JOSÉ ANGELO BARLETTA CRESCENTE

**Estudo seccional sobre o espectro clínico e
imunológico da infecção humana por *Leishmania (L.)*
i. chagasi na Amazônia brasileira**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo
Pereira Corbett

São Paulo
2008

Dedico à,

Ralph Lainson

Carlos Corbett

Fernando Silveira

À Minha família

Papai (in memorian), Mamãe

Maria de Fátima, Angelo Jr., Bruna

Ana Lúcia, João Carlos, Fabrício, Fabiana, Carlane, Cláudio

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett, orientador, grande amigo.

Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira, amigo, parceiro de trabalho.

Aos membros do Instituto de Medicina Tropical da UFPA.

Aos colegas do antigo Departamento de Medicina Tropical da UFPA.

Às Sr^{as}. Sonia Gonzaga, Maria de Lourdes Amarantes, Maria Assumpção Silva.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Laurentti, Prof^a. Dr^a Cláudia Gomes, Sr^a Lia Negrão, Pós graduandos Tadeu, Felipe e Carol, funcionários Thayse e Edson, pela convivência harmoniosa, profícua e fraterna durante o período que estivemos juntos no Laboratório LIM 50-USP.

Ao jovem talento da informática Bruno Gallo responsável pela montagem computadorizada da tese.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação;

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Considerações Gerais.....	2
1.1.1 Histórico.....	2
1.1.2 Epidemiologia.....	3
1.1.3 Fisiopatologia.....	7
1.1.4 Formas Clínicas.....	9
1.1.5 Diagnóstico.....	11
1.2 Perfil Clínico Imunológico Métodos Imunodiagnósticos.....	12
1.3 Leishmaniose Visceral Americana no Estado do Pará.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Tipo de estudo.....	20
3.2 Descrição da área.....	20
3.3 População do estudo.....	24
3.4 Técnica de Estudo.....	24
3.5 Critérios para identificação da infecção humana.....	25
3.6 Disposições técnicas.....	26

3.7	Análise estatística.....	27
3.8	Aprovação pelo Comitê de Ética.....	28
4.	RESULTADOS.....	30
4.1	Taxas de prevalência de infecção humana por <i>L. (L.) i. chagasi</i> no vilarejo de Santana do Cafezal.....	30
4.2	Frequências da infecção humana por <i>L. (L.) i. chagasi</i> no vilarejo de Santana do Cafezal de acordo com sexo e idade.....	31
4.3	Especificidade da RIM e RIFI.....	32
4.4	Avaliação clínico-imunológica de infecção humana por <i>L. (L.) i. chagasi</i> no vilarejo de Santana do Cafezal.....	34
5.	DISCUSSÃO.....	39
6.	CONCLUSÕES.....	49
7.	REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Países endêmicos para leishmaniose visceral.....	3
Figura 2	Incidência da leishmaniose visceral no Brasil.....	4
Figura 3	Focos de leishmaniose visceral no Pará registrados de 1934-1982.....	6
Figura 4	Distribuição da LVA nos municípios do Estado do Pará.....	7
Figura 5	Resposta mediada por linfócitos T.....	8
Figura 6	Forma sintomática de leishmaniose visceral americana.	10
Figura 7	Forma sintomática de leishmaniose visceral americana com caquexia.....	10
Figura 8	Forma subclínica oligossintomática de leishmaniose visceral americana.....	11
Figura 9	Posição geográfica de Belém e Barcarena.....	16
Figura 10	Tipos comuns de moradia rural.....	21
Figura 11	Posto de saúde de Bacabal.....	22
Figura 12	Porto de Bacabal, entrada para Barcarena PA.....	22
Figura 13	Moradia com área de subsistência.....	23
Figura 14	Animais domésticos em abrigos ao redor de moradia.....	23
Figura 15	Reação Intradérmica de Montenegro	25
Figura 16	Reação de Imunofluorescência Indireta	25
Figura 17	Taxas de prevalência por RIM, RIFI, RIM+RIFI.....	31
	Distribuição da frequência da infecção humana por	32

Figura 18	<i>Leishmania (L.) i. chagasi</i> na localidade Santana do Cafezal, Barcarena, Pará, segundo a faixa de idade.....	
Figura 19	Distribuição da freqüência das Reações Intradérmicas de Montenegro (RIM), segundo os intervalos das reações (mm).	33
Figura 20	Distribuição da freqüência das Reações de Imunofluorescência indireta (RIFI), segundo os intervalos das reações sorológicas (IgG).....	34
Figura 21	Distribuição da freqüência dos perfis clínico-imunológicos relativos à infecção humana por <i>Leishmania (L.) i. chagasi</i> na localidade Santana do Cafezal, Barcarena, Pará.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escala de resultados semiquantitativos para RIFI e RIM.....	26
Tabela 2	Espectro clínico e imunológico da infecção humana por <i>Leishmania (L.) i. chagasi</i> na Região Amazônica Brasileira.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA	Ensaio Imunoenzimático
IA	Infecção Assintomática
IFN γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
III	Infecção Inicial Indeterminada
IL	Interleucina
IOS	Infecção Oligossintomática
IRS	Infecção Resistente Subclínica
IS	Infecção Sintomática
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RIM	Reação Intradérmica de Montenegro
SFM	Sistema Fagócito Mononuclear
Th 1	Linfócito T subtipo 1
Th 2	Linfócito T subtipo 2
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa

RESUMO

Crescente JAB. Estudo seccional sobre o espectro clínico e imunológico da infecção humana por *Leishmania (L.) i. chagasi* na Amazônia brasileira [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 60p

A dinâmica da leishmaniose visceral humana na Amazônia brasileira é pouco conhecida e nos últimos anos tem aumentado a incidência da doença principalmente no Estado do Pará. Os objetivos do estudo foram: I) identificar indivíduos com infecção sintomática e/ou assintomática por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, II) estudar os dois tipos de infecção, tanto clínica quanto imunologicamente, e III) estudar a taxa de prevalência da infecção. O estudo foi de corte transversal com 946 indivíduos de ambos os sexos, com idade a partir de 1 ano, vivendo em área endêmica de leishmaniose visceral americana (LVA), município de Barcarena, Pará, Brasil. Para o diagnóstico da infecção, foram usadas a reação dérmica de hipersensibilidade retardada (Reação Intradérmica de Montenegro) - RIM e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Foram diagnosticados 120 casos de infecção com taxa de prevalência de 12.6%; 8 casos mostraram alta soro-reatividade (1.280 a 120.240) IgG utilizando-se o teste da RIFI e nenhuma reação na RIM; 4 casos foram típicos de LVA e outros 4 casos de infecção subclínica oligossintomática. Os dois métodos imunológicos

usados simultaneamente com o exame clínico permitiram a identificação de 5 perfis clínico-imunológicos: Infecção Assintomática (IA) 73,4%; Infecção Subclínica Resistente (ISR) 15%; Infecção Subclínica Oligossintomática (ISO) 3%; Infecção Sintomática (IS=LVA) 3% e, Infecção Inicial Indeterminada (II) 5%.

Descritores: 1. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*; 2. Infecção humana; 3. Estudo seccional; 4. Espectro clínico-imunológico; 5. Epidemiologia.

SUMMARY

Crescente JAB. A cross study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) i. chagasi* infection in the Brazilian amazon. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 60p.

