



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**INFECÇÃO POR *L.(L.) chagasi* E ASSOCIAÇÃO ENTRE
ANTICORPOS ANTI-SALIVA DA *Lutzomyia longipalpis* E O TESTE
CUTÂNEO ANTI-*LEISHMANIA* EM CRIANÇAS RESIDENTES EM
ÁREAS ENDÊMICAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL, NA ILHA DE
SÃO LUÍS-MA.**

DORLENE MARIA CARDOSO DE AQUINO

Salvador - Bahia - Brasil

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

Tese de doutorado

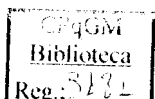
INFECÇÃO POR *L.(L.) chagasi* E ASSOCIAÇÃO ENTRE
ANTICORPOS ANTI-SALIVA DA *Lutzomyia longipalpis* E O TESTE
CUTÂNEO ANTI-*LEISHMANIA* EM CRIANÇAS RESIDENTES EM
ÁREAS ENDÊMICAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL, NA ILHA DE
SÃO LUÍS-MA.

DORLENE MARIA CARDOSO DE AQUINO

Orientadora: Dr^a. ALDINA MARIA PRADO BARRAL

Tese apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em
Patologia para obtenção de
grau de Doutor em Patologia
Humana.

Salvador – Bahia – Brasil
2007



“INFEÇÃO POR *L. (L.) chagasi* E ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ANTI-SALIVA DA *Lutzomyia longipalpis* E O TESTE CUTÂNEO ANTI-LEISHMANIA EM CRIANÇAS RESIDENTES EM ÁREAS ENDÊMICAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL, NA ILHA DE SÃO LUÍS-MA”

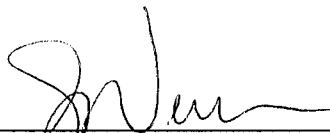
DORLENE MARIA CARDOSO DE AQUINO

FOLHA DE APROVAÇÃO

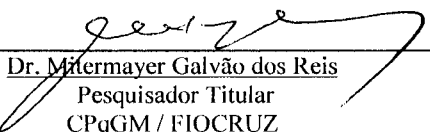
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Ana Lúcia Teles Rabello
Pesquisadora Titular
CPqRR / FIOCRUZ



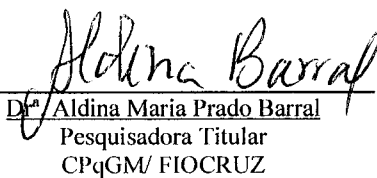
Dr. Guilherme Loureiro Werneck
Professor Adjunto
UERJ



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ



Dr. Edson Duarte Moreira Júnior
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ



Dr. Aldina Maria Prado Barral
Pesquisadora Titular
CPqGM/ FIOCRUZ

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ
Salvador-Bahia

Aquino, Dorlene Maria Cardoso de

A657i Infecção por L.(L.) chagasi e associação entre anticorpos anti-saliva da *Lutzomyia longipalpis* e o teste cutâneo anti-leishmania em crianças residentes em áreas endêmicas de leishmaniose visceral, na ilha de São Luís-Ma.[manuscrito] . / Dorlene Maria Cardoso de Aquino. - 2007.

108 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz , 2007.

Orientador: Prof. Dr^a.: Aldina Maria Prado Barral, Laboratório de Imunoparasitologia.

1. Leishmania Visceral . 2. Infecção . 3. Leishmania Chagasi.

CDU 616.993.161: 616.9

A DEUS, pelo dom da vida, inspiração, força, fé e confiança, sempre me guiando por todos os caminhos, e ajudando-me a superar os obstáculos.

À minha filha, Ana Carolina, fonte de amor e carinho.

À minha mãe, Delcy, pelo constante incentivo.

À minha tia-avó Zirza e aos meus avós maternos Henrique e Francelina (*in memoriam*), com profunda admiração, gratidão e saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

À minha filha, Ana Carolina, por tentar conformar-se com as minhas ausências, sempre me recebendo com imenso amor e carinho.

Às crianças e aos seus responsáveis, residentes dos bairros Vila Nova e Bom Viver, pela convivência e confiança depositada durante toda a realização do estudo.

À minha família, pelo carinho.

A José Generoso da Silva, exemplo de pai, por substituir-me nas minhas ausências.

À Prof^a. Dr^a. Aldina Barrai, pela orientação, profissionalismo, ensinamentos, competência e amizade.

Ao Dr. Jackson Maurício Lopes Costa, pelo incentivo, sugestões e críticas ao manuscrito.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Moura da Silva, pela disponibilidade, colaboração nas análises estatísticas e sugestões ao manuscrito.

Ao Dr. Manoel Barrai Neto, pelas observações, que me levaram a muitas reflexões e sugestões ao manuscrito.

À Secretaria de Saúde do Município da Raposa-MA e aos agentes de saúde dos Programas Saúde da Família das localidades Vila Nova e Bom Viver, pelo apoio integral durante a realização do trabalho de campo.

À Fundação Oswaldo Cruz - Bahia - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, especialmente às equipes do Laboratório de Imunoparasitologia-LIP e do Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunorregulação – LIMI, com atenção a Vera Vinhas, Dirceu Costa e Juqueline Cristal.

À Universidade Federal do Maranhão pela liberação, e aos colegas do Departamento de Enfermagem dessa universidade, pelo apoio e incentivo, e com carinho e amizade especial, à Arlene de Jesus Mendes Caldas.

Aos acadêmicos do curso de enfermagem da UFMA, pela colaboração na coleta dos dados.

À Tatiana Rodrigues Moura, pela amizade e acolhida em Salvador.

À Maria Neusa Cavalcante, pelo apoio durante o acompanhamento e avaliação das crianças.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal da Bahia.

Ao TMRC pelo financiamento da pesquisa e ao PICDT, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que o trabalho se concretizasse, o meu mais sincero e profundo agradecimento.

"Só uma coisa torna um sonho impossível: o medo de fracassar".

(Paulo Coelho)

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
	LISTA DE FIGURAS	11
	LISTA DE TABELAS	12
	RESUMO	14
	ABSTRACT	16
1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Aspectos clínicos e imunológicos.....	21
1.2	Saliva do flebotomíneo.....	25
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Descrição da área de estudo.....	34
4.2	Desenvolvimento do estudo.....	37
4.3	Descrição dos exames.....	40
4.4	Definição de leishmaniose infecção ou forma assintomática da LV.....	43
4.5	Considerações éticas.....	44
4.6	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Aspectos demográficos e ambientais.....	46
5.2	Aspectos epidemiológicos e imunológicos.....	50
5.3	Fatores associados à infecção	56
5.3.1	Análise univariável.....	56
5.3.2	Análise multivariável.....	60
5.4	Anticorpos IgG anti-saliva do <i>Lutzomyia longipalpis</i>	62
5.5	Anticorpos IgG anti-saliva por faixas etárias no tempo zero.....	64
5.6	Anticorpos IgG anti-saliva por faixa etária nos diversos tempos do estudo.....	65
5.7	Análise de Kaplan-Meir.....	68
6	DISCUSSÃO	71
7	ASPECTOS IMPORTANTES NO ESTUDO	82
8	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICES	97

LISTA DE ABREVIATURAS

- CPqGM – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
- DTH – Hipersensibilidade Tipo Tardia (Delayed Type Hypersensitivity)
- ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- IDRM – Intradermoreação de Montenegro
- IFN- γ - Interferon gama
- IL 2 – Interleucina 2
- IL 4 – Interleucina 4
- IL 5 – Interleucina 5
- IL6 – Interleucina 6
- IL 10 – Interleucina 10
- IL 12 – Interleucina 12
- iNOS – Óxido nítrico-sintetase indutível
- LC – Leishmaniose cutânea
- LPG – Lipofosfoglicanos
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LT – Leishmaniose tegumentar
- LV – Leishmaniose visceral
- MIP-1 β - “Macrophage inflammatory protein 1- β ”
- NK – Natural Killer
- NO – Óxido Nítrico
- O₂ – Superóxido
- O.D. – Densidade ótica
- O.M.S. – Organização Mundial da Saúde

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PMN_s – Polimorfos Nucleares Neutrófilos

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

Sb⁺⁵ – Antimonial pentavalente

SGS – Sonicado de glândula salivar

SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa da Ilha de São Luís, mostrando a localização das áreas de estudo - Vila Nova e Bom Viver, Município da Raposa – MA.	35
Figura 2	Casos de LV no Município de Raposa – Ilha de São Luís/Maranhão e localidades estudadas. Raposa – MA	36
Figura 3	Fluxograma do desenvolvimento do estudo.....	40
Figura 4	Anticorpos IgG anti-saliva em densidade ótica (OD) do <i>Lutzomyia longipalpis</i> de 1080 crianças em diferentes grupos de idade, no inquérito inicial.....	64
Figura 5	Anticorpos IgG anti-saliva em densidade ótica (OD) do <i>Lutzomyia longipalpis</i> em crianças com idade inferior a 1 ano e de 1 a 3 anos, no inquérito inicial, 6º, 12º, 18º e 24º meses de observação	65
Figura 6	Anticorpos IgG anti-saliva em densidade ótica (OD) do <i>Lutzomyia longipalpis</i> em crianças com idade de 4 a 6 anos e de 7 a 9 anos, no inquérito inicial, 6º, 12º, 18º e 24º meses de observação	66
Figura 7	Percentual de variação dos níveis de anticorpos anti-saliva do <i>Lutzomyia longipalpis</i> das crianças positivas em algum tempo do estudo e que permaneceram em seguimento por 24 meses. As barras horizontais significam as médias.....	67
Figura 8	Positividade no IDRМ em crianças de acordo com a pesquisa de anticorpos anti-saliva.....	69
Figura 9	Curva de sobrevivência de crianças, de acordo com a pesquisa de anticorpos anti-saliva. Análise de Kaplan-Meier.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aspectos demográficos das crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa – MA, 2003-2005.....	47
Tabela 2	Aspectos ambientais relativos à moradia, abastecimento de água, destino do lixo e dejetos, das crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa – MA, 2003-2005.....	48
Tabela 3	Aspectos ambientais relacionados à criação e presença de animais. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa – MA, 2003-2005.....	49
Tabela 4	Aspectos Epidemiológicos e imunológicos das crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa – MA, 2003-2005.....	51
Tabela 5	Resultado do IDRM e ELISA anti- <i>Leishmania</i> por sexo. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa – MA, 2003-2005.....	53
Tabela 6	Resultado do IDRM e ELISA anti- <i>Leishmania</i> por idade das crianças no 1º inquérito. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa – MA, 2003-2005.....	55
Tabela 7	Análise univariável da infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> detectada pelo ELISA de acordo as variáveis demográficas e história de LV na família. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.....	56
Tabela 8	Análise univariável da infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> detectada pelo ELISA de acordo as variáveis ambientais. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.....	57
Tabela 9	Análise univariável para infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> detectada pelo IDRM de acordo as variáveis ambientais. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.....	58

Tabela 10	Análise univariável para infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> detectada pelo IDRМ de acordo as variáveis ambientais. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.....	59
Tabela 11	Análise multivariável para infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> detectada pelo ELISA de acordo as variáveis demográficas e história de LV na família. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.....	60
Tabela 12	Análise multivariável para infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> detectada pelo IDRМ de acordo as variáveis demográficas e história de LV na família. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.....	61
Tabela 13	ELISA anti-saliva do <i>Lutzomyia longipalpis</i> das crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa – MA, 2003-2005.....	62
Tabela 14	Resultado do ELISA anti-saliva do <i>Lutzomyia Longipalpis</i> , por idade das crianças no inquérito inicial. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.	63
Tabela 15	Resultado da análise por pesquisa de anticorpos anti-saliva, eventos (IDRM +) de acordo com o período de seguimento, somatório do tempo de observação e taxa de incidência.....	70

RESUMO

“Infecção por *L (L) chagasi* e associação entre anticorpos anti-saliva da *Lutzomyia longipalpis* e positividade ao teste cutâneo anti-*Leishmania* em crianças residentes em áreas endêmicas de leishmaniose visceral”. **DORLENE MARIA CARDOSO DE AQUINO.**

A resposta humoral anti-saliva do flebotomíneo está associada à presença de anticorpos anti-*Leishmania*, em crianças residentes em áreas endêmicas para leishmaniose visceral (LV). Tais achados, entretanto, baseiam-se em um estudo seccional com uma pequena amostra. O presente estudo, de coorte prospectivo (janeiro 2003 a janeiro 2005) com 1080 crianças (idade inferior a 10 anos), objetiva avaliar o desenvolvimento de anticorpos anti-saliva do flebotomíneo, bem como, anticorpos anti-*Leishmania* e reação de hipersensibilidade tipo tardia (DTH) ao antígeno de *Leishmania*, e identificar possíveis fatores de risco para a infecção. As características demográficas da população estudada eram: 1 a 6 anos de idade (66,6%), sexo feminino (52,0%), cor parda (77,1%) e residência em casa com cinco a sete pessoas (57,8%). A cobertura de telha foi mencionada em 77,0% dos domicílios e desses, 96,1% eram servidas por rede de água tratada, 68,5% queimavam o lixo produzido e em 51,2% o destino dos dejetos era a fossa negra. A criação de animais foi referida por 52,3% das famílias, e a proximidade destes (principalmente cães) por 93,7%. Chiqueiro (20,6%) e galinheiro (61,3%) foram, frequentemente, relatados na proximidade das casas. A presença de flebotomíneos foi mencionada por 30,6% dos familiares. História anterior de LV na família foi referida por 205 (19,0%) das crianças envolvidas no estudo. A DHT no inquérito inicial mostrou prevalência de 31,8%, com incidências de 24,6% e 7,2%, nos 12º e 24º meses de observação, respectivamente. A positividade ao teste ELISA anti-*leishmania* a prevalência foi de 17,1% (inquérito inicial) com incidências de 6,6%, 3,8%, 17,2% e 37,3% aos 6º, 12º, 18º e 24º meses, respectivamente. Apesar da positividade de anticorpos anti-leishmania, nenhuma criança desenvolveu sintomas de LV. A variável “criação de animais” esteve associada ao risco de infecção por *L. (L.) chagasi*, quando o exame utilizado foi o ELISA, enquanto que, as variáveis “abastecimento com água de poço”, “criação de animais” e “resposta negativa quanto a presença de flebotomíneo” mostraram-se associadas quando o teste utilizado foi a DTH. Os anticorpos anti-saliva do flebotomíneo apresentaram prevalência de 16,1% no inquérito inicial e incidências no 6º, 12º, 18º e 24º meses de, respectivamente, 0,4%, 3,8%, 1,9% e 2,7%. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de anticorpos IgG anti-saliva nas diferentes faixas etárias (menores de 1 ano, de um a três, de quatro a seis, e de sete a nove anos de idade) no inquérito inicial (teste de Kruskal-Wallis usado para comparar os níveis de anticorpos nos diferentes grupos de idade e pontos de estudo). Com exceção do grupo de menores de 1 ano, os anticorpos IgG anti-saliva, declinaram em função do tempo ($p < 0.01$ nos demais grupos de idade). A associação entre anticorpos anti-saliva e DTH anti-*Leishmania* foi estatisticamente significativa ($p < 0.0006$ pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meyer). Nossos resultados mostram que: a) altos títulos de anticorpos anti-*leishmania* nem sempre se

correlacionam com o desenvolvimento de LV; b) a sensibilidade de anticorpos anti-saliva é baixa, uma vez que, muitas crianças foram expostas (evidenciado pelos anticorpos anti-leishmania ou DTH positivos), mas não exibiram reação anti-saliva positiva; Mais importante, este estudo de coorte forneceu evidências de associação estatisticamente significativa entre anticorpos IgG anti-saliva do flebotomíneo positivos e resposta imuno-celular anti-*leishmania*.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral humana; anticorpos anti-saliva do flebotomíneo; anticorpos anti-leishmania; reação de hipersensibilidade tardia anti-*leishmania*.

ABSTRACT

Infection by *L. (L) chagasi* and evaluation of anti- *Lutzomyia longipalpis* saliva immune response in children from endemic areas for visceral leishmaniasis in São Luis area, Maranhão State. **DORLENE MARIA CARDOSO DE AQUINO.**

Positivity of anti-sand fly saliva humoral response has been correlated to the presence of anti-leishmania immune response in children living in endemic areas for visceral leishmaniasis (VL). Such findings however were based on sectional studies with small samples. The present study is a prospective cohort study (January 2003 to January 2005) with 1080 children (below 10 years old) aimed at evaluating the development of anti-sand fly saliva antibodies as well as anti-leishmania antibodies and delayed-type hypersensitivity (DTH) to leishmanial antigen. Demographic characteristics are: one to six years old (66,6%), female (52,0%), mulattoes (77,1%) and living in households with five to seven persons (57,8%). Tile roof was present in 77,0% of households and 96,1% of them were served by running treated water but 51,2% did not have swage. Raising animals was recorded by 52,3% of families, and proximity to animals (mainly dogs) referred to by 93,7%. Pigsty (20,6%) and hen houses (61,3%) were frequently observed in proximity to the houses. In house sand flies were referred to by 30,6% of families. Previous history of VL in the family was present in 205 (19,0%) children enrolled in the study. at time zero had a prevalence of 31,8% with incidences of 24,6%, 7,2% at time 12 and 24 months respectively. A positive anti-leishmania ELISA test had a prevalence of 17,1% (time zero) with incidences of 6,6%, 3,8%, 17,2% and 37,3% at times 12, 18 and 24 months, respectively. Despite the presence of positive anti-*leishmania* antibody titers no child developed symptoms of VL. Raising animals was a risk factor associated with infection by the ELISA test, while extra domiciliary water source, raising animals and negative question to sand flies in house were associated with infection when the test was the DTH. Anti-sand fly saliva antibodies exhibited a positivity of 16,1% at time zero, and of 0,4%, 3,8%, 1,9% e 2,7% at times six, 12, 18 and 24 months, respectively. At time zero, no statistically significant difference was observed in anti-saliva IgG antibodies at the different age ranges (below 1yr, one to three, four to six or seven to nine). (Kruskal-Wallis test was used to all comparisons of antibody levels at different age ranges or time points). Except the group below 1 year, anti-saliva IgG antibodies declined as function of time ($p < 0.001$ in all age ranges). The association between anti-saliva antibodies and anti-*leishmania* DTH was statistically significant ($p < 0.0006$ by Kaplan-Meyer survival analysis). Our results show: a) high anti-leishmania IgG antibodies do not always correlate to VL development; b) sensitivity of anti-saliva antibodies is low as many exposed children (evidenced by positive anti-leishmania antibodies or positive) did not exhibit positive anti-saliva reactions. Most importantly, this large cohort study puts in evidence a statistically significant correlation between positive anti-sandfly saliva IgG antibodies and anti-leishmania cell-mediated immunity.

Keywords: Human visceral Leishmaniasis; Anti-sandfly saliva antibodies; anti-leishmania antibodies; anti-leishmania delayed-type hypersensitivity

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de enfermidades parasitárias que se encontram entre as seis endemias mundiais de prioridade para a Organização Mundial da Saúde (O.M.S.), estando presente em áreas tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e Europa. A estimativa é de 12 milhões de pessoas infectadas e aproximadamente dois milhões de casos novos por ano em todo mundo. Destes, 1.500.000 são casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 500.000 de visceral (LV). Dos casos de LV, registrados em todo o mundo, 90% ocorrem em cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; 2002). Em algumas regiões do mundo tem sido observado um aumento no número de casos de LV, sendo este atribuído a fatores tais como mudanças no comportamento humano e ambiental, incluindo migração da área rural para a urbana, crescimento acelerado e não planejado, desmatamento e construção de represas. Acrescenta-se a estes fatores, os de risco individual como a má nutrição e a imunossupressão (TDR, 2004).

