.4, p.342-345, 2010.
- OLIVEIRA, A.L.L; PANIAGO, A.M.M.; SANCHES, M.A. et al. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, p.2827-2833, dez. 2008.
- OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, A.C.; DORVAL, M.E.C. et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.43, n.2, p.188-193, mar./abr. 2010.
- PASTORINO, A.C.; JACOB, C.M.; OSELKA, G.W. et al. Aspectos clínicos e laboratoriais da Leishmaniose visceral. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.120-127, mar./abr. 2002.
- PEDROSA, C.M.S; ROCHA, E.M.M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.37, n.4, p.300-304, jul./ago. 2004.
- PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O.A.; PRATA, A. et al. Immune response in human visceral Leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.62, n.5, p.487-495, Nov. 2005.
- REED, S.G. TGF-beta in infections and infectious diseases. **Microbes Infect.**, v.1, p.1313–1325, 1999.
- RIERA, C.; FISA, S.; UDINA, M. et al. Detection of *Leishmania infantum* crypt infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 2, p. 102-110, feb 2004.
- ROBERTS, M.T.M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, v.75, p.115-130, 2006.
- ROSAS FILHO, M.S.; SILVEIRA, F.T. Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi em área endêmica de leishmaniose visceral no Pará. **Rev. Para. Med.**, Belém, v. 21, n. 3, Sept. 2007.

SAHA, S. et al. Immune responses in kala-azar. **Indian J Med Res**, v.123, p.245-266, 2006.

SAHA, S.; MONDAL, S.; RAVINDRAN, R. et al. IL-10-andTGF- beta-mediatedsusceptibilityinkala- azar andpost-kala-azardermmalleish- maniasis: thesignificanceofampho- tericinBinthecontrolof *Leishma- nia donovani* infection inIndia. **J. Immunol.**, v.179, p.5592–5603, 2007.

SALGADO-FILHO, N.; FERREIRA, T.M.A.F.; COSTA J.M.L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, n.2, p.217-221, mar./abr. 2003.

SILVA, J.N. **Estudo do teste rápido imunoenzimático através do antígeno recombinante rK39 para diagnóstico de leishmaniose visceral americana: Correlação Clínico-Terapêutica.** 2004. 112 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de medicina Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br:8080/ri/bitstream/123456789/1770/1/2004_dis_jnsilva.pdf. Acesso em: 20 fev. 2011.

SILVA, L.A.; ROMERO, H.D.; FAGUNDES, A. et al. Use of polymerase chain reaction for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania* infection in a visceral leishmaniasis-endemic area. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.55, n.2, p.101-104, 2013.

SILVA, L.A.; ROMERO, H.D; NASCENTES, G.A.N. et al. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, n.2, p.261-266, 2011.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, India, v.123, p.311-330, Mar. 2006. Disponível em: <<http://icmr.nic.in/ijmr/2006/march/0312.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2013.

SNIDER, H.; LEZAMA-DAVILA, C.; ALEXANDER, J. et al. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. **Neuroimmunomodulation**, v.16, n.2, p. 106-113, 2009.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA S. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, p.1–6, 2011.

STAUCH, A.; SARKAR, R.R.; PICADO, A. et al. Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent: Modelling Epidemiology and Control. **PLOS Neglect Tropical Diseases**, v.5, n.11. nov. 2011.

- STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest**, v.1, p.1301–1310, 2008.
- SUNDAR, S. et al. Circulating Thelper1 (Th1) cell-and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. **Am.J.Trop.Med. Hyg.** 56, 522–525, 1997.
- TAMAYO, C.O.C. **Caracterização e acompanhamento geo-referenciado do primeiro foco de transmissão de leishmaniose visceral humana em Brasília, Distrito Federal.** 2010. 175f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília-DF.
- TAVARES, L.M.S.A. Incidência, Distribuição Geográfica e Aspectos Ambientais das Áreas Endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.8, n.1, p.47-52, 1999.
- TORRES, F.D. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v.40, n.3, p. 537-41, 2006.
- URIAS, E.V.R. et al. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n5/7409.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2013.
- VÁZQUEZ, C. Características epidemiológicas y clínicas de la Leishmaniasis visceral en un servicio de pediatría. **Pediatría (Asunción)**, v.37, n.3, p.175-180, dez. 2010.
- WALTERS, L.L.; MODI, G.B.; CHAPLIN, G.L. et al. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Am J Trop Med Hyg**, v. 41, n. 3, p. 295- 317, Sept. 1989.
- WERNECK, G.L.; RODRIGUES, L.; SANTOS, M.V. et al. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 83, n. 1, p. 13-18, July 2002.
- WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis:** report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva. Mar. 2010. p.22-26.
- XAVIER-GOMES, L.M. et al. Características clínicas e epidemiológicas da Leishmaniose Visceral em crianças internadas em um Hospital Universitário de referência no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 4, n. 12, p.549-555, dez. 2009.
- YOUNG, D.G.; ARIAS, J.R. **Flebótomos:** vectores de leishmaniasis en Las Americas. Washington DC, USA: Pan American Health Organization, 1992.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA
CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO CARDOSO NASCIMENTO JR.
Rua Cláudio Batista s/n, Didática V, Bairro Sanatório
CEP: 49060-100 Aracaju/SE
Fone: (79) 3218-1805
E-mail: cephu@ufs.br

Nome do Projeto: Perfil clínico e imunológico de familiares de pacientes com leishmaniose visceral.