The dynamic of the human visceral leishmaniasis in the Amazon region is not well known and the incidence of the diseases in the last years have increase mainly in the Para state. The objectives the study were I) to identify individuals with symptomatic and/or asymptomatic infection due to *Leishmania (L.) i. chagasi*, II) to study the two types of infection, both clinically and immunologically, and III) to study the prevalence rate of infection. This was a cross-sectional study with a cohort of 946 individuals, of both sexes, with age from one year old onward, living in an endemic area of American Visceral Leishmaniasis (AVL), municipality of Barcarena, Pará State, Brazil. For the diagnosis of infection, the delayed hypersensitivity skin reaction (LST) and the indirect fluorescent antibody test (IFAT) were used. One hundred twenty cases of infection were diagnosed, with a prevalence rate of 12.6%; 8 cases showed high seroreactivity (1.280 to 10.240, IgG) in IFAT and no reaction in the LST; 4 cases being of typical AVL and other 4 cases of subclinical oligosymptomatic infection. The two immunological methods used simultaneously, with the clinical examination enabled to

identify 5 clinical-immunological profiles: Asymptomatic Infection (AI) 73.4%; Subclinical Resistant Infection (SRI) 15%; Subclinical Oligosymptomatic Infection (SOI) 3%; Symptomatic Infection (SI=AVL) 3% and, Indeterminate Initial Infection (III) 5%.

Descriptors: 1.*Leishmania(L.) infantum chagasi*; 2.Human infection; 3.Cross-sectional studies; 4.Clinical and immunological spectrum; 5.Epidemiology.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

1.1.1 Histórico

O parasita foi descrito inicialmente como corpúsculos arredondados intracelulares até então desconhecidos, em material obtido de necropsia de um soldado britânico doente há sete meses, proveniente da Índia, com disenteria, febre, esplenomegalia e caquexia (Leishman 1903). Estes parasitas eram semelhantes aos parasitas descritos alguns meses após, em punção esplênica de jovem com quadro clínico semelhante na Índia (Donovan 1903). Este parasita tinha como característica a presença de um núcleo e de uma pequena estrutura arredondada chamada de cinetoplasto e foi denominado neste mesmo ano de *Leishmania donovani* (Ross 1903). O primeiro registro nas Américas foi de Migone em 1913, no Paraguai, que descreveu *Leishmanias* de paciente procedente do Mato Grosso no Brasil.

Posteriormente, Penna em 1934, a partir de um estudo de febre amarela no Brasil, identificou 41 casos positivos de *Leishmania* em lâminas de viscerotomia *pós-mortem*, de indivíduos oriundos das Regiões Norte e Nordeste. Em 1937 Cunha e Chagas descrevem o parasita no Brasil, suas peculiaridades, diferenças do descrito na Índia e denominam o novo agente infeccioso de *Leishmania chagasi*.

1.1.2 Epidemiologia

A doença ocorre de forma endêmica em 61 países, abrangendo quatro continentes, América, Europa, África e Ásia (Figura 1). A estimativa global é de cerca de 500 mil novos casos por ano da forma visceral da leishmaniose. A doença é considerada um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, e um preocupante fenômeno de urbanização da doença, agravado com o registro da doença em áreas não endêmicas. (Desjeux P, 2001).

Figura 1: Países endêmicos para leishmaniose visceral.
(Fonte: World Health Organization, WHO, 2003)

No continente americano, o Brasil responde pela grande maioria dos casos registrados de leishmaniose visceral, distribuídos nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, e pela ocorrência freqüente de surtos da doença. Inicialmente era limitada às áreas rurais e a pequenas localidades

urbanas. Nos últimos anos o registro de casos novos da doença no Brasil aumentou, se expandindo para áreas periurbanas e urbanas de grande contingente populacional, com maior incidência no Nordeste com aproximadamente 70%, onde tem apresentado declínio. Observa-se, no entanto curva ascendente nas regiões Sudeste, Norte e região Centro-Oeste. O Brasil tem registrado uma média anual de 3.156 casos (Figura 2). Mais freqüente em crianças menores de 10 anos (54,4%) com destaque para a faixa etária menor de 5 anos (41%). O sexo masculino é proporcionalmente o mais acometido (60%). A partir de 1994 até 2002 a taxa de letalidade de LVA teve um acréscimo de 3,9% para 7,3% o que representa um aumento positivo de 86,2%. (Ministério da Saúde/FUNASA, 2002).

Figura 2: Incidência da leishmaniose visceral no Brasil.
(Fonte: Brasil, 2003)

Na região amazônica há casos notificados nos Estados de Roraima e Pará. Das amostras obtidas por Penna em 1934 os três casos positivos da região Norte, eram de indivíduos do município de Mojú na região nordeste do Estado do Pará. A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma protozoonose de canídeos silvestres (Deane & Deane, 1955, Lainson et al. 1969; Silveira et al., 1982) determinada pela *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (Lainson e Shaw, 1987), tem o cão doméstico como responsável pela manutenção do ciclo da doença no ambiente domiciliar e como transmissor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lainson et al., 1985; Lainson et al., 1990; Silveira et al., 1997).

Em 1937 Deane e Deane, relatam observações dos aspectos clínicos de casos de leishmaniose visceral diagnosticados nas cidades de Abaetetuba e Mojú.

Em 1938 Chagas et al., publicaram um detalhado relatório sobre suas observações epidemiológicas, tendo ali registrados 8 casos de leishmaniose visceral humana, assim como infecções em 7 cães, concluindo no relato que a doença ocorre no Pará de forma esporádica sem evidências de manifestações cíclicas, essencialmente rural e restrita a áreas de terra firme, que ficam próximas a floresta. Os cães e menos freqüentemente o homem, eram ocasionalmente infectados, mas não tinham papel importante na manutenção da infecção na natureza, embora o cão pudesse servir como fonte secundária da infecção para o homem. O ciclo que ocorre na mata indicava a existência de um reservatório silvestre, possivelmente um canídeo ou roedor como a fonte natural da infecção, e foi posteriormente identificada

1. INTRODUÇÃO

a raposa *Cerdocyon thous* (Silveira et al.1982). O parasito *L.(L.) chagasi*, recentemente foi sugerida sua denominação de *Leishmania (Leishmania) i. chagasi*, como agente patogênico da leishmaniose visceral americana (Lainson e Shaw 2005).

Outros casos esporádicos da doença foram registrados, todos igualmente concentrados no nordeste do Estado. Em 1962, Alencar, registraram 3 casos em Santarém no oeste do Estado a 700 km distante dos focos até então registrados. Até 1982 há registros de 35 casos de leishmaniose visceral na Amazônia, todos no Pará em área litorânea do Estado (Lainson et al, 1986) (Figura 3).

Figura 3: Focos de leishmaniose visceral no Pará registrados de 1934-1982

Nos últimos cinco anos há registros de 235 novos casos, ocorrendo de forma autóctone em mais de vinte e cinco municípios do Estado,

concentrados principalmente no nordeste do Estado, o maior índice de registros da doença desde o primeiro relato no Estado. (SESPA 2004) (Figura 4)

Figura 4: Distribuição da LVA nos municípios do Estado do Pará. (Fonte: SESPA, 2004)

1.1.3 Fisiopatologia

A infecção humana pela *L. (L.) i. chagasi*, agente da LVA, tem seu início logo após a inoculação das formas promastigotas na pele, o que acontece através da picada da fêmea dos insetos flebotomíneos, vetores dos parasitos. A partir desse momento, inicia-se um processo de escape do parasito frente aos fenômenos locais de defesa do organismo; sistema do complemento, eosinófilos e neutrófilos, quando o parasito escapa, penetra nas células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), principalmente o

macrófago. Ao serem fagocitados transformam-se em formas amastigotas, e sua sobrevivência dependerá de sua capacidade de resistir aos mecanismos resultantes da ativação do macrófago, principalmente dependente da resposta imune mediada por células T, que resulta na estimulação das subpopulações dos linfócitos T CD4⁺ (Th1 e Th2), que produzirão linfocinas, como interleucina 2 (IL-2), interferon gama (INF- γ), que quando liberadas irão regular positivamente os mecanismos parasitocida dos macrófagos destruindo os parasitas (pólo de resistência) ou as interleucinas (IL-4, IL-5, IL-10), que facilitarão a multiplicação parasitária, (pólo de susceptibilidade). (Carvalho et al.,1988; Awashi et al.,2004; Malla e Mahajan, 2006) (Figura 5)