No Brasil, o aumento de casos e a expansão da infecção por *L. chagasi* tem sido crescente e intensificada pelo fenômeno da urbanização. Fatores socioambientais, como o desmatamento, reduzindo a disponibilidade de animais silvestres como fonte de alimentação para o vetor, colocando assim, o cão e o homem como alternativas alimentares, e o processo migratório, que trouxe para a periferia das cidades populações (humana e canina) originárias de áreas rurais onde a doença era endêmica, contribuem não só para o aumento do número de casos, mas também para a expansão geográfica da doença (COSTA et al., 1990; JERÔNIMO et al., 1994; MONTEIRO, et al.; 1994; SIMPLÍCIO et al., 2002).

No Brasil, a LV é uma doença endêmica. Das 27 Unidades Federadas do País, 20 (74,1%) já notificaram casos, incluindo a periferia de grandes cidades do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste e em localidade onde até 2005 não havia registros, como observado no Distrito Federal. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, os dados acumulados no período de 1980

a 2005 totalizaram 60.969, com uma letalidade de 5,1%, variando de 3,1% a 21,3%. Os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí, detêm 77,5% dos casos registrados no território nacional. A maior incidência é em menores de dez anos de idade, sendo 41% dos casos em crianças com idade inferior a cinco anos. Esses dados tornam essa endemia uma prioridade de saúde pública no Brasil, não só nos estados com maior número de casos, como também, naqueles onde a doença foi recentemente registrada, devido à possibilidade de maior expansão da mesma (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; BRASIL, 2004; 2005; 2006; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2002).

A doença que, inicialmente, apresentava um perfil predominantemente rural, veio aos poucos, adquirindo característica periurbana e hoje se encontra presente em bairros urbanizados de grandes cidades, entre elas Rio de Janeiro – RJ, Teresina - PI, São Luís - MA, Belo Horizonte e Montes Claros – MG (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; MARZOCHI, 1994; TESH, 1995; BRASIL, 2004).

No estado do Maranhão, embora os primeiros relatos de casos de LV datem de 1934, a epidemia teve início em 1982, com posterior aumento de casos a cada ano, somando, até o ano de 2005, 8.484 casos, o que corresponde a 13,9% do total registrado no País. Nos anos de 2002 e 2003, o Estado ocupou o primeiro lugar do Brasil, sendo responsável por 25,8% e 48,5%, respectivamente, dos casos notificados na região Nordeste. Embora a maioria dos casos seja proveniente de municípios que compõem a ilha de São Luís (São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa) a LV tem se expandido para outros municípios do Estado com casos notificados em 139 (64,1%) dos 217 municípios existentes (ALVIM et al., 1986; COSTA, et al., 1995; NASCIMENTO et al., 1996; SILVA, et al., 1997; CALDAS, 2004; SES-MA, 2006).

Para BUSS (2000) a má distribuição de renda, o analfabetismo e o baixo grau de escolaridade, assim como, as condições precárias de habitação e ambiente têm um papel importante nas condições de vida e saúde da população, particularmente, em países como o Brasil e outros da América Latina.

As precárias condições socioeconômicas, ambientais e hábitos de vida observados em áreas endêmicas de LV, são relevantes na epidemiologia da doença e parecem favorecer a manutenção do ciclo de transmissão da mesma. Na Ilha de São Luís-Maranhão, os focos da doença se localizam em regiões periurbanas originadas de áreas invadidas e ocupadas à custa de desmatamentos, contribuindo assim para uma maior exposição ao vetor da doença (COSTA et al., 1995; NASCIMENTO et al., 1996; GAMA et al., 1998; CALDAS et al., 2001).

Do ponto de vista epidemiológico, a LV pode apresentar-se em dois ciclos de transmissão, o silvestre e o domiciliar ou peridomiciliar. No ciclo silvestre estão envolvidos o vetor *Lutzomyia longipalpis* e os reservatórios, as raposas (*Dusicyon vetulus* – no Nordeste e Sudeste brasileiro e *Cerdocyon thous* na Amazônia) e os marsupiais (*Didelphis albiventris* – Brasil). O homem e o cão (*Canis familiaris*) podem adquirir a infecção penetrando nesse habitat. No ciclo domiciliar ou peridomiciliar o cão infectado passa a ser a principal fonte de infecção para o *Lu. longipalpis*, que a transmite ao homem (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; REBÊLO, 1999; BRASIL, 2004).

Vinte espécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem e 30 espécies de flebotomíneos têm sido identificados como vetores (SHAW, 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; OPAS, 2002). Os parasitas responsáveis pela LV são protozoários da família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania*, sendo conhecidas três espécies que causam a doença: *Leishmania (L.) donovani*; *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) chagasi* que é a espécie mais isolada em pacientes com LV no Novo Mundo. Atualmente alguns autores consideram a *L. chagasi* e *L. Infantum* como similares sob o ponto de vista genético (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; MAURÍCIO et al., 2001; BRASIL, 2004).

No Mediterrâneo e Américas do Sul e Central, a LV ocorre com maior frequência em crianças, na maioria do gênero masculino. Já na África Central e Oriental, os adultos são os mais acometidos pela doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

A *Leishmania* é transmitida pela picada de insetos fêmeas da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, sendo os do gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África). A espécie *Lu. longipalpis* é a mais importante transmissora da LV nas Américas e constitui o elo de ligação entre reservatórios e o homem, que se comporta como hospedeiro acidental da *L. chagasi* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; REBELO et al., 1996). No Brasil, a única espécie de flebotomíneo relacionada à transmissão da LV era a *Lu. longipalpis*. Recentemente uma outra espécie, a *Lutzomyia cruzi* tem sido incriminado como vetor de *L. chagasi* em Corumbá-MS (GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998).

Os flebotomíneos são pequenos insetos cor do tipo palha ou castanho claro, com corpo piloso, cujo comprimento raramente ultrapassa 0,5 cm. Locomovem-se em vôos saltitantes, mantendo as asas eretas durante o repouso. Em seu ciclo de desenvolvimento, passam por uma evolução completa que compreende quatro estágios: ovo, larva, pupa, e inseto adulto, sendo por isso, denominados de holometábolos. O ciclo completo de evolução varia de 28 a 36 dias, e a oviposição, geralmente, se inicia no quinto dia após alimentação com sangue. Cada fêmea produz em torno de 24 a 52 ovos (RANGEL et al, 1986; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; REBÊLO, 1999; KILLICK-KENDRICK, 1999).

Quando adultos (machos e fêmeas), alimentam-se de substâncias que contêm carboidratos. As fêmeas possuem hábito hematofágico porque necessitam de suprimento sanguíneo, para a maturação do ovário e desenvolvimento dos ovos, obtendo-o em uma ampla variedade de vertebrados (DEANE & DEANE, 1962; SHERLOCK & GUITTON, 1969a; DIAS et al., 2003).

O *Lu. longipalpis* possui hábitos crepusculares e noturnos. É estimado que o seu alcance de vôo não ultrapasse 100 metros num período de 24 horas (ALEXANDER, 1987). Sua atividade começa ao entardecer, atingindo seu pico entre 21 e 23 horas, desaparecendo em torno das 5 horas da manhã. Dentro das residências, as fêmeas podem ser encontradas após este horário, nas paredes sombrias dos quartos ou sobre quadros e frestas (DEANE & DEANE, 1962; SHERLOCK & GUITTON, 1969b; ARIAS et al., 1996; DIAS et al., 2003).

Durante o repasto sangüíneo sobre o hospedeiro infectado são ingeridas, pelas fêmeas do flebotomíneo, as formas amastigotas. Após a ingestão, o alimento começa então, a ser envolvido por uma estrutura secretada no epitélio denominada de matriz peritrófica (WALTERS, 1993; WALTERS et al., 1995; PIMENTA et al, 1997). Inicialmente, o sangue ingerido juntamente com as formas em divisão, vai localizar-se no intestino médio do inseto, protegido pela matriz peritrófica, onde permanece durante 3 dias. Após este período, ocorre a degeneração da matriz peritrófica e migração das formas promastigotas para o segmento anterior do tubo digestivo onde sofre mais divisões e diferenciação tornando-se infectantes. Durante os próximos dias os parasitas migram para a região anterior do trato digestivo, principalmente, válvula estomodeal. A cada novo repasto sangüíneo o relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção provoca o refluxo dos parasitas, infectando o novo hospedeiro (LAINSON & SHAW, 1978; MARZOCHI et al, 1981).

Quando o flebotomíneo infectado pica outro hospedeiro, animal ou homem, libera as formas promastigotas, que serão fagocitadas por células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM). No interior dos macrófagos, dentro do vacúolo parasitóforo, se diferenciam em amastigotas, e multiplicam-se intensamente por divisão binária, até que a célula se rompa liberando novos parasitas que serão novamente fagocitados por outros macrófagos. Esse processo se dá de forma continua resultando em disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do SFM, tais como: linfonodos, fígado, baço e medula óssea (CARVALHO et al., 1995).

1.1 Aspectos clínicos e imunológicos

A resposta imune do hospedeiro à penetração da *Leishmania*, se inicia com uma resposta inflamatória inespecífica, com acúmulo de leucócitos no sítio da infecção. As primeiras células a migrarem para o local da infecção são os polimorfonucleares neutrófilos (PMNs); estes fagocitam as formas promastigotas que poderão ser destruídas por enzimas proteolíticas e

produção de óxido reativo (PEARSON & STEIGBIGEL, 1981; CHANG, 1981; LIMA et al., 1998; MULLER et al., 2001).

Os neutrófilos infectados secretam Interleucina 8 (IL-8) e “macrophage inflammatory protein 1- β ” (MIP-1 β) que atraem mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção (SCAPINI et al, 2000; LAUFS et al., 2002). Cerca de vinte e quatro horas após a infecção, as células natural killer (NK) alcançam o sítio da infecção (MULLER et al., 2001). Tem sido descrito que as células NK são fontes de interferon gama (IFN- γ), o qual auxilia na diferenciação da sub-população de células CD4+ e induz resistência à *L. major* em camundongos (SCHARTON & SCOTT, 1993).

A penetração da *Leishmania* no macrófago, segundo grupo de células a entrar no sítio da infecção, é fundamental para o estabelecimento da infecção. Sua adesão na célula alvo é pré-requisito para a fagocitose, que ocorre principalmente através de interação entre receptores celulares do hospedeiro (CR1, CR3) e moléculas da superfície do microorganismo, os lipofosfoglicanos (LPG) e a protease de superfície (gp63) (HADMAN & BULLEN, 2002; ZAMBRANO-VILLAS et al., 2002).

A internalização das leishmanias nos macrófagos resulta em uma série de reações bioquímicas que podem ativar ou inibir as funções das células hospedeiras. O principal mecanismo para a destruição da *Leishmania* é a ativação do macrófago em resposta ao IFN- γ . Este passa, além de produzir metabólitos tóxicos de oxigênio tais como óxido nítrico (NO), superóxido (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (ASSREUY et al., 1994), a liberar diferentes tipos de citocinas (TNF α , IL-6; IL-12 e IFN- γ) (REIMANN et al., 1994; HIROHASHI & MORRISON, 1996; KATO, et al., 1997; MUNDER et al., 1998).

A análise do padrão de citocinas produzida por clones de células TCD4+ murina forneceu entendimento da regulação imune às infecções. A resposta imune de resistência versus suscetibilidade, nos modelos murinos de infecção intracelular, parece ser regulada por duas subpopulações de células T: Th1 e Th2 (MOSMANN et al., 1986). As células Th1 produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (IFN- γ) e aumentam a imunidade mediada por células (CHER & MOSMANN, 1987). O IFN- γ ativa macrófago, e IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais

branda ou cura. As células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e aumentam a resposta humoral (STEVENSON et al., 1988). IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem ativação de macrófago resultando em infecção progressiva (SIELING & MODLIN, 1994).

Tem sido demonstrado que a suscetibilidade à infecção pela *Leishmania* (visceral ou cutânea), em humanos, está associada à expansão das células TCD4+ do subtipo Th2, principalmente pela secreção de IL-4 e IL-10. Por outro lado, a expansão do subtipo Th1, com a produção de IL-2, IL-12 e IFN- γ , está relacionada à resistência (CARVALHO et al., 1985).

No homem a LV apresenta um período de incubação longo, variando de 10 (dez) dias a 24 (vinte e quatro) meses, com média de dois a seis meses. Este período é extremamente variável e depende de vários fatores, entre eles; a virulência da cepa de *L. chagasi*, a dose de inóculo, característica genética do hospedeiro e do seu estado nutricional e de imunidade (TEIXEIRA, 1980; BADARÓ et al., 1986a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

A doença ativa se caracteriza por febre intermitente e perda de peso e, sem tratamento específico, os pacientes desenvolvem acentuada hepato-esplenomegalia, anemia, hemorragias e leucopenia, o que aumenta o risco de óbito por infecções bacterianas. No período final, a febre se torna contínua, há comprometimento do estado geral e surgem sinais de desnutrição (ANDRADE et al., 1990; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). No Brasil, a maior frequência da doença é observada em menores de 10 anos (54,4%) sendo que 41,1% dos casos ocorrem em crianças com idade inferior a cinco anos. A imaturidade imunológica associada à desnutrição, comum entre criança de áreas endêmicas, e maior exposição ao vetor no peridomicílio podem justificar a maior suscetibilidade desta faixa etária (BADARÓ et al. 1986b; BRASIL, 2004).

Os aspectos clínicos incluem: infecções inaparentes ou assintomáticas e doença clinicamente manifesta (períodos inicial, de estado e final). A forma assintomática ou inaparente é a apresentação mais frequente da LV. As manifestações clínicas não são evidentes, sendo o diagnóstico

realizado por exames sorológicos e/ou intradermorreação de Montenegro (IDRM) positivos (BADARO et al., 1986a; BRASIL, 2004).

Cerca de 20% dos indivíduos Infectados podem evoluir para a LV clássica e os demais, permanecer assintomáticos ou evoluir para a forma oligossintomática (BADARÓ et al., 1986a). Em áreas endêmicas, tem sido observado que muitas crianças estão infectadas e que uma pequena proporção apresenta, no período inicial, a forma oligossintomática, evoluindo freqüentemente para cura (TEIXEIRA, 1980; BADARÓ et al., 1986a; GAMA et al., 2004a).

Acredita-se que a evolução para cura espontânea nos casos oligossintomáticos, se deve à presença de resposta imunecelular (CARVALHO et al., 1992; Gama et al., 2004a, b). CARVALHO et al., (1992) documentaram a presença de resposta do tipo Th1 em crianças infectadas por *L. chagasi* mostrando capacidade de controlar a infecção ou a doença mesmo na ausência de tratamento, indicando que a resposta celular é fundamental para impedir a multiplicação do parasita e, conseqüentemente, a progressão da doença.

Ao contrário, nos que desenvolvem a doença, são observados, na fase ativa, altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, supressão da resposta celular, com ausência de resposta de hipersensibilidade tardia (RHT) ao antígeno de *Leishmania* (BADARÓ, et al., 1985; PEARSON & SOUSA, 1996; CALDAS et al., 2005; 2006) e, *in vitro*, linfoproliferação deficiente, ausência de produção de IL-2 e IFN- γ , quando as células são estimuladas com antígenos de *Leishmania* e ativação policlonal de linfócito B (CARVALHO et al., 1985; CARVALHO et al., 1994; CALDAS et al., 2005; 2006).

Com terapêutica eficaz e cura da doença, o teste de IDRM torna-se positivo em meses (ZIJLSTRA & EL HASSAN, 1993; CALDAS, 2004) ou mesmo anos após tratamento (BADARÓ, et al., 1985).

O diagnóstico da LV deve ser realizado o mais precocemente possível, sendo baseado nos achados clínicos, exames laboratoriais inespecíficos, diagnóstico imunológico e parasitológico. Os achados clínicos variam desde a presença de febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia, observados no período de

estado (fase aguda), até sinais e sintomas mais intensos tais como anemia severa, febre contínua e comprometimento do estado geral. Observa-se ainda trombocitopenia, leucopenia e inversão da relação albumina/globulina. (TEIXEIRA, 1980; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1997, 2002; BRASIL, 2004).

Os exames imunológicos, mais utilizados no Brasil, são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). O ELISA permite a análise rápida de um grande número de amostras, sendo a sensibilidade (36% a 100%) e especificidade (85% a 100%) influenciadas pelo antígeno utilizado (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1997; SINGH & SIVAKUMAR, 2003; BRASIL, 2004; SINGH, 2006;).

A visualização direta do parasita em aspirado de medula óssea, fígado ou linfonodos, embora relatada como método de diagnóstico definitivo, pode apresentar-se negativa. Na vigência de uma pesquisa do parasita negativa, o diagnóstico presuntivo deve ser estabelecido a partir dos achados sorológicos associados á dados clínicos e laboratoriais (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1997; BRASIL, 2004).

Para o tratamento são empregados, como drogas de primeira escolha, compostos antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) sendo o antimoniato-N-metil glucamina a única formulação disponível no Brasil. A droga pode ser administrada via endovenosa ou intramuscular na dosagem de 20 mg/ Sb^{+5} Kg/dia, por no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias. Como droga de segunda escolha, é utilizada anfotericina B (BRASIL, 2004).

1.2 Saliva do flebotomíneo.

Uma variedade de substâncias encontrada na saliva dos artrópodes que se alimentam de sangue é responsável pelo sucesso na obtenção do mesmo. Essas substâncias incluem, entre outras, moléculas com atividades anti-coagulante, anti-inflamatória, anti-histamínica e vasodilatadora

que facilitam a aquisição do sangue, por diminuírem a percepção do hospedeiro vertebrado e interferirem no processo da hemostasia (RIBEIRO, 1987; TITUS & RIBEIRO, 1990; RIBEIRO, 1995).

Substâncias salivares dos flebotomíneos têm sido identificadas e caracterizadas através de vários estudos. RIBEIRO et al., (1986) forneceram informações preliminares sobre a influência da saliva do *Lu. longipalpis*, na aquisição de sangue para a alimentação do flebotomíneo. Um novo e potente peptídeo vasodilatador, encontrado apenas na saliva do *Lu. longipalpis* foi relatado por RIBEIRO et al (1989), isolado e denominado de Maxadilan (LERNER et al, 1991). O Maxadilan é o principal vasodilatador presente na saliva (RIBEIRO et al., 1989; LERNER et al., 1991) e sua influência na infecção por *Leishmania* é semelhante à da saliva total (MORRIS et al., 2001).

Além do Maxadilan outras substâncias, entre elas, a apirase salivar; a 5' nucleotidase - enzima que hidrolisa AMP formando adenosina, composto com atividades imunossupressoras, vasodilatadoras e antiplaquetária; adenosina deaminase - enzima que converte a molécula de adenosina para inosina, composto com múltiplos efeitos antiinflamatórios (CHARLAB et al., 1999, 2000) estão presentes na saliva do *Lutzomyia longipalpis*.

A importância da saliva dos flebotomíneos na infecção por *Leishmania* tem sido demonstrada em diversos estudos. Os flebotomíneos injetam os parasitos no hospedeiro vertebrado junto com sua saliva. A saliva contém um repertório variado de moléculas que modulam as respostas hemostática, inflamatória e imune de seus hospedeiros. Em camundongos, produtos salivares de *Lutzomyia longipalpis* (*Lulo*) ou *Phlebotomus papatasi* exacerbam a infecção por *Leishmania major* (THEODOS et al., 1991; BELKAID et al, 1998; MBOW et al., 1998; MORRIS et al., 2001).