NOME DO PACIENTE: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Este documento explica um estudo de pesquisa e pede a sua permissão para o(a) senhor(a) ou seu (sua) filho(a) participar desta pesquisa. Se o(a) senhor(a) for pai/mãe ou guardião de uma criança abaixo de 18 anos, que foi convidado a participar desta pesquisa, a palavra “você” neste documento se refere ao seu filho. Ao final da explicação, pediremos ao senhor(a) para assinar este documento, caso concorde em participar desta pesquisa.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar familiares de pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral que foram ou são atendidos no Hospital Universitário. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os familiares desses pacientes serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento.

Participação voluntária: Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você estiver recebendo no Hospital Universitário.

Finalidade do estudo: Identificar indivíduos assintomáticos que residem no mesmo ambiente de pacientes com leishmaniose visceral através da resposta ao teste de Montenegro, avaliando também a prevalência desses indivíduos e também a resposta imune celular para antígenos recombinantes de *L Chagasi*.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

Procedimento: Será retirado por punção venosa, 20 ml de sangue, que ao deve levar a riscos para sua saúde, podendo apresentar dor discreta no local da punção. A intradermoreação de Montenegro será aplicada no seu braço e é o mesmo procedimento de quando você toma uma vacina e também não é prejudicial para sua saúde.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O melhor conhecimento sobre o leishmaniose visceral poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento para leishmaniose, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com o seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço consta no início deste consentimento.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter o parasito que causa esta doença armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

_____	_____	_____
Assinatura ou impressão do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Nome/Assinatura do pesquisador	Data	Hora
_____	_____	_____
Nome/Assinatura da testemunha	Data	Hora

APÊNDICE B - Formulário de Consentimento para Menores

Nome do Projeto: Perfil clínico e imunológico de familiares de pacientes com leishmaniose visceral.

NOME DO PACIENTE: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar familiares de pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral que foram ou são atendidos no Hospital Universitário. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os familiares desses pacientes serão convidados a participar do estudo. Caso os pais ou responsáveis decidam por sua participação no estudo, eles assinarão este consentimento.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico lhe fará exames que não causarão dor. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de uma colher de sopa) de seu braço, usando uma seringa e agulha. Algumas vezes, nós faremos um teste na pele, onde injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço, usando uma agulha fina.

Você pode ou não participar deste estudo. Se você quiser participar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho,

_____ Data _____ hora _____

Assinatura ou impressão do paciente

_____ Data _____ hora _____

Assinatura ou impressão do responsável

_____ Data _____ hora _____

Testemunha

_____ Data _____ hora _____

Investigado

APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO

CASO ÍNDICE:			
1. IDENTIFICAÇÃO DO FAMILIAR			
NOME:			
APELIDO:			
RELAÇÃO COM CASO ÍNDICE: MÃE PAI IRMÃO/IRMÃ TIO/TIA AVÔ/AVÓ OUTRO: _____			
ENDEREÇO:			
PONTO DE REFERÊNCIA:			
PRESENÇA DE ANIMAL NA RESIDÊNCIA: SIM NÃO <input type="checkbox"/> Qual? <input type="checkbox"/> _____ Em caso de galinheiro, especificar a proximidade com a residência _____			
CIDADE:		TELEFONE:	
BAIRRO:		IDADE:	
DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____		SEXO: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	
PROFISSÃO:		NATURALIDADE:	
2. ANAMNESE			
	SIM	NÃO	Especificar o tempo
FEBRE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
FADIGA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
PERDA DE PESO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
NÁUSEAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
PALIDEZ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
DIARRÉIA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
MANIFESTAÇÕES HEMORRÁGICAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
OUTROS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
PRESENÇA DE ANIMAL NA RESIDÊNCIA:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	QUAL: _____ _____
PRESENÇA DE RESTOS DE MADEIRAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

3. EXAME FÍSICO:

Temperatura (°C) _____ Peso: _____

Palidez _____

Linfonodos _____

Fígado

-Consistência _____

- Tamanho _____

Baço

-Consistência _____

- Tamanho _____

4. EXAMES LABORATORIAIS:

EXAMES	
Hemácias	
Hb	
Ht	
Plaquetas	
Leucócitos	
Neutrófilos	
Eosinófilos	
Monócitos	
Albumina	
Globulina	
Reação de Montenegro	
Sorologia para Calazar	