Figura 5: Resposta mediada por linfócitos T

A resposta humoral mediada pelos linfócitos B ativa plasmócitos determinando produção de anticorpos policlonais, resultando em hipergamaglobulinemia. Estes eventos (celular e humoral) definem a

patogenia da doença e as alterações morfológicas resultam do acometimento progressivo e proeminente do SFM, levando à hipertrofia, hiperplasia e intenso parasitismo de macrófagos. Ocorre, também, participação reativa do interstício dos diferentes órgãos, com modificação de seus componentes celulares, da matriz extracelular e com o aparecimento de infiltrado mononuclear, que com dilatação e congestão dos seios venosos, determinam o aumento do volume e do peso dos órgãos atingidos. (Prata A, Silva LA 2005.)

1.1.4 Formas Clínicas

A infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* se apresenta com manifestações clínicas bem diferenciadas variando das formas clássicas da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) até com formas Assintomáticas (IA). Entre essas duas situações ditas polares, existe um estágio clínico intermediário, denominado Infecção Subclínica Oligossintomática (ISO). (Pearson e Sousa, 1996, Gama et al. 2004)

Após um período de incubação médio de 2 a 4 meses a forma clássica, tem na maioria das vezes um início insidioso, com febre intermitente irregular, hepatomegalia, esplenomegalia, aumento do volume abdominal, progressiva alteração do estado geral, emagrecimento, palidez cutânea e mucosa, diarreia, tosse seca, fenômenos hemorrágicos. Com a longa duração do quadro a sintomatologia se agrava com caquexia e morte (Figura

6 e 7). As formas subclínicas evoluem de forma frustra, com febrícula, diarreia, tosse seca, sudorese, adinamia e discreta hepatoesplenomegalia e tendem a evoluir para a cura espontânea (Figura 8).

Figura 6: Forma sintomática de leishmaniose visceral americana (Fonte: Arquivo pessoal Prof. Corbett)

Figura 7: Forma sintomática de leishmaniose visceral americana com caquexia. (Fonte: Arquivo pessoal Prof. Corbett)

Figura 8: Forma subclínica oligossintomática de leishmaniose visceral americana.

(Fonte: Arquivo pessoal Prof. Corbett)

1.1.5 Diagnóstico

Na LVA o emprego de provas laboratoriais depende principalmente do tempo de infecção e da resposta imune do hospedeiro humano e, dessa forma, não são detectadas alterações significativas tanto nos exames laboratoriais específicos e inespecíficos.

Tradicionalmente utilizam-se provas parasitológicas de identificação do agente, utilizando-se material colhido por punção aspirativa de medula óssea ou baço, e o parasita é visualizado diretamente em esfregaço ou através de cultura em meio específico.

Provas imunológicas, tanto celular como humoral podem ser avaliadas, com elevação de imunoglobulinas, sobretudo IgG, níveis elevados de TNF- α , teste de hipersensibilidade retardada, a reação Intradérmica de Montenegro (RIM), avaliação de resposta de linfócitos T com elevação de IL-10, IL-5 e IL-

4, baixa expressão de IFN- γ e IL-2, os testes sorológicos, principalmente os de ELISA (Ensaio imunoenzimático) e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta), além das técnicas de biologia molecular.(Prata A, Silva LA 2005.)

1.2 Perfil Clínico Imunológico - Métodos Imunodiagnósticos.

Atualmente há muita discussão sobre a interação entre espécies visceralizantes de *Leishmania* e a resposta imune humana, e sobre o repertório dos mecanismos imunológicos responsáveis pelas manifestações clínicas que resultam dessa interação. Os métodos imunodiagnósticos são os melhores e mais utilizados na prática diária para avaliar a resposta imune humana contra infecção por *Leishmania* e auxiliar na avaliação epidemiológica da infecção. Em geral, dois tipos de testes têm sido escolhidos: a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) ou Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para avaliação da resposta imune humoral (resposta imune CD4⁺ Th2) e o teste Intradérmico de Montenegro (RIM) para a resposta de hipersensibilidade do tipo retardado (resposta imune CD4⁺ Th1). A maioria dos autores tem usado em seus ensaios apenas um tipo de teste imunodiagnóstico para avaliar ou a resposta humoral ou a celular, o que dificulta a abordagem mais ampla da resposta imune. Com o pretexto de ilustrar estas situações, é importante mencionar alguns estudos feitos na África, especialmente no Sudão (Zijlstra et al. 1994, Khalil et al. 2002) e na Etiópia (Ali e Ashford 1993, 1994a,b), relatando a epidemiologia,

as manifestações clínicas e a imunologia da infecção humana causada por *Leishmania (Leishmania) donovani*, usando ou RIM para explorar a hipersensibilidade do tipo retardado, ou RIFI ou ELISA para investigar a resposta pela detecção de anticorpo. Em alguns países asiáticos, como Índia (Sundar 2003) e Nepal (Schenkel et al. 2006), onde é alta a prevalência de leishmaniose causada por *L. (L.) donovani*, foram usadas abordagens imunológicas semelhantes as da África para compreender os aspectos da doença humana. Em países mediterrâneos da Europa, como a Itália (Pampiglione et al. 1975), Espanha (Garrote et al. 2004) e Grécia (Papadopoulou et al. 2005) onde *Leishmania (Leishmania) infantum*. *infantum* causa leishmaniose visceral humana, as investigações imunológicas da infecção humana utilizou a associação dos testes intradérmico e de anticorpos. Na América do Sul, onde o Brasil concentra a maior incidência de LVA, por *L. (L.) i. chagasi*, poucos estudos relatam a epidemiologia e o perfil clínico-imunológico da infecção e são baseados em testes isolados e quando associados são analisados em crianças. (Badaró et al. 1986a,b, Reed et al. 1986, Holaday et al. 1993, Jerônimo et al. 2000, Gama et al. 2004, Nascimento et al. 2005). Assim o resultado foi que as manifestações clínicas encontradas foram prontamente associadas a cada uma das três formas clínicas de infecção já conhecidas: infecção assintomática, infecção subclínica oligossintomática e infecção sintomática.

É bem possível, entretanto, que este tipo de abordagem pode ter desconsiderado alguma informação clínica ou imunológica associada à resposta de hipersensibilidade imune de indivíduos infectados que vivem na

área endêmica.

1.3 Leishmaniose Visceral Americana no Estado do Pará

A razão da expansão da LVA no Estado do Pará nos últimos anos deve-se a um conjunto de fatores, entre eles; o aumento demográfico, o desmatamento desordenado, que culmina com a invasão do ambiente peri-domiciliar pelo flebotomíneo *Lu. longipalpis*; a presença de grandes populações do cão doméstico nas áreas endêmicas, altamente susceptível à infecção pela *L. (L.) i. chagasi*, contribuindo para a manutenção do ciclo peri-domiciliar da endemia; a migração de populações não imune de outras regiões; desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e, finalmente, a sensibilização das equipes de saúde quanto a inclusão da suspeita diagnóstica de LVA em indivíduos febris, principalmente crianças de área endêmica (Lainson, 1988, 1989).