O poder exacerbatório da saliva do *Lu. longipalpis* na infecção por *L. major* pode ser decorrente das atividades do Maxadilan sobre os macrófagos. Fatores associados com a eliminação do parasita como a produção de Óxido Nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) liberados por macrófagos ativados, foram inibidos pelo Maxadilan (TITUS et.al, 1994). Em macrófagos de camundongos estimulados por Lipopolissacarídeo (LPS), o Maxadilan modulou a produção de

citocinas estimulando as do padrão de resposta do tipo Th-2, como a IL-6 e inibindo a produção de TNF- α , molécula fundamental para a destruição da *Leishmania* (SOARES et al., 1998).

Além da exacerbação da infecção, a saliva dos flebotomíneos parece influenciar a produção de citocinas. MBOW et al, (1998), mostraram que em camundongos resistentes à infecção, o Sonicado de Glândula Salivar (SGS) de *Phlebotomus papatasi* quando inoculado juntamente com *L. major* resultou no aumento da expressão de RNAm de IL-4 e inibiu a produção de RNAm de Interferon- γ (IFN- γ), IL-12 e óxido nítrico-sintetase indutível (iNOS) bloqueando o desenvolvimento da resposta protetora Th1.

Um aumento na produção de citocina do padrão Th2 também foi documentado quando a saliva do *Lu. longipalpis* foi co-inoculada com *L. amazonensis* sendo fornecidas evidências de que a exacerbação da infecção correlacionou-se com o aumento da produção de IL-10 pelas células T e macrófagos (NORSWORTHY et al., 2004).

A saliva dos flebotomíneos foi capaz de aumentar a infectividade em estudos realizados com outras espécies de *Leishmania* (THEODOS et al., 1991; SAMUELSON et al., 1991; WARBURG et al., 1994; LIMA & TITUS, 1996; NORSWORTHY et al, 2004).

Foi demonstrado também, que a *Leishmania brasiliensis* que normalmente, não estabelece infecção em camundongos, causa lesões cutâneas progressivas em camundongos BALB/c quando inoculada em associação com lisado de glândula salivar do flebotomíneo (SAMUELSON et al., 1991).

Embora os componentes salivares do flebotomíneo exacerbem a infecção por *Leishmania*, tem sido documentado que a pré-exposição a estes componentes ou a picadas de flebotomíneos conferem proteção contra a infecção. Em um modelo natural de leishmaniose cutânea (LC), desenvolvido por BELKAID et al (1998) a co-inoculação do sonicado de glândula salivar do *Phlebotomus papatasi* com promastigotas metacíclicas de *L. major*, na derme da orelha dos camundongos, resultou na exacerbação da infecção tanto nos susceptíveis quanto nos resistentes à infecção por *L. major*. Esse efeito foi completamente eliminado em camundongos pré-expostos aos componentes da saliva. Nesse mesmo modelo os autores verificaram também que os anticorpos

anti-saliva produzidos por animais sensibilizados neutralizaram o efeito exacerbatório da infecção pela saliva.

Em camundongos BALB/c a exposição freqüente a picadas de *Lu. longipalpis* resultou na produção de anticorpos IgG anti-saliva. Nos animais pré-expostos, a injeção de SGS induziu um infiltrado inflamatório e recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos mais intensos do que no grupo não exposto demonstrando que a saliva promove uma resposta inflamatória inicial, que poderia criar um ambiente Inóspito para o estabelecimento do parasita nos hospedeiros mamíferos (SILVA et al., 2005)

Camundongos pré-expostos a picadas de flebotomos não infectados ficaram protegidos contra a infecção por *Leishmania major* sendo esta proteção associada a uma forte reação de hipersensibilidade tipo tardia (DHT) e produção de IFN- γ (KAMHAWI et al., 2000).

BELKAID et al, (2000) investigando o efeito de picadas por *Phlebotomus papatasi* em humanos e camundongos, previamente sensibilizados pelas picadas deste flebotomíneo, observaram que ambos desenvolveram uma DHT e apresentaram um aumento local do fluxo sanguíneo, após a picada. A caracterização da resposta celular em camundongos sensibilizados mostrou acúmulo de monócitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos CD4 nos infiltrados, sendo a DTH dependente de células CD4⁺. Estes resultados sugerem que o SGS usado para a sensibilização é uma fonte de antígeno.

VALENZUELA et al (2001) caracterizaram 9 proteínas salivares de *P. papatasi*. Um componente 15 kDa foi capaz de conferir proteção a camundongos desafiados com parasitas mais homogeneizado de glândula salivar (SGH). Uma vacina de DNA contendo o cDNA para a proteína de 15 kDa conferiu proteção contra a infecção por *Leishmania*.

Experimentos mostraram que camundongos geneticamente deficientes de célula B, quando desafiados com uma vacina de DNA contendo o gene para a proteína de 15 kDa (Pps15) do homogeneizado de glândula salivar de *P. papatasi* ficaram protegidos contra um novo desafio por *L. major* mais homogeneizado de glândula salivar (VALENZUELA, et al., 2001).

MORRIS et al (2001) verificaram que em camundongos, a exacerbação da infecção por *L. major* ocorreu tanto com o lisado de glândula

salivar, quanto com o Maxadilan e que, a vacinação prévia dos animais com este componente salivar, resultou na produção de anticorpos anti-Maxadilan que se relacionou à proteção do animal contra Infecção por *Leishmania*. Dosagens de IFN- γ e Óxido Nítrico (NO) realizadas nas células (na sua maioria CD4) de linfonodos regionais destes animais, resultarem em quantidades significativas desses produtos. Portanto, nos camundongos vacinados, resposta celular e humoral foram estimuladas.

A proteção conferida pelos componentes salivares do flebotomíneo poderia ser decorrente da neutralização pelos anticorpos formados, dos componentes da saliva responsáveis pelo estabelecimento do patógeno (BELKAID et al., 1998; MORRIS et al., 2001; VALENZUELA et al., 2001). Alternativamente, a imunidade poderia derivar de uma DTH, deixando o local inóspito para o estabelecimento da *Leishmania* (BELKAID et al, 2000; KAMHAWI et al, 2000). A capacidade de anticorpos anti-saliva em neutralizar a bioatividade de componentes salivares também tem sido observada em camundongos desafiados com picadas repetidas do inseto *Anopheles stephensis* (MATHEWS et al., 1996) e em hamsters (*Mesocricetus auratus*) expostos a picadas de *Phlebotomos argentipes* (GHOSH & MUKHOPADHYAY, 1998).

Os estudos que buscam elucidar o papel da saliva dos flebotomíneos ou de seus componentes na infecção por *Leishmania*, são na maioria das vezes, restritas a modelos murinos ou, se em humanos, voltados para o estudo da atividade imunomodulatória em células de doadores humanos saudáveis ou “naive” à infecção por *Leishmania* (SAMUELSON et al., 1991; THEODOS et al., 1991; WARBURG et al., 1994; LIMA & TITUS, 1996; BELKAID et al, 1998; MBOW et al., 1998; SOARES et al., 1998; BELKAID et al., 2000; MORRIS et al., 2001; COSTA et al., 2004; NORSWORTHY et al., 2004).

COSTA et al., 2004, estudaram os efeitos do SGS de *Lu. longipalpis* na resposta imune humana em células de doadores saudáveis tratadas com SGS e estimuladas ou não, com LPS e verificaram que o SGS promoveu a síntese de IL-6, IL-8 e IL-12p40, inibiu a secreção de IL-10 e TNF- α em monócitos e afetou a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e

CD86) na superfície de monócitos e macrófagos sugerindo que o SGS afeta a resposta imune.

BARRAL et al, 2000 e GOMES et al, 2002 mostraram que crianças residentes em uma área endêmica para LV, não só reconhecem proteínas salivares do *Lu. Longipalpis*, como produzem anticorpos anti-saliva do flebotomíneo, não havendo produção de anticorpos IgG contra a saliva de *P. papatasi* e *L. whitmani* nos indivíduos testados, sugerindo especificidade da resposta anti-*Lutzomyia longipalpis*. Foi observada ainda, uma correlação positiva entre anticorpos anti-saliva do flebotomíneo e uma DTH positiva e que, os soros humanos reconheceram, principalmente, algumas proteínas.

Os resultados apresentados em alguns estudos sugerem que componentes da glândula salivar do flebotomíneo podem ser potenciais candidatos à vacina contra a leishmaniose humana (MORRIS et al., 2001; VALENZUELA al., 2001).

2 JUSTIFICATIVA

A LV se constituiu um sério problema de saúde pública em várias regiões do mundo. No Brasil, a importância da doença está relacionada não apenas à sua alta incidência, urbanização e ampla distribuição, mas também à possibilidade de assumir formas graves que podem evoluir para o óbito (BRASIL, 2004).

A letalidade que nos anos de 1980 e 1981 ocorreu respectivamente, em 23,8% e 10,8% dos casos, sofreu redução nos anos seguintes com variações de 3,1% a 8,9%. Embora tenha sido observada redução na letalidade verifica-se, no período de 2000 a 2003, um aumento crescente no percentual de casos que evoluíram para o óbito: 3,1% em 2000, 5,9% em 2001, 7,3% em 2002 e 8,9% em 2003, sugerindo que as medidas relacionadas ao diagnóstico e tratamento não estão sendo efetivas (BRASIL, 2005).

As principais estratégias de controle para esta endemia incluem o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos, medidas dirigidas para o vetor e o reservatório canino, e atividades de educação em saúde. Entretanto, apesar da execução das medidas tradicionais de controle, estas não se mostraram eficazes na redução do número de casos da doença que mantém um caráter epidêmico na maioria dos estados do Brasil e expande-se no território nacional. Mais de três mil casos novos de LV por ano foram notificados no período de 1999 a 2005 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; BRASIL, 2004, 2005). Assim, a busca de novas ferramentas que possam contribuir de forma determinante e eficaz para o combate às leishmanioses é fundamental. Entre essas novas ferramentas, se incluem a descoberta e desenvolvimento de novas drogas, de testes diagnósticos mais rápidos com alta sensibilidade e especificidade, e de ampla aplicação no campo, e de possíveis candidatos a vacinas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Na perspectiva de descoberta de novas ferramentas, o vetor da leishmaniose deixa de ter um papel meramente relacionado à transmissão do agente etiológico e surgem evidências de que a saliva dos flebotomíneos influencia o curso da infecção. Vários estudos realizados em modelos murinos elucidaram o papel dos componentes salivares dos flebotomíneos, não só na exacerbação da infecção quando co-inoculada juntamente com a *Leishmania* (THEODOS et al., 1991; WARBURG et al., 1994; LIMA & TITUS, 1996; SAMUELSON et al., 1991; BELKAID et al, 1998; MBOW et al., 1998; MORRIS et al., 2001; NORSWORTHY et al, 2004), quanto no papel protetor dos componentes salivares, quando da pré-exposição a picadas dos flebotomíneos ou da pré-inoculação de seus componentes salivares e ainda, vacinação com proteínas salivares (BELKAID et al., 1998, 2000; VALENZUELA et al., 2001; MORIRS et al., 2001; KAMHAWI et al, 2000).

Embora o efeito dos componentes salivares na resposta imune humana em doadores saudáveis tenha sido demonstrado (COSTA et al., 2004) poucas informações existem sobre o efeito da saliva do *Lu. longipalpis* na resposta imune de populações residentes em área endêmica de LV.

Estudos realizados por BARRAL et al., (2000) e GOMES et al., (2002) em área endêmica de LV demonstraram que crianças desenvolvem anticorpos anti-saliva do *Lu. Longipalpis* e que há associação entre os anticorpos e positividade ao IDRM. Nesses estudos, entretanto, foi escolhida um amostra de 60 crianças entre 648 que participaram de outro estudo realizado na área, sendo a pesquisa de anticorpos anti-saliva repetida após um intervalo de seis meses. Considerando a amostra e o intervalo para a repetição do exame, há necessidade de um estudo envolvendo maior número de crianças, com um período mais longo de observação para que seja verificada, em populações expostas ao risco de LV, a frequência de produção de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis* e sua relação com a resposta imune medida pela positividade ao IDRM, o que justifica a importância do nosso estudo.

3 OBJETIVOS

Geral

Estudar a infecção por *L.(L.) chagasi* e associação entre anticorpos anti-saliva da *Lutzomyia longipalpis* e o teste cutâneo anti-*Leishmania* em crianças residentes em áreas endêmicas de leishmaniose visceral.

Específicos

Descrever os aspectos demográficos, epidemiológicos e ambientais da população estudada.

Estimar a prevalência e incidência de infecção por *L.(L.) chagasi*, na área de estudo.

Identificar possíveis fatores associados à infecção por *L.(L.) chagasi*.

Avaliar a produção de anticorpos IgG contra a *L. chagasi* e saliva do *Lu. longipalpis*.

Verificar se a presença de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis* se associa à imunidade mediada por células, medida pela positividade ao IDR. M.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo coorte prospectivo com crianças menores de dez anos de idade residentes em duas áreas endêmicas de LV (Vila Nova e Bom Viver), no município da Raposa-MA, no período de janeiro de 2003 a junho de 2005.

4.1 Descrição da área de estudo

A Ilha de São Luís situa-se no litoral setentrional brasileiro a 2°32'S e 44° e 43'W, sendo separada do continente pelo Estreito dos Mosquitos. É constituída por terras baixas, se elevando a uma altitude média de 4m acima do nível do mar onde está localizado São Luís, a capital do estado do Maranhão. O litoral é recortado com largos estuários e relevos residuais de pequena altitude. Limita-se ao norte com o Oceano Atlântico, a oeste com a Baía de São José de Ribamar e do Arraial, ao sul com Estreito dos Mosquitos e a leste com a Baía de São Marcos (IBGE, 2004).

A Ilha possui uma área territorial de 905 km² e é constituída pelos municípios de São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa (IBGE, 2004). O clima é tropical quente e úmido, com duas estações bem definidas. A chuvosa, de janeiro a junho, na qual os meses de março e abril são os mais importantes, concentrando em média, cerca de 94% do total anual das chuvas; a estação seca, de julho a dezembro, em que os meses de setembro e outubro, os mais secos, concentrado apenas 6% das chuvas anuais. O índice pluviômetro é elevado, em torno de 1.900mm anual em média, a umidade relativa do ar é de ±77,0%. A temperatura é elevada durante todos os meses do ano, sendo a mínima de 23°C e a máxima de 33,3°C(média de 26°C) (IBGE, 2004).

As áreas selecionadas para o estudo foram as localidades de Vila Nova e Bom Viver, no município de Raposa, que se localiza na Ilha de São Luís, ao norte do Estado do Maranhão a uma distância de 28 km da cidade de São Luís, capital do Estado (Figura 1).

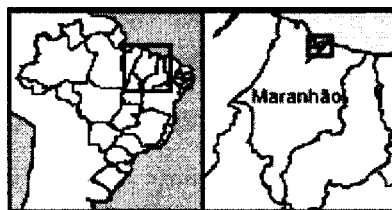
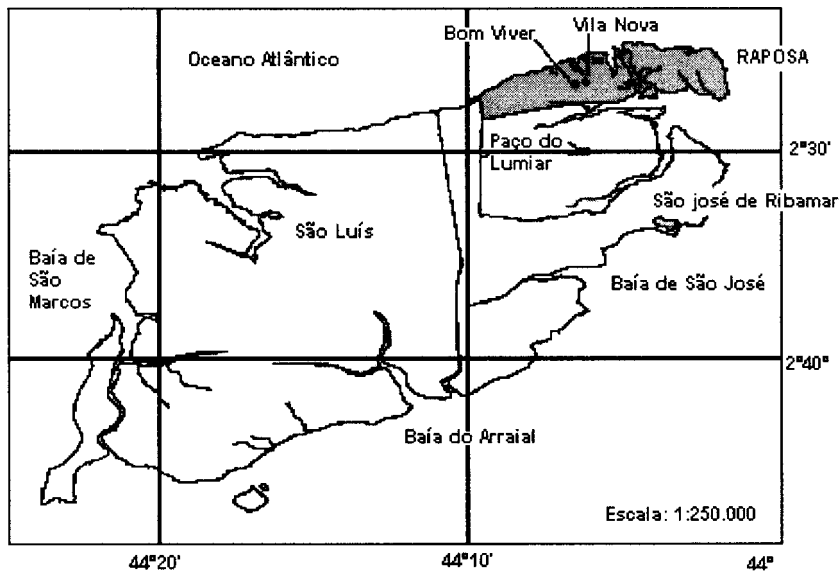


Figura 1. Mapa da Ilha de São Luís, mostrando a localização das áreas de estudo - Vila Nova e Bom Viver, município da Raposa - MA (Adaptado de DIAS et al, 2003).

O município se emancipou de Paço do Lumiar pela lei estadual nº 6.132, de 10 de dezembro de 1994. Apresenta uma área territorial de 63,9 Km² limitando-se ao norte e a oeste com o Oceano Atlântico e ao sul e a leste, com o município de Paço do Lumiar. O clima é quente e úmido, com temperatura média anual em torno de 28°C, apresentando duas estações bem definidas, uma de estiagem (julho a novembro) e outra chuvosa (dezembro a junho) a qual concentra, em média, 94% do total anual das chuvas (IBGE, 2004). O município possui população de 21.345 habitantes distribuídos em 29 localidades, sendo 5 urbanas e 24 rurais. A organização política do município é representada por várias vilas e povoados, dentre os quais se destacam: Alto do

Farol, Araçagi, Curupu, Vila Pirâmide, Maresia, Vila Nova e Vila Bom Viver (IBGE, 2004; FUNASA, 2005).

As localidades de Vila Nova e Bom Viver têm populações estimadas respectivamente em 2.600 e 4.307 habitantes. São localidades resultantes de ocupação cuja atividade econômica baseia-se na pesca e no artesanato. As duas localidades são cobertas por equipes do Programa Saúde da Família (PSF) (FUNASA, 2005). São áreas endêmicas para leishmaniose visceral, cuja incidência, de acordo com dados disponíveis, para a faixa etária de zero a cinco anos, foi de 22,8 casos/1000 crianças em 1995, 9,4 casos/1000 crianças em 1996 e 13,3 casos/1000 crianças em 1997, com uma média de dois casos novos por mês (CALDAS, 1998; GAMA et al., 1998). Com base no inquérito populacional realizado nas duas localidades e o número de casos notificados, a incidência em crianças com idade inferior a 10 anos foi de 3,9 casos/1000 crianças em 2003 e de 2,3 casos /crianças no ano 2004.

A participação das Vilas na epidemiologia da LV no Município da Raposa-MA tem sido permanente. De acordo com os dados da SEMUS (2006) dos 154 casos registrados no período de 1998 a 2005, 69 casos (44,8%) eram procedentes das duas localidades, com maior freqüência em 1998 (24 casos) e menor em 2002 (1 caso) (Figura 2).