No entanto a notificação como em outras áreas do Brasil é deficitária, dificultando a identificação de novos casos, principalmente os casos recentes que respondem melhor à terapia específica. Outra dificuldade é a falta da definição clínica e laboratorial da forma subclínica oligossintomática. Nesta os sinais e sintomas são imprecisos confundidos principalmente com outras doenças infecciosas. As provas laboratoriais inespecíficas nesta fase são de pouca utilidade e os testes sorológicos são sempre positivos. Portanto, achamos importante e de fundamental importância reconhecer e

acompanhar regularmente estes pacientes principalmente em área endêmica, já que não existe orientação da notificação dos casos subclínicos oligossintomáticos (Brasil, 2005), ressaltando, também, que cerca de 25% deles podem evoluir para forma clássica da LVA (Badaró et al, 1986b).

Neste momento o Ministério da Saúde, também, mudou sua estratégia de controle da infecção priorizando os municípios silenciosos, sem ocorrência de casos, visando minimizar ou evitar os problemas referentes ao agravamento em outras áreas (Brasil, 2003). Então, são necessárias ações conjuntas de municípios e Estados que convivem mais tempo com a endemia, identificando suas características epidemiológicas e implantando ações de vigilância e controle voltadas às necessidades regionais.

O agravamento epidemiológico com o aumento da ocorrência de LVA no município de Barcarena, de forma crescente e sistemática, nos últimos anos (Sespa, 2003); riscos de urbanização e Peri-urbanização para outros municípios e para a capital do Estado, Belém (distante 20 km direto), intenso fluxo migratório pela instalação de grandes projetos industriais, e fazer parte de um importante eixo hidro-rodoviário do Estado, foi levado em conta para a escolha do local do estudo. Considerando que existem escassas informações da interação entre infecção humana por *L.(L.) i. chagasi* e a resposta imune na região Amazônica Brasileira (Silveira 1997, Lainson e Shaw 2005), procuramos estabelecer parâmetros específicos, de fácil constatação na prática diária, principalmente, no sentido de auxiliar as equipes de saúde da área endêmica, quanto ao diagnóstico, seguimento e, também, a intervenção terapêutica precoce para esse problema de saúde

pública. Para isso, realizamos um estudo de corte seccional para caracterização clínica e imunológica da infecção pela *L.(L.)i. chagasi*, combinando os dois tipos de resposta imune, avaliadas por RIM e RIFI, em Barcarena antigo foco endêmico de LVA, na localidade de Santana do Cafezal, nordeste do Estado do Pará.(Figura 9)

Figura 9: Posição geográfica de Belém e Barcarena.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterização clínica e imunológica da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* na localidade Santana do Cafezal, município de Barcarena, Estado do Pará.

2.2 Específicos

Identificar, através da RIM e RIFI, indivíduos portadores da infecção sintomática e /ou assintomática por *L. (L.) i. chagasi*;

Determinar as taxas de prevalência da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* na localidade, usando simultaneamente a RIM e RIFI;

Comparar as taxas de prevalência da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* através da RIM e da RIFI;

Determinar o perfil clinico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Esta investigação baseou-se em estudo epidemiológico do tipo seccional, que avaliou uma coorte de 946 indivíduos, residentes em área endêmica de leishmaniose visceral na localidade Santana do Cafezal, município de Barcarena, ao norte do Estado do Pará, no período de setembro a dezembro de 2003.

3.2 Descrição da área

A localidade Santana do Cafezal às margens do rio Cafezal, distante apenas 7 km da sede do município de Barcarena, a qual faz parte da região metropolitana de Belém, Capital do Pará. A cobertura vegetal da floresta primária foi quase totalmente substituída pela ação dos desmatamentos (cerca de 60%) para o plantio de culturas agrícolas de subsistência, dando ensejo à regeneração florestal com diferentes estágios de desenvolvimento da floresta secundária. A população do município de Barcarena foi estimada em 68.604 habitantes (IBGE, 2004), enquanto a população da localidade Santana do Cafezal era de 1.064 habitantes.

O bairro de Santana do Cafezal é subdividido em 6 localidades, situa-se na zona rural do município de Barcarena. É uma área de fácil acesso, com meio de transporte regular por barco motorizado e veículo por estrada asfaltada. A localidade apresenta cerca de 240 prédios. Sendo que 365 pessoas residem no núcleo urbano e os demais estão distribuídos em lugarejos ao redor do núcleo.

A maioria da população, cerca de 80%, reside em casas de madeira, e o restante em casas de alvenaria, em meio à vegetação. A vegetação é abundante do tipo secundário, formando bosques, onde estão situadas as casas. Há relato pela população do grande número de insetos que entram nas residências em função da proximidade das matas. A localidade tem luz elétrica, mas não tem saneamento básico. A água utilizada é de poço e sem tratamento. (Figura 10)

Figura 10: Tipos comuns de moradia rural

A comunidade apresenta uma boa organização social. Possui um posto de saúde com atendimento médico regular, três agentes de saúde, um centro comunitário, uma escola municipal, três igrejas evangélicas, uma

capelinha, e um porto com grande movimento na localidade. (Figuras 11 e 12)

Figura 11: Posto de saúde de Bacabal

Figura 12: Porto de Bacabal, entrada para Barcarena PA

A principal atividade de subsistência da comunidade é a cultura de abacaxi, maracujá e a produção de farinha de mandioca, além do extrativismo de açaí que é abundante na localidade. (Figuras 13 e 14).

Figura 13: Moradia com área de subsistência

Figura 14: Animais domésticos em abrigos ao redor de moradia.

Por outro lado, algumas características da população investigada também devem ser enfatizadas, uma vez que o vilarejo de Santana do Cafezal, nordeste do Estado do Pará, consiste de comunidade estabelecida há mais de um século, cuja população selecionada para este estudo era representada por indivíduos de pelo menos quatro gerações, com exposição prolongada à transmissão de *L. (L.) i. chagasi* o que pode favorecer o

desenvolvimento de imunidade, conferindo algum grau de proteção à população.

Embora a população possua poder aquisitivo baixo, sua base alimentar é principalmente produtos da pesca e da agricultura de sobrevivência, o que oferece um perfil satisfatório de alimentação.

3.3 População do Estudo

A população incluída no estudo foi constituída de 946 indivíduos, sendo 568 do sexo masculino e 378 do sexo feminino com idade de um ano ou mais. A população foi dividida em três grupos por idade: 1 a 10, de 11 a 20 e 21 anos ou mais.

3.4 Técnica do Estudo

Para a avaliação da prevalência e para o diagnóstico da infecção, foi realizado o uso simultâneo do teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e da reação Intradérmica de Montenegro (RIM) em todos os indivíduos selecionados previamente para a intervenção (Figuras 15 e 16). Os indivíduos que apresentassem qualquer tipo de reação imune, tanto na RIFI e/ou RIM foram avaliados clinicamente para identificar quaisquer sinais e/ou sintomas que poderiam ser associados aos perfis, a resposta clínica e imunológica.

Figura 15: Reação Intradérmica de Montenegro.

Figura 16: Reação de Imunofluorescência Indireta.

3.5 Critérios para Identificação da Infecção Humana.

A definição de um caso de infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* se baseou em dois parâmetros imunológicos.

A Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a Reação Intradérmica de Montenegro (RIM). Todavia, como RIFI evidencia imunidade humoral associada à resposta imune CD4+ Th2 (resposta do anticorpo = suscetibilidade) e RIM evidenciam imunidade celular associada à resposta imune CD4+ Th1 (hipersensibilidade = resistência) a identificação da infecção por *L. (L.) i. chagasi* seria a presença de reatividade em qualquer um ou em ambos os testes imunológicos.

Além disso, com o objetivo de expressar a especificidade de RIFI e RIM, foi usada escala de resultados semiquantitativos com pontuações variando de + a +++++, como segue:

Tabela 1: Escala de resultados semiquantitativos para RIFI e RIM

RIFI Títulos Sorológicos de IgG	RIM: Grau de induração
80-160 -- +	= 16 mm -- +++++
320-640 -- ++	13-15 mm -- +++
1.280-2.560 -- +++	9-12 mm -- ++
5.120-10.240 -- +++++	5-8 mm -- +

As reações sorológicas com título 80 (IgG) e reações intradérmicas formando grau de induração ≥ 5 mm de diâmetro foram consideradas como o ponto de corte positivo no RIFI e RIM, respectivamente.

3.6 Disposições Técnicas.

O antígeno usado em Santana do Cafezal, vilarejo situado em área onde leishmanioses cutâneas e viscerais são potencialmente concomitantes, deve ter alta especificidade para a doença visceral.

Assim, para promover alta especificidade no RIM, foram usadas formas promastigotas cultivadas da fase estacionária (meio RPMI 1640) de cepa regional de *L. (L.) i. chagasi* (MCAO/BR/2003/M22697/Barcarena, Pará). Foram fixadas em solução de mertiolato (1/10.000) na concentração final de cerca de 10×10^6 parasitas/mL. Como controle do antígeno de *Leishmania*, 0.1 mL da solução de mertiolato (1/10.000) foi usada por via intradérmica no antebraço oposto de cada indivíduo.

A RIFI foi realizada como proposto por Lima et al. (2003) que demonstrou que antígeno de amastigota de *L. (L.) i. chagasi* tinha maior especificidade e sensibilidade que aquele de promastigotas da mesma espécie.

3.7 Análise Estatística.

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

3.8 Aprovação pelo Comitê de Ética.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos do Instituto Evandro Chagas, Pará - Brasil, sob número de protocolo CEP/IEC 16/2003 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número de protocolo de pesquisa FMUSP 0255/07.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Taxas de Prevalência de Infecção Humana por *L. (L.) i. Chagasi* no Vilarejo de Santana do Cafezal.

Para a prevalência da infecção foram avaliados 946 indivíduos simultaneamente por RIFI e RIM.

A taxa de prevalência de infecção obtida no RIM foi de 11,26% (106/946) sendo significativamente maior ($< 0,0001$) do que os 3,4% (32/946) obtidos no RIFI.

Entretanto, quando estas taxas foram estimadas combinando ambos os testes notou-se que entre os 106 indivíduos RIM reativos, 18 (17%) eram também reativos na RIFI e que dos 32 RIFI reativos, os mesmos 18 (56,2%) eram também reativos à RIM. Esta combinação permitiu a identificação da taxa real de prevalência de 12,6% (120/946) para a comunidade, pelo uso de ambos os testes. (Figura 17)

Figura 17: Taxas de prevalência por RIM, RIFI, RIM+RIFI.

4.2 Frequências da Infecção Humana por *L. (L.) i Chagasi* no Vilarejo de Santana do Cafezal de Acordo com Sexo e Idade.

De acordo com o sexo, a distribuição de 120 casos diagnosticados na intervenção de prevalência não mostrou diferença ($p > 0.05$) entre taxas de infecção do sexo masculino (55,8%) e sexo feminino (44,2%).

A distribuição da infecção de acordo com a idade também não mostrou diferença ($p > 0.05$) entre os grupos etários mais jovens (1-10 vs. 11-20 anos), 19,2% e 25,8% respectivamente, perfazendo um total de 44%, que quando comparadas com a do grupo etário mais velho (≥ 21 anos de idade) 55%, foram significativamente menores ($p < 0.05$). Indicando que mais da

metade de indivíduos infectados foram encontrados no grupo com idade maior (Figura. 18).

Figura 18: Distribuição da freqüência da infecção humana por *Leishmania (L.) i. chagasi* na localidade Santana do Cafezal, Barcarena, Pará, segundo a faixa de idade. * = 21

4.3 Quanto à Especificidade de RIM e RIFI:

Observou-se que entre os 106 casos RIM reativos, 41,5% apresentaram reatividade exacerbada (++++), 14,1% foram fortemente positivos (+++), 19,8% moderadamente positivos (++) e 24,6% fracamente positivos (+), indicando que 55,6% apresentavam caráter acentuado (+++/++++) de resistência imunológica (hipersensibilidade) à infecção (Figura 19).

Figura 19: Distribuição da frequência das reações intradérmicas de Montenegro (RIM), segundo os intervalos das reações (mm). * ≥ 16

Ao contrário, entre os 32 casos RIFI reativos, 21,8% apresentaram reatividade sorológica baixa (+), 53,1% foram moderadamente positivos (++) , 18,8% fortemente positivos (+++) e 6,3% altamente positivos (++++) (Figura. 20).

Figura 20: Distribuição da frequência das reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo os intervalos das reações sorológicas (IgG).

Assim somente 25,1% dos casos apresentaram resposta humoral significativa, variando de fortemente positivos (+++) a altamente positivos (++++), demonstrando característica significativa de suscetibilidade imunológica à infecção. Destes, quatro (3,3%) casos eram LVA (2 crianças e 2 adultos) com taxa de prevalência de LVA de 0,42%, e outros quatro (3,3%) casos eram sugestivos ISO (1 adolescente e 3 adultos).

4.4 Avaliação Clínico-Imunológica da Infecção Humana por *L. (L.) i. chagasi* no Vilarejo de Santana do Cafezal.

Do total de 120 casos de infecção a maioria (72,4%) era clinicamente assintomática e exibia resposta imune (RIM+/++++e RIFI-) que caracterizamos como perfil clínico-imunológico de Infecção Assintomática (IA), outros (6,6%) eram representados por resposta imune (RIM - e RIFI+++ /++++) que associamos a dois perfis clínico-imunológicos suscetíveis: Infecção Sintomática (IS) e Infecção Subclínica Oligossintomática (ISO). Do restante dos assintomáticos identificamos 15% de casos com resposta imune em ambos os testes (RIM+/++ e RIFI +/++), compatível com perfil clínico-imunológico intermediário mostrando grau de resistência razoável (RIM+/++) reconhecido como Infecção Resistente Subclínica (IRS), e (5%) apresentando resposta imune com tendência aparente de preferência humoral com baixos níveis de títulos sorológicos (RIM - e RIFI +/++); por esta razão foram considerados como grupo infectado muito precocemente, entretanto sem definição de sua evolução clínica e imunológica eram considerados como Infecção Inicial Indeterminada (III) com a possibilidade de evoluir tanto para os perfis resistentes IRS e IA como os suscetíveis ISO e IS (LV=LVA). (Tabela 2)

Tabela 2: Espectro clínico e imunológico da infecção humana por *Leishmania (L.) i. chagasi* na Região Amazônica Brasileira

Pólo imunológico susceptível		Pólo imunológico resistente
Infecção sintomática (LVA)		Infecção assintomática (IA)
RIM -		RIM +/++++
RIFI +++/++++		RIFI -
Infecção Oligossintomática Subclínica (IOS)	Infecção Inicial Indeterminada (III)	Infecção Subclínica Resistente (IRS)
RIM -	RIM -	RIM +/++
RIFI +++/++++	RIFI +/++	RIFI +/++

RIFI: Teste Imunofluorescência Indireta (IgG); RIFI +++++: 5120–10 240 (IgG); RIFI +++: 1280–2560 (IgG); RIFI ++: 320–640 (IgG); RIFI +: 80–160 (IgG); RIFI –: reação negativa; RIM: Reação Intradérmica de Montenegro; RIM +++++: Reação exacerbada (≥ 16 mm); RIM +++: reação forte (13–15 mm); RIM ++: reação moderada (9–12 mm); RIM +: reação fraca (5–8 mm); RIM –: reação negativa.