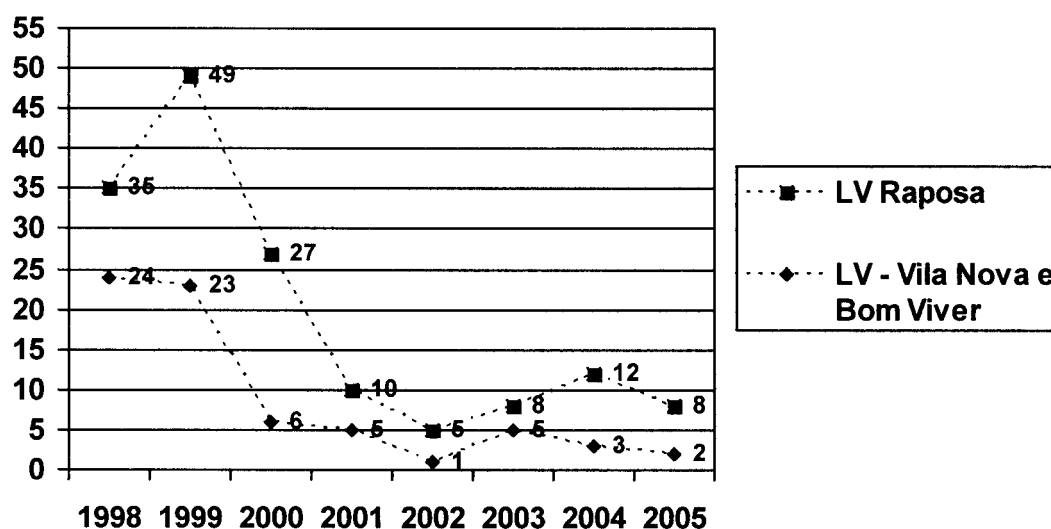


Figura 2. Casos de LV no período de 1998 a 2005, no Município de Raposa – Ilha de São Luís/Maranhão e localidades estudadas. Município de Raposa-MA, 2007.

4.2 Desenvolvimento do estudo

4.2.1 Seleção e cadastro dos participantes

Inicialmente, se realizou um inquérito populacional, por meio de visitação domiciliar, de casa em casa, se utilizando uma ficha (Apêndice 1), a fim de identificar crianças menores de dez anos de idade. Durante a visitação domiciliar foi explicado aos pais ou responsáveis pela criança, o objetivo da pesquisa com convite posterior para participarem do estudo. A partir dos dados do censo, agendou-se o dia e horário de atendimento, utilizando-se a ficha de aprazamento (Apêndice 2) que foi entregue em cada domicílio pelos agentes de saúde das áreas.

Para o estudo foram incluídas crianças que preencheram os seguintes critérios:

- Ter idade inferior a dez anos;
- Residir em Vila Nova ou Bom Viver (no município da Raposa-MA);
- Ter o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 3) assinado pelos pais ou responsáveis;
- Não ter história pregressa ou atual de LV.

4.2.2 Coleta de dados relativos à família e à criança

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) realizou-se a coleta de dados relativos à família e à criança.

Para cada criança foi preenchida uma ficha-protocolo (Apêndice 4). Os dados de identificação dos pais/responsáveis e da criança e, os aspectos sociais, demográficos, epidemiológicos e ambientais foram registrados a partir de informações fornecidas pelos pais/responsáveis.

Considerou-se “animais próximos a casa”, a presença dos mesmos a uma distância de até 100 metros do domicílio investigado.

A fim de facilitar a identificação do flebotômíneo, exemplares sem vida, capturados na área de estudo e identificados por um entomologista da

Universidade Federal do Maranhão (UFMA), foram acondicionados em uma placa de Petri forrada com filtro de papel, e mostrados, durante a coleta dos dados ambientais, à pessoa responsável pelo fornecimento das informações. Posteriormente se indagou, ao responsável, a presença de flebotômico na residência ou fora dessa.

Registraram-se também, na ficha-protocolo, os achados do exame físico da criança e resultados dos exames realizados. A avaliação clínica constou de aferição dos dados antropométricos e identificação de sinais e sintomas sugestivos de LV e/ou outras alterações, sendo a mesma realizada semestralmente com todas as crianças que permaneceram em seguimento.

Bimensalmente, as crianças eram avaliadas por uma médica pediatra ou enfermeira.

4.2.3 Coleta de sangue

Para a realização do exame sorológico (ELISA) para detectar IgG anti-saliva do *Lutzomyia longipalpis* e IgG anti-*Leishmania* em plasma humano foram coletados, após o exame físico, de 2 a 5 ml de sangue de cada criança, por meio de punção venosa periférica utilizando-se seringa descartável de 5 ml e scalp nº 23. O sangue foi colocado em tubo com EDTA, ligeiramente, homogeneizado e mantido sob refrigeração até o transporte para o Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, onde foram centrifugados e processados. O plasma foi aliqotado em ependorf devidamente identificados e datados e mantidos congelados, sendo posteriormente enviados ao Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM/FIOCRUZ) em Salvador-BA, onde foram estocados para realização dos exames após a última coleta.

4.2.4 Aplicação de Intradermoreação de Montenegro (IDRM)

O teste de IDRM foi aplicado após a coleta do sangue periférico. Aplicaram-se 0,1 ml de suspensão de promastigotas (25µg/ml) de *L. amazonenses* (BA-125) com uma seringa de 1 ml, e agulha 13 x 4,5 via

intradérmica na face anterior do antebraço direito, a mais ou menos 3 cm da dobra cubital. A leitura do IDRМ foi realizada pela técnica de SOKAL *et al.* (1975) 48-72 horas após a aplicação do teste. Considerou-se positivo quando um dos diâmetros da enduração foi igual ou superior a 5 mm.

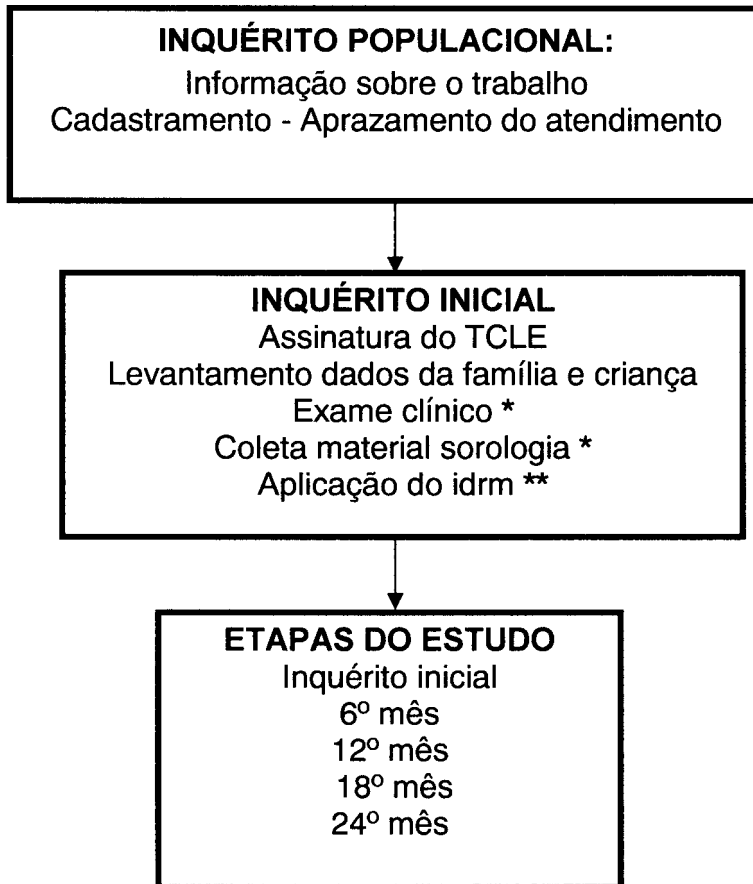
O IDRМ foi aplicado por profissionais com experiência em testes cutâneos (uma enfermeira e uma técnica de laboratório), sendo a leitura realizada por estes profissionais, duas acadêmicas de enfermagem e uma auxiliar de enfermagem, previamente, treinadas.

4.2.5 Etapas do estudo

O estudo foi iniciado em janeiro de 2003 e desenvolvido em cinco etapas, com intervalos de seis meses entre as mesmas. Semestralmente, realizou-se o exame físico e a coleta de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-saliva do *Lu. longipalpis*. A fim de evitar sensibilização pelo IDRМ, o mesmo foi realizado anualmente e, no seguimento das crianças, a positividade ao teste foi utilizada como critério de exclusão do estudo.

O acompanhamento clínico das crianças foi realizado bi-mensalmente. Aquelas com alteração simples de saúde foram tratadas pela equipe da pesquisa ou pediatra do município da Raposa; os casos mais complexos foram encaminhados ao Hospital Universitário Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão ou ao Ambulatório de Patologia da Universidade Federal do Maranhão. A figura 3 sumariza as atividades e etapas do estudo.

Figura 3. Fluxograma do desenvolvimento do estudo.



4.3 Descrição dos exames

4.3.1 Obtenção do antígeno para ELISA (IgG total anti-*Leishmania* em soro humano).

A cepa (MHOMBr83BA-3) de *L. chagasi* foi cultivada em meio LIT (infusão de fígado e triptose) e suplementada com 10% de soro bovino fetal. As leishmanias, após atingirem a fase logarítmica, foram lavadas com PBS (pH 7.2) e centrifugadas (20.000g) a 4°C por dez minutos. Os parasitas lavados foram ajustados à concentração de 5×10^6 parasitas/ml para o preparo do antígeno. Os parasitas foram lisados através de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento rápido. O material foi centrifugado a 600g por 20

minutos a 4°C. O sobrenadante (solução antigênica) foi estocado em pequenas alíquotas (100µg/ml) e a sua concentração protéica, foi verificada através do método de LOWRY *et al.* (1951).

4.3.2 ELISA para detectar IgG total anti-*Leishmania* em soro humano.

As placas (Limbro/Titertek) foram sensibilizadas com antígeno de *L. Chagasi* na concentração de 10 µg/ml (100µL/poço), diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9.6 e incubadas durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS Tween 0.05% (250µl/poço) e bloqueadas por 2 horas em temperatura ambiente, dispensando 300µL por poço de PBS Tween 0.05% + 1% BSA. As placas foram novamente lavadas 4 vezes com PBS Tween 0.05% (250µl/poço) e incubadas com soros diluídos 1:100 em PBS Tween 0.05% + 0.25% BSA (100µL/poço) durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS Tween 0.05% (250µl/poço) e adicionado o segundo anticorpo (anti-IgG Sigma) humano numa diluição de 1/2500 em PBS Tween 0.05% + 0.25% BSA (100 µL/poço) e incubado durante 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS Tween 0.05% (250µl/poço) e logo após, foi adicionado o substrato p-NN (p-nitrofenilfosfato: 1mg/mL) (Sigma N-9389) diluído em tampão carbonato-bicarbonato mais MgCl₂ sendo dispensados 100µL do substrato. Após 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com NaOH 3M (50µl/poço). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Spectra May 190, SunnyVali, CA, EUA) no comprimento de onda de 405 nm. A reação sorológica foi considerada positiva quando o nível de absorbância (cut-off) era igual ou superior a 0,050, representando a média mais dois desvios padrões das absorbâncias de 20 soros de indivíduos sadios não expostos a *Leishmania*.

4.3.3 Obtenção do Homogenado de Glândula Salivar (HGS).

As glândulas salivares foram obtidas de fêmeas de flebotomíneos provenientes da colônia de *Lu. longipalpis* do Laboratório de Imunoparasitologia -CPqGM. As fêmeas foram congeladas em freezer (-20°C)

por 10 minutos e colocadas sobre as Placas de Petri para que a cabeça fosse separada do tórax, e as glândulas fossem transferidas da lâmina para tubos de eppendorf na proporção de 1 par de glândulas para cada 1 μ L de solução salina e, guardadas a -70°C até o momento da utilização. Para a utilização das glândulas, as mesmas foram sonicadas a uma frequência de 40 Hz com três seqüências de 20 pulsos (Branson Sonifier 450, Danbury, USA). Após esse processo as glândulas foram centrifugadas (10.000rpm/4min).

4.3.4 ELISA para detectar IgG total anti-saliva de flebotomíneo em soro humano.

As placas (Polysorp) foram sensibilizadas com aproximadamente 1 μ g (1 par de glândula/mL) de antígeno de glândula salivar de *Lu. longipalpis* (100 μ L/poço) diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6 e incubadas durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS Tween 0.05% (250 μ L/poço) e bloqueadas por 2 horas em temperatura ambiente, dispensando 270 μ L por poço de PBS Tween 0.05% + 1% BSA. As placas foram novamente lavadas 4 vezes com PBS Tween 0.05% (250 μ L/poço) e incubadas com soros diluídos 1:100 em PBS Tween 0.05% + 0.25% BSA (100 μ L/poço) durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS Tween 0.05% (250 μ L/poço) e adicionado o segundo anticorpo (anti-IgG) humano numa diluição de 1/5000 em PBS Tween 0.05% + 0.25% BSA (100 μ L/poço) e incubado durante 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS Tween 0.05% (250 μ L/poço) e logo após, foi adicionado o substrato p-NN (p-nitrofenilfosfato: 1mg/mL) (Sigma N-9389) diluído em tampão carbonato-bicarbonato mais MgCl₂ sendo dispensados 100 μ L do substrato. Após 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com NaOH 3M (50 μ L/poço). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Spectra May 190, SunnyVali, CA, EUA) no comprimento de onda de 405 nm. A reação sorológica foi considerada positiva quando o nível de absorbância (cut-off) era igual ou superior a 0,090, representando a média mais dois desvios-padrão das absorbâncias de 10 soros de indivíduos sadios não expostos ao *Lu. longipalpis*.

4.4. Definição de leishmaniose infecção ou forma assintomática da LV

Para o estudo, considerou-se infecção ou forma assintomática da LV, a positividade à pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* e/ou IDRMs positivos na ausência de manifestações clínicas da doença (CALDAS et al., 2001; BRASIL, 2004; GAMA et al; 2004a) .

4.5. Taxa de prevalência e densidade de incidência

Cálculo da taxa de prevalência para a IDRMs, e pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-saliva do *Lu. longipalpis* pelo ELISA - considerou-se o número de crianças positivas aos exames realizados no inquérito inicial, dividido pelo número de crianças que participaram da primeira etapa do estudo e multiplicado por cem.

Cálculo da incidência para a IDRMs:

No 1º ano de observação – positivos no 1º ano de observação dividido pelo número de indivíduos negativos no inquérito inicial e multiplicado por 100.

No 2º ano de observação – positivos no 2º ano de observação dividido pelo número de crianças negativas no 1º ano de observação e multiplicado por 100.

Cálculo da incidência para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-saliva do *Lu. longipalpis*:

No 6º mês de observação – positivos no 6º mês de observação dividido pelo número de indivíduos negativos no inquérito inicial e multiplicado por cem.

No 12º mês de observação – positivos no 12º mês de observação dividido pelo número de indivíduos negativos no 6º mês de observação e multiplicado por cem.

No 18º mês de observação – positivos no 18º mês de observação dividido pelo número de indivíduos negativos no 12º mês de observação e multiplicado por cem.

No 24º mês de observação – positivos no 24º mês de observação e dividido pelo número de indivíduos negativos no 18º mês de observação, multiplicado por cem.

4.6 Considerações éticas.

Em cumprimento aos requisitos exigidos pela Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, o projeto foi encaminhado, apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão.

Após os esclarecimentos sobre a natureza do estudo e seus objetivos, em linguagem clara e acessível, os pais ou responsáveis que concordaram com o ingresso da criança no estudo, assinaram o TCLE (Apêndice 3).

4.7 Análise Estatística.

Os dados foram analisados no programa EPI-INFO, versão 3.3 (CDC-Atlanta-EUA), Graph Prism versão 2.0 (GraphPad Software INC, 1995) e no STATA statistic software version 8.0 (Stata corporatin, 2003).

Para as variáveis epidemiológicas, demográficas, ambientais e os resultados imunológicos (IDRM e pesquisa de anticorpos IgG anti-saliva da *Lu. longipalpis* e anticorpos IgG anti-*Leishmania*) considerou-se a frequência absoluta e percentual. Para comparar as variáveis IDRM, ELISA α -*Leishmania* e α -saliva do *Lu. longipalpis*, entre os sexos e grupos de idade, utilizou-se o teste do qui-quadrado.

A análise dos fatores associados à infecção por *L. (L.) chagasi*, foi realizada no programa Stata 8.0, se utilizando a regressão de Poisson com ajuste robusto da variância, tanto na análise univariável como na multivariável (BARROS & HIRAKATA, 2003). A medida de exposição e do efeito foi realizada ao mesmo tempo, em delineamento transversal. Através desta análise calcularam-se a razão de prevalência (RP), o intervalo de confiança (IC) e o valor de p.

Foram consideradas variáveis respostas, a prevalência de infecção detectada pelo teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM) e pelo exame ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* no inquérito inicial. As análises dessas duas variáveis foram realizadas separadamente.

Na análise univariável foram incluídas as variáveis demográficas, ambientais e história de LVA na família. Na análise multivariável, pelo processo “passo a passo”, com eliminação retrógrada de variáveis, foram incluídas as com valor de $p \leq 0,20$ na análise univariável, ficando somente aquelas com $p < 0,10$ (modelo reduzido). Associação estatisticamente significativa foi considerada quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 e/ou intervalo de confiança que não incluiu o 1.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a produção de anticorpos IgG anti-saliva nos diversos tempos do estudo e por faixa etária. Na avaliação realizada por faixa etária no inquérito inicial, foram incluídas todas as crianças do estudo. Na análise por faixa etária, nos diversos tempos do estudo, foram excluídas as crianças com pesquisa de anticorpos IgG anti-saliva negativas, sendo avaliadas apenas as crianças positivas em qualquer tempo do seguimento e que permaneceram até o 24º mês de observação.

A avaliação da variação dos níveis de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis* em cada criança, foi realizada calculando-se o percentual de variação. Considerou-se como percentual de variação, o valor final menos o valor inicial, dividido pelo valor inicial. O valor inicial corresponde ao nível de anticorpos no inquérito inicial, e o final, ao 24º mês de seguimento. O percentual de variação positiva, significa que o valor final foi maior que o inicial, e o negativo, que o valor inicial foi maior que o final. A ANOVA foi utilizada para comparar as variações entre os grupos de idade.

Para verificar se a presença de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis* se associava à imunidade celular, medida pela positividade ao IDR, utilizou-se a análise de Kaplan-Meier e teste de Log-rank. Foi considerado “evento” ou “falência” a positividade ao IDR nos tempos de 12 ou 24 meses e “censura” os indivíduos que não apresentaram o evento.

Nos testes estatísticos considerou-se associação, estatisticamente significativa, quando o valor de “P” foi ≤ 0.05 .

5 RESULTADOS

No inquérito populacional, foram detectadas 1297 crianças com idade inferior a 10 anos. Na primeira fase do estudo registraram-se 68 recusas e das 1129 que compareceram, foram excluídas 49 crianças por possuírem história prgressa ou atual de LV. Assim, foram incluídas 1080 crianças (83,3% da população total nesta faixa etária).

No 6º mês de seguimento, foram excluídas 470 crianças (343 com a IDRМ positiva e 127 com ELISA α -*Leish* positiva), sendo registradas 64 perdas (62 mudanças e 2 recusas) ficando no seguimento 546 crianças.

No 12º mês de seguimento, a fim de aumentar o número de crianças com a IDRМ negativa, foram re-incluídas 127 crianças (ELISA α -*Leish* positiva, mas com IDRМ negativa). Registraram-se 39 perdas (37 mudanças e 2 recusas), sendo atendidas 634 crianças.

No 18º mês de seguimento, foram excluídas 156 crianças (IDRМ positivas), registraram-se 43 perdas (41 mudanças e 2 recusas), sendo atendidas 435 crianças.

No 24º mês de seguimento, foram registradas 18 perdas (14 mudanças e 4 recusas), sendo atendidas 417 crianças.

5.1 Aspectos demográficos e ambientais.

Os resultados relativos aos aspectos demográficos apontaram maior freqüência de famílias procedentes do município da Raposa (42,3%) e com tempo de residência na área há mais de 25 meses (86,1%) (Tabela 1).