Estes resultados evidenciaram taxa de frequência maior ($p < 0.05$) do perfil IA (73.4,) do que os outros perfis, IRS (15%), III (5%), IS (3%) e IOS (3%), bem como demonstraram que a taxa de frequência do perfil IRS, também era maior ($p < 0.05$) que aquele dos três últimos (III, IS e IOS) individualmente e entre os quais não havia diferenças ($p > 0.05$) quanto às suas taxas de frequência.

Baseado nesta abordagem foi possível distribuir os 120 casos de infecção em 5 perfis clínico-imunológicos, o que representa nova proposta diagnóstica para o espectro clínico e imunológico da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* no Novo Mundo (Figura 21).

Figura 21: Distribuição da frequência dos perfis clínico-imunológicos relativos à infecção humana por *Leishmania (L.) i. chagasi* na localidade Santana do Cafezal, Barcarena, Pará.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este trabalho representa um dos poucos estudos de natureza epidemiológica, um estudo de corte transversal, feito no Brasil que avaliou 946 indivíduos com idade a partir de um ano, incluindo adultos, usando simultaneamente dois métodos de avaliação de imunidade (RIM e RIFI). Esta abordagem possibilitou um melhor entendimento da dinâmica de transmissão de infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* em área endêmica de LVA, na Amazônia brasileira, com referência especial à prevalência da infecção, o diagnóstico e também melhor definição da resposta imune e sua interação com *L. (L.) i. chagasi*.

Mesmo que alguns estudos anteriores tenham relatado a dinâmica da transmissão da infecção (Badaró et al. 1986a, Caldas et al. 2001, 2002, Nascimento et al., 2005), eram limitados à infecção de indivíduos até 15 anos, sem valorizar a importância de indivíduos mais velhos na epidemiologia da infecção.

De outro lado, algumas características da população investigada também devem ser enfatizadas, uma vez que o vilarejo de Santana do Cafezal, na região nordeste do Estado do Pará, consiste de comunidade estabelecida há mais de um século, cuja população selecionada para este estudo era representada por indivíduos de pelo menos quatro gerações, com exposição prolongada à transmissão de *L. (L.) i. chagasi* o que pode bem favorecer o desenvolvimento de imunidade, conferindo algum grau de proteção à população.

Mesmo havendo evidência recente indicando que a suscetibilidade à leishmaniose possa ser controlada por mecanismo genético (Peacock et al. 2002, Blackwell et al. 2004, Jamieson et al. 2007), é esperado que o ambiente e/ou alimentação podem contribuir para a promoção de melhor resposta imune à infecção humana por *L. (L.) i. chagasi*, uma vez que a prevalência (0,42%) de LVA ativa apresentou baixa expressão neste estudo.

Com respeito à dinâmica da transmissão de infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* os resultados dos testes isolados demonstraram que a taxa de prevalência da infecção na RIM (11.2%) era mais alta ($p < 0.05$) que aquela na RIFI (3,4%), que demonstrou entre indivíduos infectados naturalmente, em geral ocorreu número maior de casos apresentando resistência imunológica (hipersensibilidade) à infecção, o que poderia ajudar a explicar a baixa taxa de prevalência de LVA no presente estudo.

Além disso, considerando que ambos os testes foram feitos com a mesma cepa de antígeno do *L. (L.) i. chagasi*, é pouco provável que a diferença encontrada nas taxas de prevalência entre RIM e RIFI possa ser atribuída à variabilidade da especificidade do antígeno usado nestes testes.

Seguindo a comparação entre o teste de resposta imune de células T (RIM) e o teste de resposta imune humoral (RIFI ou ELISA) usados para analisar as taxas epidemiológicas da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* deve-se ressaltar que estes achados podem ser influenciados por certos procedimentos técnicos ou fatores epidemiológicos.

Em relato descrevendo estudo prospectivo no município de Jacobina, Bahia, na região nordeste do Brasil, extrato solúvel de *L. (L.) i. chagasi* foi

usado somente para teste de hipersensibilidade (RIM) para diagnosticar infecção em crianças até 15 anos (Badaró et al. 1986a), a prevalência encontrada foi de 34,1%. Considerando que a expressão de infecção não está limitada somente a um tipo de resposta imune, e/ou resposta imune de células T (RIM) ou resposta imune humoral (ELISA) fica claro que estes resultados não mostraram a verdadeira situação de infecção epidemiológica naquela área. Além disso, a taxa de prevalência (3,1%) de LVA foi também estimada e era maior do que a encontrada neste estudo (0,42%), que pode ser creditada possivelmente a duas situações em Jacobina:

- I. Nível alto de transmissão de infecção com prevalência de RIM de 34,1%;
- II. Maior suscetibilidade genética à LVA.

Nos estudos no município de Raposa, Maranhão (Caldas et al. 2001, 2002, Gama et al. 2004), também na região nordeste do Brasil, se introduziu duas diferenças significativas de natureza metodológica:

- I. Somente crianças até 5 anos de idade foram selecionadas, representando maior limitação comparada a outros estudos
- II. Dois antígenos diferentes foram usados para diagnóstico da infecção:
 - Extrato solúvel de *L. (L.) amazonensis* para RIM
 - Extrato solúvel de *L. (L.) i. chagasi* para ELISA.

Os resultados revelaram taxas de prevalência de infecção de 18,6% no RIM e 13,5% no ELISA, que foram mais altas que aquelas encontradas no presente estudo 11,2% na RIM e 3,4% na RIFI, respectivamente, mas mostrando a grande maioria de casos apresentando resposta imune de

hipersensibilidade (RIM). Entretanto, ao contrário dos dados deste estudo, havia 4 vezes mais indivíduos mostrando resposta imune humoral (13,5%:3,4%) o que pode ser explicado por concentração mais alta de indivíduos suscetíveis (crianças de até 5 anos de idade) do que no presente estudo.

Em outro estudo realizado no Maranhão, município de São José de Ribamar, (Nascimento et al.2005) no qual a taxa de prevalência de infecção em crianças até a idade de 15 anos foi estimada usando três tipos de antígenos:

- I. Extrato solúvel *L. (L.) i. chagasi* para RIM
- II. Extrato de antígeno cru do mesmo parasita
- III. Uma proteína recombinante (rk39), ambos para ELISA

Os dados encontrados revelaram as maiores taxas de infecção relatadas, 61,7% para RIM e 19,7% (rk39) para ELISA, demonstrando taxa de prevalência mais alta que a de Jacobina, Bahia, onde a taxa de prevalência pelo RIM foi de 34,1%. Ressaltamos que as diferenças encontradas devem ser analisadas cuidadosamente pelos procedimentos técnicos usados e as circunstâncias epidemiológicas de cada estudo.

Quando a análise de taxas de prevalência de infecção foi com ambos os testes RIM e RIFI, que possibilitam avaliação específica e comparativa dos dois tipos de resposta imune; RIM ligado à imunidade celular (resposta imune CD4 tipo 1) e RIFI ligado à imunidade humoral (resposta CD4 tipo 2) (Awashi et al. 2004), a taxa de prevalência real de 12,6% foi uma tentativa

de se avaliar melhor a verdadeira situação da transmissão da infecção na área de estudo.

E este aspecto, deve ser ressaltado, pois esta é abordagem não publicada na investigação da epidemiologia da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi*.