Em relação à faixa etária, os maiores percentuais foram observados nas faixas etárias de 1 a 3 anos (33,5%) e de 4 a 6 anos (33,1%). Entre as crianças que participaram do estudo 52,0% eram do sexo feminino e 77,1% eram da cor parda. Quando se considerou o número de moradores por domicílio, verificou-se que mais da metade das crianças residiam em casas com 5 a 7 pessoas (Tabela 1).

Tabela 1. Aspectos demográficos das crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	Total	
	f	%
Procedência da família		
Raposa	457	42,3
Outros municípios do Maranhão	310	28,7
Outros municípios da Ilha	255	23,6
Outros Estados	58	5,4
Tempo de residência da família na área		
> 25 meses	930	86,1
13 a 24 meses	80	7,4
Até 12 meses	70	6,5
Idade da criança no 1º inquérito		
< 1 ano	61	5,6
1 a 3 anos	362	33,5
4 a 6 anos	357	33,1
7 a 9 anos	300	27,8
Sexo		
Feminino	562	52,0
Masculino	518	48,0
Cor		
Parda	833	77,1
Branca	222	20,6
Negra	25	2,3
Pessoas por domicílio		
2 a 4 pessoas	301	27,9
5 a 7 pessoas	624	57,8
8 a 10 pessoas	125	11,6
> 10 pessoas	30	2,8
Total	1080	100,0

Em relação aos aspectos ambientais relativos à moradia, verificou-se que a maioria residia em casa com cobertura de telha (77,0%) e que 45,7% das casas possuíam paredes de taipa. Ao indagarmos a origem da água utilizada para consumo, mais de 90,0% informaram ser a mesma proveniente da rede básica. Quanto ao destino do lixo, 68,5% mencionaram a queima do lixo produzido, sendo a coleta pública citada por apenas 8,7% dos moradores. No que concerne ao destino dos dejetos, 51,2% utilizavam a fossa negra (Tabela 2).

Tabela 2. Aspectos ambientais relativos à moradia, abastecimento de água, destino do lixo e dejetos, das crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	Total	
	f	%
Cobertura da casa		
Telha	832	77,0
Laje	241	22,3
Palha	7	0,6
Parede		
Taipa	494	45,7
Alvenaria	389	36,0
Adobe	186	17,2
Palha	10	0,9
Outro	1	0,1
Abastecimento de água		
Rede	1038	96,1
Poço	42	3,9
Destino do lixo		
Queimado	740	68,5
Enterrado	181	16,6
Coletado	94	8,7
A céu aberto	65	6,0
Outros	2	0,2
Destino dos dejetos		
Fossa negra	553	51,2
Fossa séptica	472	43,7
Vala	30	2,8
Mato	17	1,6
Outro	8	0,7
Total	1080	100,0

Os resultados relativos aos aspectos ambientais referentes à criação, presença e tipos de animais no, ou próximo, ao domicílio são apresentados na tabela 3. Mais da metade das famílias (52,3%) informou que criava animais no domicílio, sendo o cão o animal mais citado (41,8%) (Tabela 3).

Ao serem questionados sobre a presença de animais próximo ao domicílio, 93,7% responderam afirmativamente. Os animais observados com mais frequência próximos aos domicílios, nas localidades estudadas, foram o cão e o gato (42,1%) (Tabela 3).

A presença de chiqueiro foi relatada por 20,6% enquanto que, a de galinheiro foi mencionada por mais da metade (61,3%). Com referência à presença de flebotomíneos no peri ou intradomicílio, a maioria (69,4%) respondeu negativamente (Tabela 3).

Tabela 3. Aspectos ambientais relacionados à criação e presença de animais. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	Total	
	f	%
Criação animais no domicílio		
Sim	565	52,3
Não	515	47,7
Tipo animal criado		
Cão	236	41,8
Gato	169	29,9
Cão/Gato	131	23,2
Outros	17	3,0
Cavalo	7	1,2
Cão/Gato/Macaco	3	0,5
Macaco	2	0,4
Animais próximo ao domicílio		
Sim	1012	93,7
Não	68	6,3
Tipo animais próximo ao domicílio		
Cão/Gato	426	42,1
Cão	353	34,9
Cão/Gato/Mucura	141	13,9
Gato	69	6,8
Cão/Mucura	18	1,8
Mucura	3	0,3
Gato/Mucura	1	0,1
Macaco	1	0,1
Chiqueiro próximo domicílio		
Sim	222	20,6
Não	858	79,4
Galinhheiro próximo domicílio		
Sim	662	61,3
Não	418	38,7
Flebotomíneo no peri e intra-domicílio		
Resposta positiva	330	30,6
Resposta negativa	750	69,4
Total	1080	100,0

5.2 Aspectos epidemiológicos e imunológicos.

Das crianças estudadas, 205 (19%) tinham história anterior de LV na família. Ao indagarmos o parentesco das pessoas na família, com história pregressa de LV, foram citados irmão, primo, tio, pai e outro (sobrinho, avô) (Tabela 4). Não foram registrados casos de pessoas não aparentadas residindo no domicílio da criança investigada. Em algumas crianças, o caso de LV morava em outro domicílio, porém na mesma localidade do estudo.

Entre as crianças que referiram história anterior familiar de LV e que apresentaram positividade à pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* observou-se, em todos os tempos do estudo, maior número quando os parentes com história anterior de LV eram irmãos ou primos. Entretanto, estatisticamente, não foi observada diferença significativa. (dados não apresentados).

O IDRМ realizado no inquérito inicial detectou prevalência de infecção de 31,8% na população estudada. A incidência detectada no 12º e 24º meses de observação foi de 24,6% e 7,2%, respectivamente. (Tabela 4).

Já a prevalência de infecção detectada pelo ELISA no inquérito inicial foi de 17,1%. A fim de determinar a incidência de infecção por *L. chagasi*, as 127 crianças com pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* positiva no inquérito inicial foram excluídas no exame realizado aos seis meses. Participaram desta etapa, 546 crianças com sorologia anti-*Leishmania* e IDRМ negativos na 1ª etapa. Para aumentar o número de crianças IDRМ negativas, as 127 crianças com sorologia anti-*leishmania* positiva foram re-introduzidas no estudo quando da realização dos exames aos doze meses. Os resultados dos ELISA realizados nos 6º, 12º, 18º e 24º meses de observação apontaram incidência de infecção de 6,6%, 3,8%, 17,2% e 37,3% respectivamente (Tabela 4).

Entre as crianças acompanhadas, durante o período do estudo, nenhuma apresentou sintomatologia sugestiva de LV (Dados não apresentados).

Tabela 4. Aspectos Epidemiológicos e imunológicos das crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	Total		
	n	f	%
História de LV na família	1080		
Sim		205	19,0
Não		875	81,0
Parente com LV	205		
Irmão		100	48,8
Primo		74	36,1
Tio		9	4,4
Outro		18	8,8
Pai		4	1,9
IDRM no inquérito inicial (prevalência)	1080		
Negativo		737	68,2
Positivo		343	31,8
IDRM no 12º mês de observação (incidência)	634		
Negativo		478	75,4
Positivo		156	24,6
IDRM no 24º mês de observação (incidência)	417		
Negativo		387	92,8
Positivo		30	7,2
ELISA α-Leishmania no inquérito inicial (prevalência)	1080		
Negativo		895	82,9
Positivo		185	17,1
ELISA α-Leishmania no 6º mês de observação (incidência)	546		
Negativo		510	93,4
Positivo		36	6,6
ELISA α-Leishmania no 12º mês de observação (incidência)	472		
Negativo		454	96,2
Positivo		18	3,8
ELISA α-Leishmania no 18º mês de observação (incidência)	407		
Negativo		337	82,8
Positivo		70	17,2
ELISA α-Leishmania no 24º mês de observação (incidência)	327		
Negativo		205	62,7
Positivo		122	37,3

Quando analisamos os resultados relativos à prevalência do IDRM por sexo, no inquérito inicial, e a incidência no 24º mês de observação, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes. Já no 12º mês de observação, verificou-se que a infecção foi mais freqüente no sexo masculino ($p = 0,021$) (Tabela 5).

Os dados relativos à infecção detectada pelo ELISA anti-*Leishmania* apontaram prevalência maior no sexo masculino ($p = 0,006$). Nas incidências medidas no 6º, 12º, 18º e 24º meses de observação não foram verificados diferenças estatisticamente significantes (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado do IDRM e ELISA anti-*Leishmania* por sexo. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	Sexo							p
	n	Feminino		Masculino		Total		
		f	%	f	%	f	%	
IDRM no inquérito inicial (prevalência)	1080							0,792
Negativo		381	67,8	356	68,7	737	68,2	
Positivo		181	32,2	162	31,3	343	31,8	
IDRM no 12º mês de observação (incidência)	634							0,021
Negativo		261	79,3	217	71,1	478	75,4	
Positivo		68	20,7	88	28,9	156	24,6	
IDRM no 24º mês de obs. (incidência)	417							0,072
Negativo		213	90,6	174	95,6	387	92,8	
Positivo		22	9,4	8	4,4	30	7,2	
ELISA α-<i>Leishmania</i> no inquérito inicial (prevalência)	1080							0,006
Negativo		483	85,9	412	79,5	895	82,9	
Positivo		79	14,1	106	20,5	185	17,1	
ELISA α-<i>Leishmania</i> no 6º mês de observação (incidência)	546							0,968
Negativo		274	93,2	236	93,7	510	93,4	
Positivo		20	6,8	16	6,3	36	6,6	
ELISA α-<i>Leishmania</i> no 12º mês de observação (incidência)	472							0,454
Negativo		246	96,5	208	95,9	454	96,2	
Positivo		9	3,5	9	4,1	18	3,8	
ELISA α-<i>Leishmania</i> no 18º mês de observação (incidência)	407							0,348
Negativo		192	84,6	145	80,6	337	82,8	
Positivo		35	15,4	35	19,4	70	17,2	
ELISA α-<i>Leishmania</i> no 24º mês de observação (incidência)	327							0,950
Negativo		118	63,1	87	62,1	205	62,7	
Positivo		69	36,9	53	37,9	122	37,3	

No teste IDRМ realizado no inquérito inicial, no 12º e 24º meses de observação, o maior número de crianças positivas foi entre as com idade de 7 a 9 anos. Entretanto, associação estatisticamente significativa foi observada apenas na incidência determinada no 12º mês de observação ($p=0,001$) (tabela 6).

O ELISA anti-*Leishmania* apontou que a prevalência, no inquérito inicial, foi mais freqüente nas crianças de 7 a 9 anos de idade ($p=0.039$). No sexto mês de observação, a maior incidência ocorreu entre as crianças de 4 a 6 anos de idade ($p=0,018$). Já, nas incidências medidas no 12º, 18º e 24º meses de observação, não foi verificada associação estatisticamente significativa (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado do IDRM e ELISA anti-*Leishmania* por idade das crianças nos diversos períodos de observação. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	Idade no inquérito inicial										p	
	n	< 1 ano		1 a 3 anos		4 a 6 anos		7 a 9 anos		Total		
		f	%	f	%	f	%	f	%	f		%
IDRM inquérito inicial (prevalência)	1080											0,081
Negativo		46	75,4	253	69,9	250	70,0	188	62,7	737	68,2	
Positivo		15	24,6	109	30,1	107	30,0	112	37,3	343	31,8	
IDRM 12º mês de observação (incidência)	546											0,001
Negativo		28	73,7	182	84,7	153	71,2	115	69,3	478	75,4	
Positivo		10	26,3	33	15,3	62	28,8	51	30,7	156	24,6	
IDRM 24º mês de observação (incidência)	417											0,056
Negativo		22	91,7	154	95,1	119	91,5	92	91,1	387	92,8	
Positivo		2	8,3	8	4,9	11	8,5	9	8,9	30	7,2	
ELISA α-Leish inquérito inicial (prevalência)	1080											0,039
Negativo		56	91,8	309	85,4	293	82,1	237	79,0	895	82,9	
Positivo		5	8,2	53	14,6	64	17,9	63	21,0	185	17,1	
ELISA α-Leish 6º mês de observação (incidência)	546											0,018
Negativo		33	94,3	188	96,9	160	88,9	129	25,3	510	93,4	
Positivo		2	5,7	6	3,1	20	11,1	8	5,8	36	6,6	
ELISA α-Leish 12º mês de observação (incidência)	472											0,613
Negativo		31	100,0	165	95,9	144	96,6	114	95,0	454	96,2	
Positivo		0	0,0	7	4,1	5	3,4	6	5,0	18	3,8	
ELISA α-Leish 18º mês de observação (incidência)	407											0,988
Negativo		20	83,3	129	83,2	108	83,1	80	81,6	337	82,8	
Positivo		4	16,7	26	16,8	22	16,9	18	18,4	70	17,2	
ELISA α-Leish 24º mês de observação (incidência)	327											0,735
Negativo		13	65,0	80	63,0	67	65,7	45	57,7	205	62,7	
Positivo		7	35,0	47	37,0	35	34,3	33	42,3	122	37,3	

5.3 FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO

5.3.1 ANÁLISE UNIVARIÁVEL

Na análise univariável as variáveis que se mostraram associadas à infecção por *L. (L.) chagasi*, quando se considerou o ELISA, foram: idade, sexo, cor e criação de animais (tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Análise univariável da infecção por *L. (L.) chagasi* detectada pelo ELISA de acordo as variáveis demográficas e história de LV na família. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	n	ELISA Positivo (%)	RP	IC (95%)	p
Procedência família					0,614
Outros Estados	58	13,8	1,0		
Raposa	457	16,8	0,86	0,62 - 1,18	
Outros municípios Ma	310	16,1	0,82	0,57 - 1,17	
Outros municípios Ilha	255	19,6	0,70	0,35 - 1,40	
Tempo de residência da família na área					0,874
13 a 24 meses	80	15,0	1,0		
Até 1 ano	70	17,1	1,14	0,55 - 2,38	
Mais de 25 meses	930	17,3	1,15	0,67 - 1,98	
idade					0,050
< 1 ano	61	8,2	1,0		
1 a 3 anos	362	14,6	1,79	0,74 - 4,29	
4 a 6 anos	257	17,9	2,19	0,92 - 5,21	
7 a 9 anos	300	21,0	2,56	1,07 - 6,10	
Sexo					0,005
Masculino	518	20,5	1,0		
Feminino	562	14,1	0,69	0,53 - 0,89	
Cor					0,002
Parda	833	18,8	1,0		
Branca	222	9,5	0,50	0,33 - 0,77	
Negra	25	28,0	1,48	0,78 - 2,83	
Pessoa por domicílio					0,161
2 a 4 pessoas	301	14,3	1,0		
5 a 7 pessoas	624	17,5	1,22	0,88 - 1,69	
8 pessoas e mais	155	21,3	1,49	0,99 - 2,25	
História de LV na família					0,063
Não	875	16,1	1,0		
Sim	205	21,5	1,33	0,98 - 1,80	

Tabela 8. Análise univariável da infecção por *L. (L.) chagasi* detectada pelo ELISA de acordo as variáveis ambientais. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	n	ELISA Positivo (%)	RP	IC (95%)	p
Cobertura da casa					0,144
Telha	832	16,2	1,0		
Laje/Palha	248	20,3	0,80	0,60 - 1,07	
Parede					0,286
Taipa/Palha/Outro	505	17,8	1,0		
Alvenaria	389	14,9	0,84	0,62 - 1,13	
Adobe	186	19,9	1,12	0,79 - 1,57	
Abastecimento de água					0,935
Rede	1038	17,1	1,0		
Poço	42	16,7	0,97	0,49 - 1,94	
Destino Lixo					0,577
Queimado	740	16,1	1,0		
Enterrado	179	19,0	1,18	0,84 - 1,67	
Coletado	94	19,1	1,19	0,76 - 1,86	
À céu aberto/Outro	67	20,9	1,29	0,79 - 2,13	
Destino dos dejetos					0,636
Fossa negra	553	18,1	1,0		
Fossa séptica	472	15,9	0,88	0,67 - 1,15	
Mato/Vala/Outro	55	18,2	1,01	0,56 - 1,81	
Criação de animais					0,034
Não	515	14,6	1,0		
Sim	565	19,5	1,34	1,02 - 1,75	
Animais próximo ao domicílio					0,907
Não	68	17,6	1,0		
Sim	1012	17,1	0,97	0,57 - 1,65	
Chiqueiro próximo ao domicílio					0,116
Não	858	18,1	1,0		
Sim	222	13,5	0,75	0,52 - 1,07	
Galinheiro próximo ao domicílio					0,219
Não	418	18,9	1,0		
Sim	662	16,0	0,85	0,65 - 1,10	
Flebotomíneo no peri e intra-domicílio					0,254
Resposta positiva	330	19,1	1,0		
Resposta negativa	750	16,3	0,85	0,65 - 1,12	

Quando o parâmetro utilizado para a análise univariável foi o IDRM, as variáveis que se mostraram associadas à infecção por *L. (L.) chagasi* foram: cor, abastecimento de água, destino do lixo e flebotômico no peri e intra-domicílio (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. Análise univariável para infecção por *L. (L.) chagasi* detectada pelo IDRM de acordo as variáveis demográficas e história de LV na família. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	n	IDRM Positivo (%)	RP	IC (95%)	p
Procedência família					0,239
Outros municípios Ilha	255	35,3	1,0		
Outros Estados	58	32,8	0,93	0,62 - 1,39	
Outros municípios Ma	310	33,5	0,95	0,76 - 1,19	
Raposa	457	28,4	0,81	0,65 - 1,00	
Tempo de residência da família na área					0,055
13 a 24 meses	80	36,3	1,0		
Até 1 ano	70	32,8	0,91	0,58 - 1,57	
Mais de 25 meses	930	31,3	0,86	0,63 - 1,17	
Idade					0,077
< 1 ano	61	24,6	1,0		
1 a 3 anos	362	30,1	1,22	0,77 - 1,95	
4 a 6 anos	257	30,0	1,22	0,76 - 1,94	
7 a 9 anos	300	37,3	1,52	0,95 - 2,41	
Sexo					0,742
Masculino	518	31,3	1,0		
Feminino	562	32,3	1,03	0,86 - 1,22	
Cor					0,003
Parda	833	34,6	1,0		
Branca	222	22,1	0,64	0,49 - 0,83	
Negra	25	24,0	0,69	0,34 - 1,40	
Pessoa por domicílio					0,085
2 a 4 pessoas	301	32,6	1,0		
5 a 7 pessoas	624	31,1	0,95	0,78 - 1,16	
8 pessoas e mais	155	32,9	1,01	0,76 - 1,33	
História de LV na família					0,627
Não	875	31,4	1,0		
Sim	205	33,2	1,05	0,85 - 1,31	

Tabela 10. Análise univariável para infecção por *L. (L.) chagasi* detectada pelo IDRМ de acordo as variáveis ambientais. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	n	IDRM Positivo (%)	RP	IC (95%)	p
Cobertura da casa					0,785
Telha	832	32,0	1,0		
Laje/Palha	248	31,0	1,03	0,86-1,27	
Parede					0,755
Taipa/Palha/Outro	505	32,9	1,0		
Alvenaria	389	30,6	0,93	0,76 - 1,13	
Adobe	186	31,2	0,94	0,74 - 1,21	
Abastecimento de água					< ,001
Rede	1038	30,9	1,0		
Poço	42	52,4	1,69	1,25 - 2,29	
Destino Lixo					0,039
Queimado	740	33,2	1,0		
Enterrado	179	32,4	0,97	0,77 - 1,23	
Coletado	94	17,0	0,51	0,32 - 0,80	
À céu aberto/Outro	67	35,4	1,03	0,73 - 1,46	
Destino dos dejetos					0,498
Fossa negra	553	30,7	1,0		
Fossa séptica	472	33,5	1,09	0,91 - 1,30	
Mato/Vala/Outro	55	27,3	0,89	0,56 - 1,39	
Criação de animais					0,058
Não	515	28,9	1,0		
Sim	565	34,3	1,19	0,99 - 1,41	
Animais próximo ao domicílio					0,351
Não	68	26,5	1,0		
Sim	1012	32,1	1,21	0,81 - 1,82	
Chiqueiro próximo ao domicílio					0,808
Não	858	31,6	1,0		
Sim	222	32,4	1,03	0,83 - 1,27	
Galinheiro próximo ao domicílio					0,129
Não	418	34,4	1,0		
Sim	662	30,1	0,87	0,73 - 1,04	
Flebotomíneo no peri e intra-domicílio					0,040
Resposta positiva	330	27,3	1,0		
Resposta negativa	750	33,7	1,24	1,01 - 1,51	

5.3.2 ANÁLISE MULTIVARIÁVEL

A análise das variáveis associadas ao risco de infecção por *L. (L.) chagasi* apontou, como fator de risco, a criação de animais quando o parâmetro utilizado foi o ELISA. Já a cor branca e o sexo feminino, apresentaram-se como fator de proteção (Tabela 11).

Tabela 11. Análise multivariável para infecção por *L. (L.) chagasi* detectada pelo ELISA de acordo as variáveis demográficas e história de LV na família. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

VARIÁVEIS	RP	IC (95%)	p
Sexo			0,009
Masculino	1,0		
Feminino	0,70	0,54 - 0,92	
Cor			0,003
Parda	1,0		
Branca	0,49	0,32 - 0,76	
Negra	1,39	0,70 - 2,74	
Criação de animais			0,028
Não	1,0		
Sim	1,35	1,03 - 1,77	

Quando a variável resposta foi o teste de IDRM, a cor branca foi fator de proteção, e abastecimento de água de poço, criação de animais domésticos e resposta negativa quanto à presença de flebotomíneos no intra e peri-domicílio, mostraram-se associadas ao risco de infecção por *L. (L.) chagasi* (Tabela12).

Tabela 12. Análise multivariável para infecção por *L. (L.) chagasi* detectada pelo IDRM de acordo as variáveis demográficas e história de LV na família. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

VARIÁVEIS	RP	IC (95%)	p
Cor			< 0,001
Parda	1,0		
Branca	0,62	0,47 - 0,80	
Negra	0,65	0,33 - 1,28	
Abastecimento de água			< 0,001
Rede	1,0		
Poço	1,80	1,34 - 2,40	
Criação de animais			0,014
Não	1,0		
Sim	1,25	1,05 - 1,49	
Flebotomíneo no peri e intra-domicílio			0,009
Resposta positiva	1,0		
Resposta Negativa	1,30	1,07 - 1,59	

5.4 Anticorpos IgG anti-saliva do *Lutzomyia longipalpis*

Quanto à presença de anticorpos IgG anti-saliva verificou-se prevalência de 16,1% no inquérito inicial. As incidências determinadas nos 6º, 12º, 18º e 24º meses de observação foram 0,4%, 3,8%, 1,9% e 2,7%, respectivamente (tabela 13).

Tabela 13. Elisa anti-saliva do *Lutzomyia longipalpis* das crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	Total		
	n	f	%
ELISA α-saliva – Inquérito inicial (Prevalência)	1080		
Negativo		906	83,9
Positivo		174	16,1
ELISA α-saliva – 6º mês de observação (Incidência)	466		
Negativo		464	99,6
Positivo		2	0,4
ELISA α-saliva – 12º mês de observação (Incidência)	498		
Negativo		479	96,2
Positivo		19	3,8
ELISA α-saliva – 18º mês de observação (Incidência)	416		
Negativo		408	98,1
Positivo		8	1,9
ELISA α-saliva – 24º mês de observação (Incidência)	405		
Negativo		394	97,3
Positivo		11	2,7

Quando se considerou a prevalência de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis*, verificou-se maior freqüência de positividade nas crianças da faixa etária de 7 a 9 anos ($p = 0,025$). Na faixa etária de 4 a 6 anos, foi verificada maior incidência no 12º mês de observação ($p=0,012$). Já nas incidências no 6º, 18º e 24º meses de observação, não foram observadas diferenças estatisticamente significante (tabela 14).

Tabela 14. Resultado do ELISA anti-saliva do *Lu. Longipalpis*, por idade das crianças no inquérito inicial. Crianças menores de 10 anos residentes em Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 2003-2005.

Variáveis	Idade no inquérito inicial											p
	n	< 1 ano		1 a 3 anos		4 a 6 anos		7 a 9 anos		Total		
		f	%	f	%	f	%	f	%	f	%	
ELISA α-saliva inquérito inicial (prevalência)	1080											0,025
Negativo		53	86,9	317	87,6	299	83,8	237	79,0	906	83,9	
Positivo		8	13,1	45	12,4	58	16,2	63	21,0	174	16,1	
ELISA α- saliva 6º mês de observação (incidência)	466											0,070
Negativo		30	96,8	168	36,2	154	99,4	112	96,8	464	99,6	
Positivo		1	3,2	0	0,0	1	0,6	0	3,2	2	0,4	
ELISA α- saliva 12º mês de observação (incidência)	498											0,012
Negativo		32	100,0	175	99,4	155	93,4	117	94,4	479	96,2	
Positivo		0	0,0	1	0,6	11	6,6	7	5,6	19	3,8	
ELISA α- saliva 18º mês de observação (incidência)	416											0,633
Negativo		23	100,0	162	98,2	128	97,0	95	99,0	408	98,1	
Positivo		0	0,0	3	1,8	4	3,0	1	1,0	8	1,9	
ELISA α- saliva 24º mês de observação (incidência)	405											0,347
Negativo		24	100,0	155	98,1	123	97,6	92	94,8	394	97,3	
Positivo		0	0,0	3	1,9	3	2,4	5	5,2	11	2,7	

5.5 Anticorpos IgG anti-saliva por faixas etárias no tempo zero.

Quando se considerou os níveis de IgG anti-saliva por faixa etária no tempo zero do estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa na produção de anticorpos IgG nas diversas faixas etárias. Valor de $p > 0.05$ em todos os grupos (Figura 4).

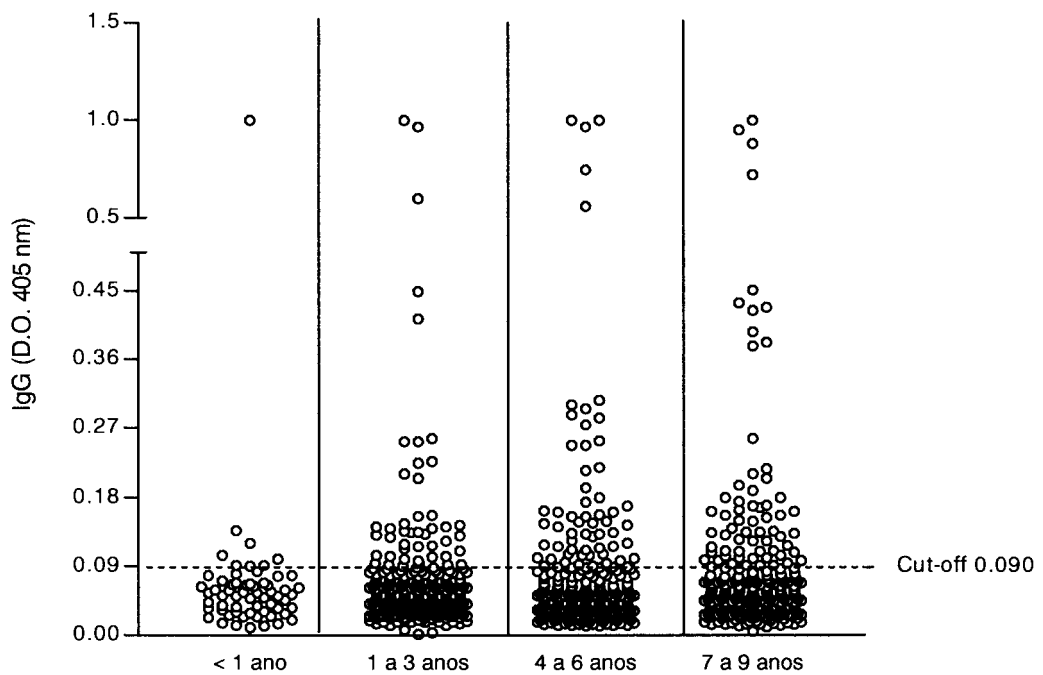


Figura 4. Anticorpos IgG anti-saliva em densidade ótica (OD) do *Lutzomyia longipalpis* de 1080 crianças em diferentes grupos de idade, no inquérito inicial. Teste Kruskal-Wallis.

5.6 Anticorpos IgG anti-saliva por faixa etária nos diversos tempos do estudo.

Quando se analisou os anticorpos IgG anti-saliva por tempo, verificou-se, com exceção do grupo de menores de 1 ano ($p > 0.05$ em todos os tempos), um declínio dos mesmos quando comparamos o tempo zero, ao 6º e 18º mês de seguimento. Valor de $p < 0.01$ em todos os grupos (Figuras 5 e 6).

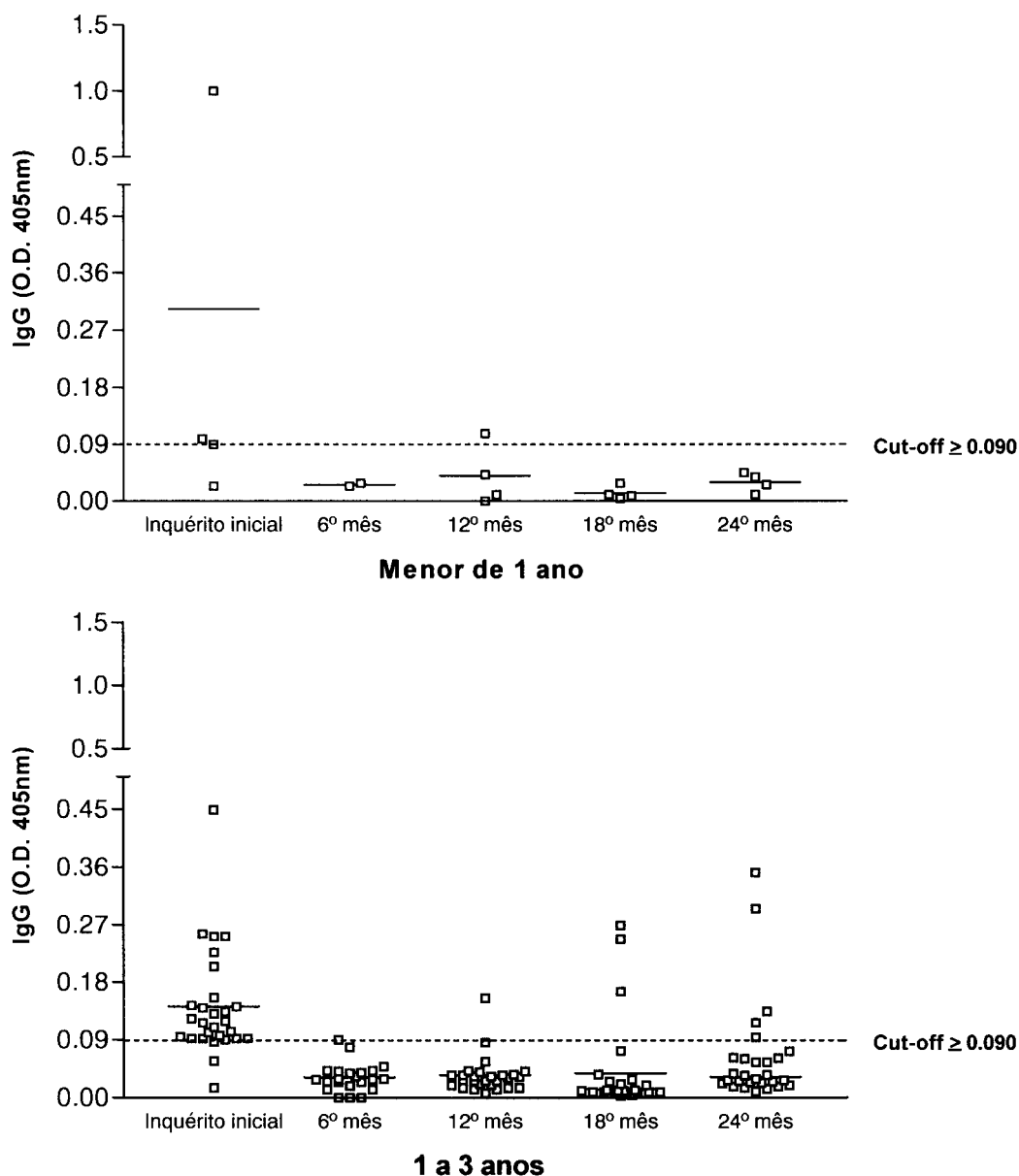


Figura 5. Anticorpos IgG anti-saliva em densidade ótica (OD) do *Lutzomyia longipalpis* em crianças com idade inferior a 1 ano e de 1 a 3 anos, no inquérito inicial, 6º, 12º, 18º e 24º meses do estudo. Teste Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam as médias.

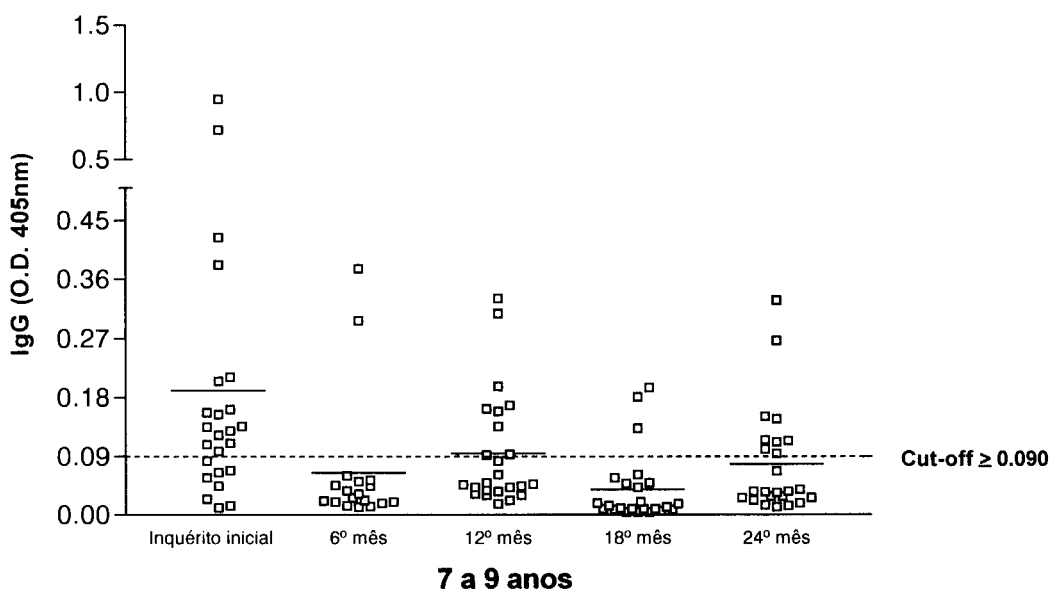
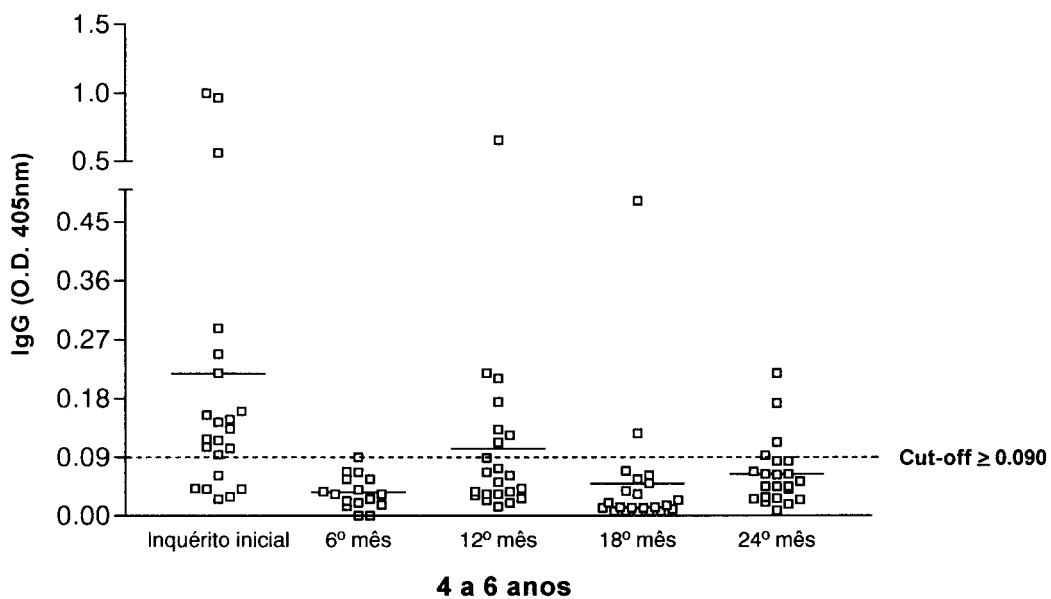


Figura 6. Anticorpos IgG anti-saliva em densidade ótica (OD) do *Lutzomyia longipalpis* em crianças com idade de 4 a 6 anos e de 7 a 9 anos, no inquérito inicial, 6º, 12º, 18º e 24º meses do estudo. Teste Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam as médias.

Quando se considerou o percentual de variação dos níveis de anticorpos de cada criança nas diversas faixas etárias, verificou-se que apesar de maior número de crianças apresentarem variação negativa, observou-se também, variação positiva. A comparação entre os diversos grupos não foi estatisticamente significativa ($p > 0.05$) (Figura 7).

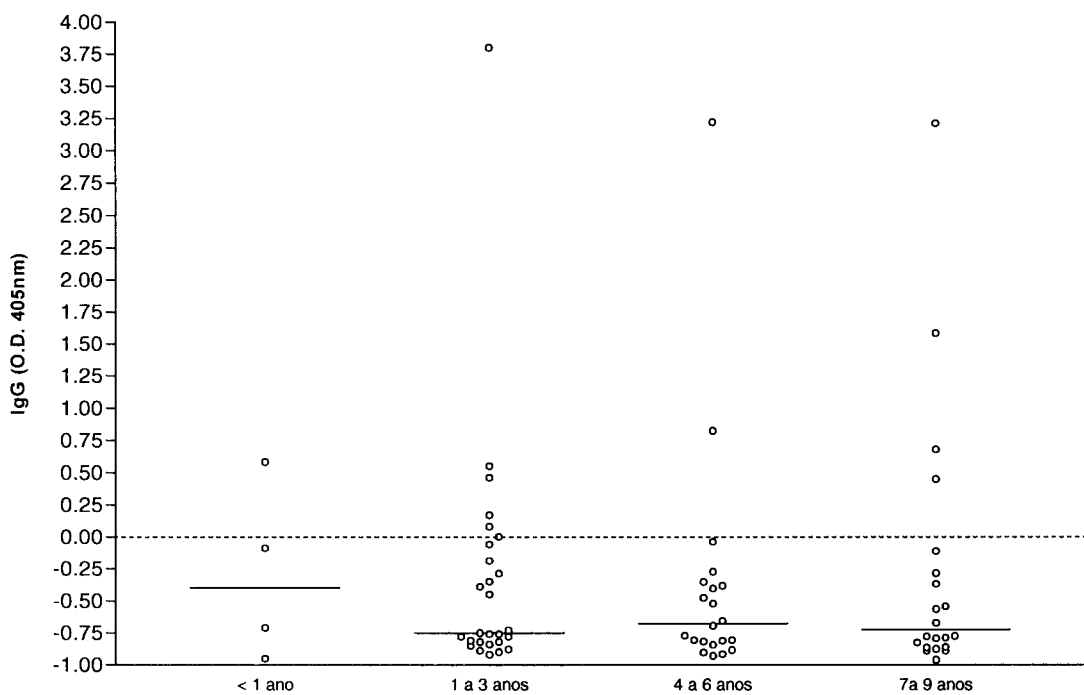


Figura 7. Percentual de variação dos níveis de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis* das crianças positivas em algum tempo do estudo e que permaneceram em seguimento por 24 meses. As barras horizontais representam as médias.