Na Europa, mais especificamente na Itália mediterrânea, concernente a um velho foco de leishmaniose visceral na Sicília, onde a doença é causada por *L. (L.) i. infantum*, foi usada suspensão de antígeno de promastigota de parasita homólogo para demonstrar taxa de prevalência de infecção de 16,6% com RIM em indivíduos de diferentes idades, o que se assemelha mais aos resultados encontrados no presente estudo (11,2% RIM) e pode também refletir a dinâmica de transmissão semelhante de *L. (L.) i. infantum* e *L. (L.) i. chagasi*.

Na África, especialmente no Sudão, onde a doença é causada por *L. (L.) d. donovani*, a leishmaniose representa grave problema de saúde pública, sendo responsável por mais de 100.000 mortes na década de 1980 (Zijlstra et al. 1994). Mostra uma situação epidemiológica da infecção humana delicada, uma vez que relatos recentes revelam taxas de prevalência variando de 33% a 56% em duas localidades, Mushrau Koka e Um-Salala, respectivamente, usando antígeno de suspensão de promastigota do mesmo parasita (Khalil et al., 2001) demonstrando nível mais alto de transmissão da infecção do que o encontrado na Amazônia brasileira.

Diferente dos ensaios mencionados anteriormente, este estudo foi realizado com uma população de área endêmica para LVA na Amazônia brasileira, usando simultaneamente RIM e RIFI para identificar infecção humana por *L. (L.) i. chagasi*. Uma escala para avaliação semiquantitativa destes dois testes definia escores variando de + até ++++ o que possibilitou distinguir cinco perfis clínico-imunológicos entre indivíduos infectados, como: Infecção Assintomática (IA) (RIM +/- e RIFI -), Infecção Sintomática (IS = LV) e Infecção Oligossintomática Subclínica (IOS), ambos com o mesmo perfil de resposta imune (RIM - e IAI +++/+), Infecção Resistente Subclínica (IRS) (RIM +/- e RIFI +/-) e Infecção Inicial Indeterminada (III) (RIM - e RIFI +/-). Sem podermos comparar é importante registrar a observação de Holaday et al. (1993) que discriminaram no grupo de 12 crianças subclínicas oligossintomáticas infectadas, 3 soropositivas no ELISA e, também, reativas no RIM o que conferiu a este subgrupo de 3 crianças assintomáticas “status” equivalente ao perfil clínico-imunológico IRS descrito acima.

Esta escala também pode avaliar a significância de cada tipo de resposta imune, seja a resposta humoral (RIFI) ou a celular (RIM) à infecção. A taxa de frequência para cada perfil clínico-imunológico mostrou a seguinte distribuição:

- I. Perfil IAA foi o mais freqüente com 73,4% dos casos;
- II. Perfil ISR foi o segundo mais freqüente com 15% dos casos;
- III. Perfil III foi o terceiro mais freqüente com 5% dos casos;
- IV. Perfil IS (LV) foi o quarto com 3,3% dos casos;

V. Perfil ISO foi o último com 3,3% dos casos.

Esta foi à primeira experiência para propor um grande espectro clínico-imunológico de infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* no Novo Mundo usando métodos simples, baratos e reproduzíveis. Por meio desses métodos foram identificados cinco diferentes perfis clínico-imunológicos de infecção. Foram identificados dois perfis adicionais (IRS e III) além dos três (IA, IS e IOS) já reconhecidos por outros (Badaró et al 1986a,b, Holaday et al. 1993, Pearson et al. 1993, Jerônimo et al. 2000, Gama et al. 2004). Este espectro proposto tem a vantagem de promover melhor visibilidade das alternativas clínicas e imunológicas que tem papel na interação entre *L. (L.) i. chagasi* e a resposta imune humana, e é ferramenta adequada para os programas de controle de LVA, e, também, para refletir o polimorfismo genético ligado aos mecanismos imunológicos responsáveis pela resistência a infecções humanas viscerais por *Leishmania* (Peacock et al. 2001, 2003, Blackwell et al. 2004, Jamieson et al. 2007).

Esta experiência mostrou também que a grande maioria (73,4%) dos indivíduos que vivem na área endêmica de LVA possui perfil de resposta imune de resistência à infecção (RIM +/++++ e RIFI -), confirmando a significância da resposta imune Th1 (hipersensibilidade) como crucial para o controle da infecção. Como resultado, todos estes indivíduos são clinicamente assintomáticos (IA).

O novo perfil IRS, que também mostrou significativo grau de resistência (RIM +/++) à infecção, foi representado por proporção razoável (15%) de

indivíduos infectados. Estes dois perfis (IA mais IRS) perfaziam pelo menos 88,4% de todas as infecções na área endêmica.

Outro achado significativo desta abordagem foi a identificação entre indivíduos infectados como perfil III (RIM - e RIFI +/++) que consistia de indivíduos com o estágio mais precoce da infecção e, também, com a tendência aparente para predominância humoral, mas sem definição de seu perfil de resposta imunológica. Este perfil foi considerado como infecção inicial indeterminada que pode evoluir tanto para os perfis resistentes ISR e IA quanto para os perfis suscetíveis IOS e IS e pode ter papel crucial nos programas de controle para monitoração de indivíduos infectados na área endêmica.

A importância da idade no resultado da infecção foi mais uma conclusão deste estudo. A maioria dos estudos até agora encontraram grande número de casos IOS mais do que os de LVA, mas foram realizados com crianças até 15 anos de idade (Badaró et al. 1986b) ou com 5 anos de idade (Gama et al. 2004a). No presente estudo não foi identificada diferença ($p > 0,05$) de taxas de prevalência entre perfis IS (3,3%) e IOS (3,3%), provavelmente pelo fato de serem avaliados indivíduos de idades diferentes, sugerindo superconcentração de indivíduos suscetíveis naqueles estudos anteriores. De fato influência da idade nos resultados da infecção foi detectada entre a idade dos dois perfis; houve média de idade de 33,6 anos no perfil IOS que foi significativamente maior ($p < 0,05$) que aquela de 10,7 anos de idade no IS, indicando que indivíduos mais velhos parecem

desenvolver melhor resposta imune Th1 à infecção e menos condições para IS.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- As taxas de prevalência da infecção usando dois métodos imunológicos possibilitam avaliar melhor a real situação da infecção por *L. (L.) i. chagasi* em Barcarena -PA.
- A inclusão de indivíduos maiores que 15 anos, diminui a frequência de formas oligossintomáticas subclínicas.
- O sexo não é variável significativa na distribuição da infecção humana.
- A prevalência da infecção aumenta progressivamente com a idade.
- A especificidade da RIM melhora os resultados da análise de prevalência dos indivíduos resistentes à infecção, mas não as taxas dos susceptíveis.
- Esta experiência mostra também que a grande maioria dos indivíduos que vivem na área endêmica de LVA possui perfil de resposta imune de resistência à infecção.
- O uso de escala semiquantitativa dos dois testes (RIM e RIFI) permite identificar cinco perfis clínico-imunológico nos indivíduos infectados e diferenças nas taxas de prevalência entre os mesmos.
- Estes perfis permitem ampliar o espectro clínico-imunológico de infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* no Novo Mundo usando métodos simples, baratos e reproduzíveis.
- Este espectro promove melhor visibilidade do perfil clínico e imunológico e serve de ferramenta adequada para os programas de controle de LVA.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Alencar JE. Kala-zar in Brazil. *Sci Rep Inst Sup Sanitá* 1962; (2): 116-23.

Ali A, Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. I. Cross-sectional skin test in an endemic locality. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1993; 87(2): 157-61.

Ali A, Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. III. The magnitude and annual incidence of infection, as measured by serology in an endemic area. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1994a; 88(1): 43-7.

Ali A, Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relation of infection to disease in an endemic area. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1994b; 88(3): 289-93.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian. J. Med. Res.* 2004; 119(6): 238-58.

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

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG., Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral

leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 1986b; 154(6): 1003-11.

Badaró R. Progressos na pesquisa de leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina-Bahia 1934-1989. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988; (21): 159-64.

Blackwell JM, Mohamed HS, Ibrahim ME. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. *Trends Parasitol.* 2004; 20(6): 268-74.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília-DF, Ministério da Saúde. 2003 p.1-120.

Caldas AJM, Silva DRC, Pereira CCR, Nunes PMS, Silva BP, Silva AAM, Barral A, Costa JML. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na ilha de São Luis MA, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34(5): 445-451.

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

Carvalho EM, Sampaio D, Bacellar O, Barral A, Badaró R, Barral-Neto M. Imuno regulation in *American visceral leishmaniasis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988; 83 Suppl. 1: 368-71.

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

Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN, Paumgartten MJ, Sá B. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da *Leishmania Visceral Americana* em 1937). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1938; 33(1):89-229.

Deane LM, Deane MP. Visceral *Leishmaniasis* in Brazil: Geographical distribution and transmission. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1962; 4: 198-212.

Deane L, Deane G. Estudos sobre leishmaniose visceral americana. Nota 1: Aspectos clínicos da doença. O Hospital (Rio de Janeiro). 1937; 12(2):188-99.

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

Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. Brit Med J. 1903; 11:79.

Evans TG, Krug EC, Wilson ME, Vasconcelos AW, Alencar JE, Pearson RD. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84(2): 157-66.

Gama MEA, Costa JML, Gomes CMC, Corbett CEP. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004; 99(8): 889-93.

Garrote JI, Gutierrez MP, Izquierdo RL, Duenas MA, Zarzosa P, Canavate C., El Bali M, Almaraz A, Bratos M.A, Berbel C, Rodriguez-Torres A. Domingo AO. Seroepidemiologic study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon. Spain. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2004; 71(4): 403-6.

Guia de Vigilância Epidemiológica/Funasa (Ministério da Saúde). Brasília. Doenças de Interesse para a Saúde Pública e Vigilância Epidemiológica: *Leishmania Visceral*. 2002, V II, p 445-460.

Holaday BJ, Pompeu MM, Evans T, Braga DN, Texeira MJ, Sousa AQ, Sadick MD, Vasconcelos AW, Abrams JS, Pearson RD, et al. Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. J. Infect Dis. 1993; 167(2): 411-7.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem nacional de populações. Superintendência de estudos geográficos e sócio-econômicos. Rio de Janeiro, RJ, Brasil 2000.

Jamieson SE, Miller EM, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A, Shaw MA., Silveira F, Shaw JJ, Jeronimo SM, Blackwell JM. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun.* 2007; 8(1): 84-90.

Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: Long-term follow-up. *Clin. Infec. Dis.* 2000; 30(3): 608-09.

Khalil EA, Zijlstra EE, Kager PA, El Hassan AM. Epidemiology and clinical manifestations of *Leishmania donovani* infection in two villages in an endemic area in eastern Sudan. *Trop. Med. Int. Health* 2001; 7(1): 35-44.

Lainson R. The American Leishmaniasis: Some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77(5): 569-96.

Lainson R., Shaw JJ., Ryan L., Ribeiro, RSM. & Silveira FT. Presente situação da leishmaniose visceral na Amazônia, com especial referência a um novo surto da doença, ocorrido em Santarém, Estado do Pará, Brasil.

Boletim epidemiológico. Fundação SESP. Rio de Janeiro, 1984 16 (ed. esp.) 1-8.

Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. XXI: *Visceral leishmaniasis* in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1985; 79(2): 223-26.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ryan L, Póvoa MM, Ishikawa EAW. A *Leishmania* e as leishmanioses. in: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e medicina tropical. Belém; Fundação Serviços de Saúde Pública. 1986, v1: 83-124.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographic distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Academic Press, London, 1987, V.1 p.1-120.

Lainson R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. MW Service, (Ed) Demographic and Vector Borne Disease, CRC Press, Boca Raton. 1989: 85-106.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA, Silveira FT. Amazon 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 the infection. Mem do Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1990; 85(1): 135-7.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the New World. In Collier L, Balows A, Sussman M (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infection. 10th ed , Arnold, London. 2005. V.5, p. 313-49.

Leishman MB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. Brit Med J. 1903; 1:1252-54.

Lima LVR, de Souza AAA, Jennings YL, Campos MB, Corrêa Z, de Jesus R, Everdosa D, Ayres M, Silveira FT. Comparação da reatividade entre antígenos de *Leishmania (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* no sorodiagnóstico (RIFI) da leishmaniose visceral humana no estado do Pará. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003; 6 Supp I: 312.

Malla N e Mahajan R. Pathophysiology of *visceral leishmaniasis* – some recent concepts. Indian J Med. Res. 2006;123 (3):267-74.

Migone LE. Un caso de Kalazar en Assuncion (Paraguay). Bull Soc Path Exot. 1913; 6: 118-20.

Nascimento MDSB, Souza EC, da Silva LM, da Cunha LP, de Lima Cantanhede K, de Barros Bezerra GF, de Castro Viana GM. Prevalência de

infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rk39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2005; 21(6): 1801-1807.

Pampiglione S, Manson-Bahr PE, La Placa M, Borgatti MA, Musumeci S. Studies in Mediterranean leishmaniasis: 3. The leishmanin in skin test kala-azar. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1975; 69(1): 60-8.

Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadou G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J. Infect.* 2005; 50(1): 53-60.

Peacock CS, Sanjeevi CB, Shaw MA, Collins A, Campbell RD, March R, Silveira F, Costa J, Coste CH, Nascimento MD, Siddiqui R, Shaw JJ, Blackwell JM. Genetic analysis of multicase families of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: no major role for class II or class III regions of HLA. *Genes Immun.* 2002; 3(6): 350-8.

Pearson RD, Souza AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Inf. Dis.* 1996; 22(1): 1-13.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico*. 1934; 46: 949-50.

Prata A, Silva LA. Calazar. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2005. p.713-32.

Reed SG, Badaró R, Masur H, Carvalho EM, Lorengo R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WD Jr, Jones TC. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1986; 35(1): 79-85.

Ross R. Further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J.* 1903; 2: 1401.

Schenkel K, Rijal S, Koirala S, Vanlerberghe V, Van der Stuyft P, Gramiccia M, Boelaert M. *Visceral leishmaniasis* in southeastern Nepal: a cross-sectional survey on *Leishmania donovani* infection and its risk factors. *Trop.Med. Int. Health.* 2006; 11(12): 1792-9.

Secretaria Executiva de Saúde do Estado do Pará (SESPA). Leishmaniose visceral e tegumentar americana. Boletim Epidemiológico, Departamento de Controle de Endemias, Belém, Pará. 2004; 6-8.

Silveira F, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa MM. Leishmaniasis in Brazil: XVIII further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of amazonian visceral leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1982; 76(6): 830-2.

Silveira FT., Shaw, JJ., Bichara, CNC., Costa, JML. Leishmaniose visceral americana. In Leão RNQ, Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico, CEJUP/ UEPA/ IEC, 1ª Ed. Belém, PA, 1997, p. 631-644.

Sundar S. Indian kala-azar better tools needed for diagnosis and treatment. *J. Postgrad. Med.* 2003; 49(1): 29-30.

Zijlstra EE, el-Hassan AM, Ismael A, Ghalib HW. Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51(6): 826-36.