5.7 Análise de Kaplan-Meir.

Para verificar se a presença de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis* se associava à imunidade celular, medida pela positividade ao IDRМ, utilizou-se a análise de Kaplan-Meir.

Após digitação e organização numa planilha do Microsoft Excel, dos resultados do teste IDRМ e da pesquisa de anticorpos anti-saliva das 1080 crianças que participaram da primeira etapa do estudo, procedeu-se a exclusão de 343 indivíduos que apresentaram positividade ao primeiro IDRМ, ou seja, no inquérito inicial. No 1º ano de observação, registraram-se 99 mudanças e 4 recusas. Dos 634 indivíduos que permaneceram em seguimento, 448 foram censurados e 186 apresentaram o evento.

A análise de Kaplan-Meir mostrou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de anticorpos anti-saliva do *L. longipalpis* e a imunidade celular, medida pela positividade ao IDRМ. Entre os que apresentaram pesquisa de anticorpos anti-saliva positiva, o número de eventos observados foi superior ao número de eventos esperados, sendo o valor de p do teste de log-rank < 0,0006 (Figura 7). A figura 8 mostra o comportamento das curvas de sobrevida durante os 24 meses.

Para verificar se a significância permanecia após o ajuste por idade, realizamos a análise multivariável para variáveis “tempo até a ocorrência do evento”, utilizando a regressão de COX, permanecendo a significância estatística (dados não apresentados).

O somatório do tempo de observação das crianças saliva negativa e daquelas com pesquisa de anticorpos anti-saliva positiva, foi de 10176 meses e de 2448 meses respectivamente. A incidência acumulada de positividade ao IDRМ foi de 1,31% nos saliva negativos e de 2,17% entre os que apresentaram a pesquisa de anticorpos anti-saliva positiva (Tabela 15).

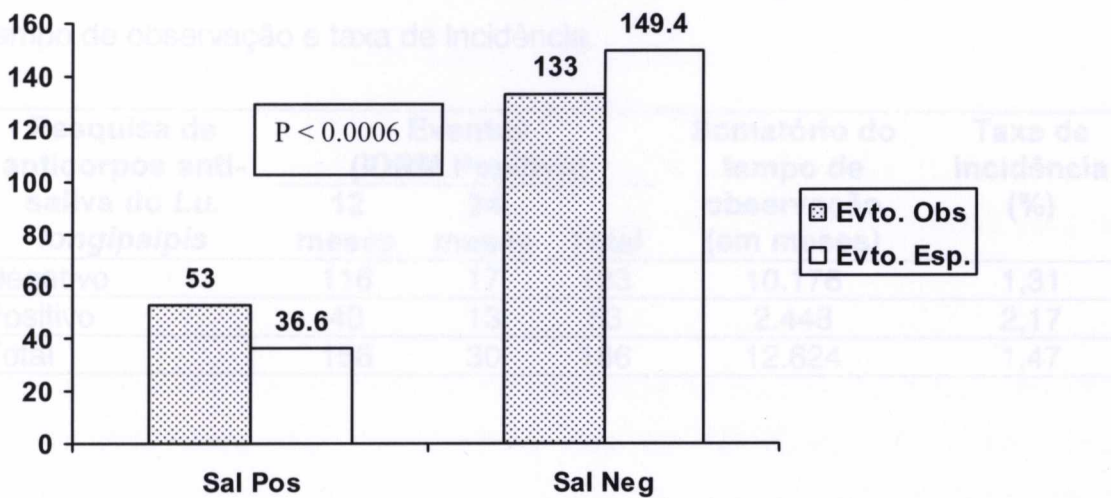


Figura 8. Positividade ao IDRM em crianças, de acordo com a pesquisa de anticorpos anti-saliva. Análise de Kaplan-Meir.

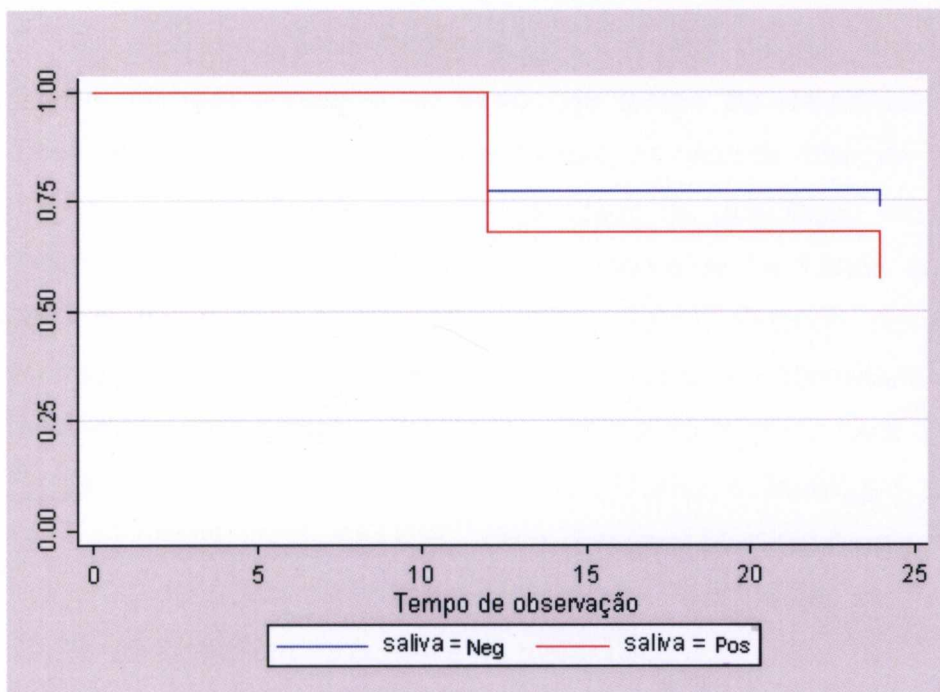


Figura 9. Curva de sobrevivência de crianças, de acordo com a pesquisa de anticorpos anti-saliva. Análise de Kaplan-Meir.

Tabela 15. Resultado da análise por pesquisa de anticorpos anti-saliva, eventos (IDRM +) de acordo com o período de seguimento, somatório do tempo de observação e taxa de incidência.

Pesquisa de anticorpos anti-saliva do <i>Lu. longipalpis</i>	Eventos (IDRM Positivo)			Somatório do tempo de observação (em meses)	Taxa de incidência (%)
	12 meses	24 meses	Total		
Negativo	116	17	133	10.176	1,31
Positivo	40	13	53	2.448	2,17
Total	156	30	186	12.624	1,47

6 DISCUSSÃO

A análise dos dados demográficos apontou que 42,3% das famílias das crianças eram procedentes do Município da Raposa-MA sendo este percentual superior aos 34,4% relatados por CALDAS (1998) para a mesma área endêmica, sugerindo diminuição no processo migratório para as áreas estudadas.

No que diz respeito ao tempo de residência nas áreas, a maioria das famílias informou que residia na localidade há mais de 12 meses (93,5%). Esses resultados vão ao encontro dos de NASCIMENTO (1996), que estudando a epidemiologia da LV na Ilha de São Luís-MA, verificou que a maioria da população residia na área há mais de 12 meses. Os resultados obtidos podem sugerir maior estabilidade da população como reflexo de menor imigração.

Na análise dos fatores de risco, as variáveis “procedência” e “tempo de permanência” não se constituíram fatores de risco para infecção, assemelhando-se, em relação á procedência, aos resultados de Nascimento (1996), para outra área endêmica de LV na ilha de São Luís-MA. Divergiram porém, no que concerne ao tempo de tempo de residência, onde naquela localidade, essa variável esteve associado ao risco de infecção.

Os dados referentes à idade da população brasileira apontam maior concentração nas faixas de 1 a 4 anos e de 7 a 9 anos, entre as crianças com idade inferior a 10 anos (IBGE, 2005). Quando comparados esses resultados ao do presente estudo, verifica-se que o percentual de crianças na faixa etária de 7 a 9 anos (27,7%) foi inferior ao relatado para o Brasil (32,2%), Região Nordeste (31,8%), Maranhão (31,8%) e município da Raposa-MA (37,0%) (IBGE, 2005; SEMUS, 2005). Sendo a LV mais freqüente em crianças menores de 5 anos observou-se que nas localidades estudadas cerca de 72,2% encontravam-se na faixa de maior risco.

Nesse estudo verificou-se que o percentual de crianças do sexo feminino foi ligeiramente superior ao masculino, assemelhando-se ao estudo de CALDAS (1998), NASCIMENTO et al., (2005; 2006) e ao observado ao nível nacional, regional e estadual (IBGE, 2005).

A maioria das mães e/ou responsáveis declarou como cor da criança, a parda, o que também é observado quando se considera a região Nordeste e o estado do Maranhão, e que pode ser explicado devido à forte miscigenação observada na região Nordeste (IBGE,2005). A maior frequência da cor parda também foi referida para a mesma área endêmica (CALDAS, 1998), para outras áreas endêmicas do Maranhão (NASCIMENTO, 1996) e do Brasil (MORENO et al., 2005).

Na análise univariável, a cor apresentou-se associada à proteção para infecção detectada tanto pelo ELISA ($p = 0,002$), quanto pelo IDRM ($p = 0,003$). Na análise multivariável, a cor, especificamente a branca, permaneceu como proteção à infecção, diferindo dos resultados observados por Nascimento (1996) para outra área endêmica da Ilha de São Luís-MA e por Moreno et al (2005) numa área urbana do estado de Minas Gerais , onde tal associação não foi observada.

Nas localidades, Vila Nova e Bom Viver, 57,8% das famílias eram compostas de 5 a 7 pessoas, com média de 5,7 por domicílio. Este resultado é divergente do relatado para o Maranhão, pois de acordo com os dados do IBGE (2005), o número médio de pessoas por domicílio para o Estado é de 4,3, um dos maiores do Brasil, sendo superado apenas pelos estados do Amazonas e Macapá que possuem, em média, 4,4 pessoas por domicílio. Ao serem comparados esses resultados aos de CALDAS (1998), verifica-se aumento de 0,5 na média de pessoas por domicílio.

Embora maior aglomeração de pessoas, principalmente em áreas carentes, possa refletir numa escassez de alimentos interferindo no estado nutricional dos moradores, em especial das crianças menores de 10 anos e que, a desnutrição tenha sido relatada como um importante fator para o desenvolvimento de doenças parasitárias, entre elas a LV (HARISSON et al.,1986; PEARSON et al,1992), não se verificou, assim como no estudo de Moreno et al (2005), associação da variável “pessoa por domicílio” e risco para infecção

Adequadas condições de saneamento e moradia estão relacionadas à melhor qualidade de vida. Nos domicílios dos menores estudados, a cobertura de telha foi referida em 77,0% sendo este percentual

inferior ao encontrado na Região Nordeste e no Maranhão onde 85,2% e 89,4% respectivamente dos domicílios, possuem este tipo de cobertura (IBGE, 2005). Entretanto, quando se compara este resultado, a estudos anteriores realizados nas mesmas localidades, verifica-se melhoria em relação a essa variável, pois em 1997, a cobertura de telha foi referida para 32,1% dos domicílios e em 1998, para 34,1% (CALDAS, 1998, GAMA et al., 1998). Em relação a essa variável, as duas localidades apresentaram melhores condições do que o observado em outras áreas endêmicas do Maranhão, onde a palha predominou como material utilizado para a cobertura das casas (NASCIMENTO et al., 2005).

Na região Nordeste e no estado do Maranhão, a maioria dos domicílios possui paredes de alvenaria e em apenas 3,1% e 10,7%, respectivamente, são utilizados materiais como palha, taipa, madeira aproveitada e outros (IBGE, 2005). Nas localidades estudadas, a parede de alvenaria foi referida em 36,0% dos domicílios, e a de taipa em 45,7% - resultados esses, diferentes dos encontrados em nível regional e estadual.

A exemplo do que foi relatado em relação ao tipo de material utilizado para a cobertura dos domicílios, observou-se melhoria em relação às paredes quando comparadas aos achados de 1997, e 1998, quando 87,4% e 84,6% dos domicílios possuíam paredes de taipa (CALDAS, 1998, GAMA et al., 1998).

Os tipos de cobertura e parede das casas não se mostraram associados à infecção tanto na análise univariável, quanto na multivariável, concordando com o observado por Moreno et al (2005) em Minas Gerais e Nascimento (1996) em outra área endêmica do Maranhão.

No Brasil, 92% dos domicílios são abastecidos por água da rede geral. Para o Nordeste, estado do Maranhão e no município da Raposa-MA, esses valores são respectivamente 89,0%, 76,5%, 73,5%, respectivamente portanto, inferiores ao relatado pela população estudada (IBGE, 2005). É importante mencionar que apesar da maioria referir abastecimento de água da rede geral observou-se, durante a realização do trabalho de campo, que muitas casas só possuíam um ponto de água localizado fora da habitação e que, a

água não estava disponível na maior parte do dia, obrigando a população a acondicionar a água em recipientes abertos e muitas vezes inapropriados (tambor enferrujado, tonéis sujos, etc.), localizados fora dos domicílios, ou mesmo, buscar água de poço para atender as necessidades da família (dados não apresentados). As observações feitas podem também justificar porque a maioria das crianças dessas localidades toma banho no quintal, como foi identificado por CALDAS et al., 2001. Essas situações poderiam contribuir para a maior exposição dos moradores, inclusive das crianças, aos flebotomíneos já que o abastecimento com água proveniente de poço, constituiu um fator de risco para a infecção por *L. chagasi* no estudo de NASCIMENTO, (1996) e em nosso estudo, quando consideramos a infecção detectada pelo IDRM.

Na variável relacionada ao destino do lixo, verificou-se que apenas 8,7% dos moradores mencionaram a coleta pública e que a maioria (68,5%) dos moradores queimava o lixo produzido. Essa realidade é diferente ao relatada para o estado do Maranhão, em que 79,6% dos domicílios possuem coleta do mesmo e do município da Raposa-MA, onde 13,4% do lixo é coletado (IBGE, 2005). Embora esse número seja inferior ao nível estadual, observa-se, em relação às duas localidades uma pequena melhoria das condições quando as comparamos às encontradas em 1998, em que não havia coleta pública (CALDAS, 1998).

Durante o desenvolvimento do estudo, constatou-se que as práticas de queimar ou enterrar o lixo, não eram realizadas diariamente. Isto fazia com que o mesmo fosse acumulado no quintal e só depois que atingia determinado volume era enterrado ou queimado. Considerando que as espécies de flebotomos adaptadas ao peridomicílio vivem sob material acumulado nos quintais das residências, incluindo o lixo (REBELO, 1999), o amontoamento do mesmo poderia contribuir para a manutenção da fauna flebotomínica.

Em relação ao esgoto, 53,5% dos domicílios do Brasil possuem rede coletora, enquanto que, na região Nordeste a cobertura é de 34,7%. Quanto a essa variável, o município da Raposa-MA assemelhou-se ao

observado no estado do Maranhão, onde 45,2% do esgotamento doméstico é realizado através da fossa séptica (IBGE, 2005).

MORENO et al (2005) estudando fatores de risco para infecção por *L. chagasi* em uma área urbana do Estado de Minas Gerais, apontaram como fator de risco para a infecção não ter o lixo coletado, lixo não removido e queimado. Estudo realizado em outra área endêmica para LV do Brasil, apontou que o sistema inadequado de esgoto e a coleta não regular do lixo, são fatores de risco para a aquisição da doença (COSTA et al., 2005). Nas localidades estudadas, a análise univariável mostrou que o destino dos dejetos não esteve associado ao risco de infecção e que, a coleta de lixo constituiu-se fator de proteção contra a infecção, quando o parâmetro utilizado foi o IDRM.

A criação de animais domésticos no domicílio e a presença de animais próximos ao domicílio foram mencionadas pela maioria dos moradores, sendo o cão o animal mais presente nos dois ambientes, fato também observado em outras áreas endêmicas da Ilha de São Luís (NASCIMENTO, 1996; GAMA et al., 1998) e do Maranhão (GAMA et al., 1998).

Quando se considerou os domicílios que, além de outros tipos de animais, criavam o cão, verificou-se que o mesmo estava presente em 90,9% dos domicílios. Esses resultados, quando comparados a anteriores nas mesmas áreas, onde o animal estava presente em 32,8% dos domicílios, sugerem mudanças nos hábitos referentes à criação de animais pelos moradores, o que pode justificar o incremento na população de cães.

A criação de cães, e sua presença próxima às residências são aspectos importantes na cadeia epidemiológica de transmissão da LV, pois, no ciclo urbano, o cão permanece como importante elo de transmissão por ser reservatório secundário da doença (DEANE, DEANE, 1955, 1962; EVANS et al., 1985) e porque a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos (GENARO et al., 1995; BRASIL, 1996).

Por outro lado, a presença de animais domésticos como cães, galinhas, cavalos entre outros, nos terrenos ao redor ou próximo da residência,

possibilita fonte abundante de alimentação para o flebotomíneo e pode favorecer a aproximação e a manutenção da população de vetores no peridomicílio. Em áreas endêmicas, tem sido verificado que capturas de flebotomíneos em habitações que não possuem animais domésticos não são bem sucedidas (ARIAS et al., 1996; DIAS et al., 2003).

A presença de galinheiro no peridomicílio, identificada como fator de risco para a infecção no estudo de Nascimento, (1996), não se constituiu, em nosso estudo, fator de risco para a infecção, enquanto que, a criação de animais no domicílio apresentou-se associado ao risco de infecção.

Na Ilha de São Luís, o *Lu. longipalpis* encontra-se amplamente distribuído, inclusive nas proximidades da orla litorânea, ao nível do mar e em locais descampados (REBÊLO et al., 1999). No município da Raposa, é a espécie de flebotomíneo mais freqüente e predomina sobre as outras espécies tanto no peri quanto no intradomicílio, presente em todos os meses do ano (ARAÚJO et al., 2000). Apesar dessas observações e das duas localidades serem endêmicas para LV, a presença do flebotomíneo não foi referida pela maioria da população. O percentual apresentado foi inferior ao mencionado por moradores da mesma área endêmica (CALDAS et al., 2001; GAMA et al., 1998) e de outras do estado do Maranhão (GAMA et al., 1998).

No estudo de Caldas et al (2002) sobre fatores de risco para infecção, em crianças menores de 5 anos, na mesma área endêmica, a presença de flebotomíneo esteve associada ao risco de infecção. Surpreendentemente, em nosso estudo entretanto, a resposta negativa quanto a essa variável, mostrou-se associado ao risco. Esses resultados podem ser justificados pela dificuldade de observação do flebotomíneo em função de seu tamanho, e porque consideramos apenas as respostas da população estudada, sem a realização de um inquérito entomológico que confirmasse ou não, a presença do vetor.

Considerando que as duas localidades são endêmicas para a LV, questionou-se aos pais e/ou responsáveis pelas crianças sobre a história

familiar progressiva de LV, sendo a mesma referida em ambas (19,0%). O relato de casos da doença na família que foi identificado como fator de maior risco de exposição por NASCIMENTO (1996), ao estudar a epidemiologia da transmissão da LV, na Ilha de São Luís-MA, não se constituiu fator de risco associado à infecção em nosso estudo. Já para a doença, tem sido relatado que crianças que residem em domicílios com caso anterior de LV têm risco relativo de 3,1 de desenvolver a doença, quando comparadas àquelas que residem em domicílios sem história progressiva de LV (EVANS et al., 1992). A história de LV entre irmãos e primos das crianças estudadas, pode sugerir agregação familiar da infecção.

O IDRM é um teste utilizado para detectar infecção por *L. chagasi*. Na LV infecção, o teste mostra-se positivo e, por esse motivo, tem sido utilizado em inquéritos epidemiológico que visem avaliar a prevalência e incidência de infecção por *L. chagasi* (CALDAS et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2005).

O teste foi realizado em 1080 crianças no inquérito inicial e detectou prevalência de 31,8%, que foi superior aos 18,6% relatado para a mesma área endêmica (CALDAS, 1999) em outras áreas endêmicas do Brasil como Jacobina-BA (TEIXEIRA, 1980), e Porteirinha-MG (BORGES et al., 2003), e em outra região do mundo, no Quênia – Leste da África (10,5%) (SCHAEFER et al., 1994). Entretanto, a prevalência foi inferior à detectada em outras áreas endêmicas do Maranhão, onde foram observados valores de 63,2% (NASCIMENTO, 1996) e 61,7% (NASCIMENTO et al., 2005), e de outros lugares do mundo onde o teste identificou prevalências de 45,9% na Tunísia – Norte da África (BEN SALAH et al., 2003) e 46,5% na Etiópia – Leste da África (ALI & ASHFORD, 1993). Essas diferenças podem ser decorrentes das diferenças entre as faixas etárias estudadas pelos diversos autores ou, à maior ou menor exposição ao flebotômíneo infectado, ou ainda, à maior capacidade de resposta imune celular pelos indivíduos estudados.

Já a incidência de infecção detectada pelo IDRM no 12º mês de observação mostrou que 24,6% das crianças infectaram-se durante este

período. Esses resultados vão de encontro ao observado por CALDAS (1998), que verificou incidência de 10,8%. É importante destacar que no estudo de CALDAS (1998), a população estudada foi de crianças com até cinco anos de idade, e que a repetição do IDRM foi realizada após intervalo de seis meses, o que pode justificar a diferença dos resultados. Já a incidência no 24º mês de observação foi 7,2%. Considerando que o IDRM foi realizado anualmente, e que a positividade ao IDRM se constituiu critério de saída do estudo, a população que permanecia em seguimento poderia estar menos suscetível, possivelmente justificando a menor incidência no 24º mês de observação.

Quanto ao sexo, a prevalência detectada pelo IDRM assemelhou-se entre os dois, concordando com os achados de CALDAS (1999) e NASCIMENTO et al., (2005). Entretanto, ALI & ASHORD (1993) num estudo prospectivo conduzido na Etiópia, observaram maior frequência de positividade no sexo masculino (62,5%). É interessante destacar que, durante a realização do estudo, foram observadas nas áreas estudadas, crianças menores de 10 anos brincando ao ar livre, durante todo dia, e com a área corporal exposta, em função de pouca roupa usada por ambos os sexos, fazendo com que a chance de ser picado pelo flebotômíneo fosse a mesma, o que pode justificar os resultados encontrados.

O número de crianças positivas ao IDRM, foi maior no grupo de 7 a 9 anos, tanto na prevalência quanto na incidência medida no 12º e 24º meses de observação. Tais resultados concordam com o referido na literatura, em que, a positividade ao IDRM tende a aumentar com a idade (CALDAS, 1999; KHALIL et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2005; MORENO, 2006).

O teste ELISA é utilizado para o diagnóstico sorológico da LV doença e sua positividade, na ausência de sinais e sintomas, define infecção e por este motivo, também tem sido empregado em estudos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas (CALDAS, 2001; BRASIL, 2004).

Nesse estudo, o ELISA detectou prevalência de 17,1% na população analisada, que foi semelhante á observada por NASCIMENTO et al.,

(2006) em outra área endêmica de LV na Ilha de São Luís-MA, porém superior aos 13,5% referido por Caldas et al (2001) na mesma área endêmica.

É relatado na literatura que em áreas endêmicas de LV, uma proporção de indivíduos infectados desenvolve a doença (TEIXEIRA, 1980; BADARÓ et al., 1986a; NASCIMENTO, 1996; CALDAS et al., 2001; GAMA, 2001; BUCHETON, 2003; NASCIMENTO et al., 2006), e que na forma assintomática os títulos são baixos (BRASIL, 2004), Apesar dessas observações, e de terem sido identificados altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, nas crianças da coorte, verificou-se que estes controlaram a infecção por período de no mínimo 24 meses, uma vez que, nenhuma desenvolveu a doença durante o período de seguimento, contrariando o referido na maioria dos trabalhos.

Dados de áreas endêmicas do Brasil apontam que crianças quanto mais jovens e mais desnutridas, mais susceptíveis são à LV doença (DYE & WILLIAMS, 1993). CALDAS et al., (2001), em estudo realizado na mesma área endêmica, constataram que a desnutrição crônica nessas localidades foi superior à encontrada para Brasil e o Estado do Maranhão. É possível que, na área endêmica, o número de indivíduos desnutridos ou a gravidade da desnutrição tenha diminuído, sendo esta uma possível justificativa para tais resultados.

Na avaliação dos fatores associados à infecção, pela análise univariável, as variáveis “sexo” e “idade” mostraram-se associadas à infecção, apenas quando o parâmetro para a infecção foi o teste ELISA. Essa associação não foi observada por Caldas et al (2002), porém referidas por Nascimento (1996) no que concerne a variável “idade”. Quando se procedeu a análise multivariável, o sexo feminino apresentou-se como fator de proteção.

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pelo ELISA mostrou altos títulos de anticorpos em todas as etapas do estudo. No inquérito inicial, 80 crianças apresentaram títulos que variaram de 0.101 a 0.722; no 6º mês, 11 (0.101 a 0.244), no 12º mês, 16 (0.101 a 0.459); no 18º mês, 27 (0.101 a 0.961)

e no 24^o mês, 79 crianças (0.101 a 0.542). Esses resultados levam a acreditar que altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, isoladamente não são determinantes na evolução da infecção para a doença, confirmando o observado por BUCHETON et al., (2003) em Barbar El Fugara, outra área endêmica do mundo, no leste do Sudão.

Os resultados relativos à pesquisa de IgG anti-saliva do flebotômíneo demonstraram que, a despeito de muitas crianças terem sido expostas ao flebotômíneo infectado como evidenciado pela positividade ao IDRM e a pesquisa de IgG anti-*Leishmania*, poucas desenvolveram anticorpos anti-saliva do flebotômíneo. Esses resultados podem indicar que a saliva do flebotômíneo, em residentes de áreas endêmicas de LV possui poder imunogênico inferior ao da *L. chagasi*, e levam-nos a questionar a sua utilização como marcador epidemiológico de exposição como sugerido por BARRAL et al., 2000.

Quando se comparou os níveis de IgG anti-saliva no inquérito inicial entre os grupos etários, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa, sugerindo que em áreas endêmicas de LV o poder imunogênico da saliva do flebotômíneo é similar em todos os grupos de idade. Resultados esses, diferentes do de PENG et al. (2004), que avaliando os níveis de anticorpos específicos para a saliva do *Aedes vexans*, observaram uma correlação inversa entre idade e níveis de IgG específicos da saliva. PENG & SIMONS (1998) e PENG et al. (2004) demonstraram que dessensibilização natural a picadas de mosquitos ocorre ao longo do tempo, fato este comprovado em relação ao *Lu. longipalpis* uma vez que em todos os grupos etários, observou-se a redução dos níveis de anticorpos quando comparados ao inquérito inicial ao sexto e décimo oitavo mês de seguimento.

Evidência de correlação positiva entre anticorpos IgG anti-saliva do flebotômíneo e uma positividade ao IDRM, foi fornecida por Barral et al, (2000) ao estudarem o soro de 60 crianças da mesma área endêmica. Nós conduzimos um estudo de coorte prospectivo e demonstramos que os anticorpos IgG do *Lu. longipalpis* se correlacionam positivamente ao desenvolvimento da imunidade celular medida pelo IDRM, apesar do baixo

poder imunogênico da saliva. Proteção conferida contra a L.C. em camundongos, pela pré-exposição a picadas de flebotomos foi observada por KAMHAWI et al, (2000), sendo demonstrado que a mesma associou-se à reação de hipersensibilidade tardia. Por outro lado, a pré-exposição à saliva em residentes de área endêmica poderia estar contribuindo para criar um ambiente inóspito para o estabelecimento do parasita, como observado por SILVA et al, 2005 em modelo murino. Nossos resultados sugerem que a imunidade desenvolvida contra a saliva do flebotomíneo aumenta a resposta imune contra antígenos de *Leishmania*, protegendo os indivíduos saliva positivos do desenvolvimento da doença, uma vez que, a positividade ao IDRM é normalmente associada com resistência.

Algumas limitações podem ser apontadas no estudo, entre elas, o uso do antígeno bruto, para a realização da pesquisa de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis*, cuja concentração pode variar de um exemplar para outro, e a não realização do inquérito entomológico, para comparar a densidade vetorial e positividade ao ELISA anti-saliva.

Como perspectiva para novas investigações, a utilização de proteínas recombinantes do *Lu. longipalpis* e a realização de inquérito entomológico concomitantemente ao do humano.

7 ASPECTOS IMPORTANTES NO ESTUDO

- Altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* não foram determinantes para a ocorrência de LV doença em 12 a 24 meses de acompanhamento.
- A criação de animal esteve associada ao risco de infecção por *L. (L.) chagasi*, quando o parâmetro utilizado foi o ELISA.
- O abastecimento de água de poço, criação de animais domésticos e resposta negativa quanto à presença de flebotomíneos no intra e peridomicílio, mostraram-se associadas ao risco de infecção quando o parâmetro foi o IDRM.
- Com o passar do tempo, ocorreu um declínio dos anticorpos anti-saliva.

8 CONCLUSÕES

- Os resultados do teste IDRМ e da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* revelaram que um grande percentual de crianças da amostra estudada foi exposto ao flebotomíneo, entretanto uma pequena parcela apresentou anticorpos anti-saliva positivo no momento da análise.
- Houve associação estatisticamente significativa entre positividade de anticorpos IgG anti-saliva do flebotomíneo e a imunidade mediada por células, medida pelo IDRМ.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J.B. Dispersal of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Colombian coffee plantation. **J. Med. Entomol.** **24**: 552-558, 1987.
- ALI, A; & ASHFORD, R.W. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. II. Annual leishmanin transformation in a population. Is positive leishmanin reaction a life-long phenomenon? **Ann. Trop. Med. I.**, **87**: 163-7, 1993.
- ALVIM, M.C.; ALVIM, M.A.C.; VALE, J.J.F. Situação atual de calazar na ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **19**: 73, 1986. Sup.
- ANDRADE, T.M.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **162**: 1354-1359, 1990.
- ARAÚJO, J.C.; REBÊLO, J.M.M.; CARVALHO, M.L.; BARROS, V.L.L., Composição dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do Município da Raposa-MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. *Entomol. Vect.*, 7:33-47, 2000.
- ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, **2**: 145-146, 1996.
- ASSREUY, J; CUNHA, F.Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.Y.; MONCADA, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.**, **24**: 672-676, 1994.
- BADARÓ, R.; CARVALHO, E.M.; ORGE, M.G.O.; TEXEIRA, R.S.; ROCHA, H. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**: 73-82, 1985.
- BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LOURENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**, **154**: 639-649, 1986(a).
- BADARO, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JHONSON JUNIOR, W.D. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **154**: 1003-1011, 1986 (b)
- BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A., COSTA, J.; VINHAIS, V.; ROWTON, E.D., VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R., BARRAL-NETO, M.; RIBEIRO, J.M.C. Human immune response to sand fly salivary glands antigens: a useful epidemiological marker? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **62**: 740-745, 2000.

BARROS, A.J. & HIRAKATA, V.N. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med. Res. Methodol.*, 3:21, 2003.

BELKAID, Y.; KAMAHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D.L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J. Exp. Med.*, **188**: 1941-53, 1998.

BELKAID, Y.; VALENZUELA, J.; KAMAHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D.L.; RIBEIRO, J.M.; Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**: 6704-6709, 2000.

BEN SALAH, A.; BEN ALAYA BOUAFIF, N.; CHLIF, S.; GHARBI, A.; BEL HAJ HAMIDA, N.; ZAATOUR, A.; DELLAGI, K. Risk factors of leishmanin-skin test positivity in transmission of *Leishmania infantum* in the center of Tunisia. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.*, **80**: 17-27, 2003.

BITTENCOURT, A.L. & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: Doerr W, Seifert G (eds): *Tropical Pathology, Springer, Berlin*, **8**: 597-651, 1995.

BORGES, V.C.; RUIZ, M.C.M.; GOMES, P.M.; COLOMBO, A.R.; SILVA, L.A.; ROMERO, H. D.; PRATA, A. Intradermorreação de Montenegro após sucessivas repetições do teste em Porteirinha, MG. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **36**: 249-251, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento de leishmaniose Visceral (Calazar) - Normas Técnicas**. Brasília, 1996. 103 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância de controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.120p.

BRASIL. **Série histórica de casos e óbitos de doenças de notificação compulsória - Brasil, 1980-2003**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf//planilhas_dnc_casos%20obitos%20obitos_18_08_04.pdf. Acesso em 2 .mar., 2005.

BRASIL. Leishmaniose Visceral (Calazar) - **Distribuição de casos confirmados, por União Federada. Brasil, 1980-2005**. Disponível em : <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leish_visceral.pdf. Acesso em 27.mar.2006.

BUCHETON, B.; EL -SAFI, S.H.; HAMMAD, A.; KHEIR, M.M.; EUDES, N.; MIRGANI, A.; DESSEIN, A.J.; MARY, C. Antileishmanial antibodies in an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan: high antibody responses

occur in resistant subjects and are not predictive of disease. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, **97**: 463-368, 2003.

BUSS, P.M. Promoção da saúde e qualidade de vida. **Cienc. Saud. Colet.**, **5**: 163-177, 2000.

CALDAS, A.J.M. **Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana (LVA), na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil.** São Luís, 1998. 155 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão.

CALDAS, A.J.M.; SILVA, D.R.C.; PEREIRA, C.C.R.; NUNES, P.M.S.; SILVA, B.P., SILVA, A.A.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís-MA, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**: 445-451, 2001.

CALDAS, A.J.M.; COSTA, J.M.L.; SILVA, A.A.M.; VINHAS, V.; BARRAL, A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, **96**: 21-28, 2002.

CALDAS, A.J.M. **Marcadores de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral humana em criança e adultos.** 2004. 103 f. tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Salvador. Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisa Gonçalo. 2004.

CALDAS, A.J.M; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V.; WEYNBERGH, J. V.; BRODSKY, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Balance of IL-10 and Interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **Bmc Infect. Dis.**, **5**: 1-9, 2005.

CALDAS, A.J.M; COSTA, J.; AQUINO, D.; SILVA, A.A.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis?. **Acta Tropica.**, **97**: 252-258, 2006.

CARVALHO, E.M; BADARÓ, R.; REED, S.G.; JONES, T.C.; JOHNSON Jr, W.D. Absence of Gamma Interferon and Interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, **76**: 2066-2069, 1985.

CARVALHO, E.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H.; JOHNSON JR, W.D. Immunological markers of clinical evolution in children recently infected with *L. chagasi*. **J. Infect. Dis.**, **165**: 535-540, 1992.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, R.G. Restoration of IFN- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **52**: 5949-5956, 1994.

CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P.; JESUS, A.R. Imunidade e infecção. **Medicina**, Ribeirão Preto, **28**: 253-283, 1995.

CHANG, K.P. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **30**: 322-33, 1981.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J.G.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M.C. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **96**: 15155-15160, 1999.

CHARLAB, R.; ROWTON, E.D; RIBEIRO, J.M. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Exp Parasitol.**, **95**: 45, 2000.

CHER, D.J. & MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J. Immunol.**, **138**:3688-3694, 1987.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev. Saúde Pública**, **24**: 361-372, 1990.

COSTA, J.M.L; VIANA, G.M.C.; SALDANHA, A.C.R.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; ALVIN, A.C.; BURATTINI, M.N.; SILVA, A.R. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cad. Saúde Publ.**, **11**: 321-324, 1995.

COSTA, J.D.; FAVALI, C.; CLARÊNCIO, J.; AFONSO, L.; CONCEIÇÃO, V.; MIRANDA, J.C.; TITUS, R.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A; BRODSKY, C.I. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and coestimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect. Immun.**, **72**: 1298-1305, 2004.

COSTA, C.H.N.; WERNECK, G L.; RODRIGUES JR, L.; SANTOS, M.V.; ARAÚJO, I.B.; MOURA, L.S.; MOREIRA, L.S.; GOMES, R.B.; LIMA, S.S. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **99**: 229-236, 2005.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatório da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital** **48**: 61-70, 1955..

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Med. Trop.** **4**:198-212, 1962.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Tran. R. Soc. Med. Hyg.**, **95** : 239-43, 2001.

DIAS, F.O.P.; LAROSA, E. S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Publ.**, **19**: 1373-1380, 2003.

DYE, C. & WILLIAMS, B.G. Malnutrition age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proc Biol Sci**, **254**: 33-9, 1993.

EVANS, T.; REIS, M.F.; ALENCAR, J.E.; NAIDU, T.G.; JESUS, J.A.; McAULIFFE, J.F.; PEARSON, R.D. American visceral leishmaniasis (kala-azar). **West. J. Med.**, **142**: 777-781, 1985.

EVANS, G.T.; TEIXEIRA, M.J.; McAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; SOUSA, A.Q.; LIMA, J.W.O.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **J. Infec. Dis.**, **166**: 1124-32, 1992

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. FUNASA. Ministério da Saúde. **Resumo do Sistema de Reconhecimento Geográfico do Município da Raposa-MA.** 2005, 2 págs.

GALATI, E.A.B; NUNES, V.L.B.; REGO JR, F.A.; OSHIRO, E.T.; CHANG, M.R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Saude Publ.**, **31**: 378-390, 1997.

GAMA, M.E.A.; BARBOSA, J.S.; CUNHA, A.K.B.; FREITAS, A.L.; RIBEIRO, I.R.; COSTA, J.M.L. Avaliação do nível de conhecimento que a população residente em área endêmica periurbana e rural, têm sobre leishmaniose visceral, estado do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pub.**, **14**: 109-118, 1998.

GAMA, M.E.A. **Perfil clínico e laboratorial da forma oligossintomática da leishmaniose visceral americana.** 201. 100f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GAMA, M.E.A.; CORBETT, C.E.P.; GOMES, C.M.C.; COSTA, J. Subclinical form of the American Visceral Leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **99**: 889-893, 2004a.

GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L; PEREIRA, J.C.R.; GOMES, C.M.C.; COBERT, C.E.P. Serum Cytokine Profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **37**: 129-136, 2004b.

GENARO, O.; SILVA, A.F.; MICHALICK, M.S.M.; COSTA, C.A; MAYRINK, W.; DIAS, M. *Leishmaniose visceral americana.* In: *Parasitologia Humana* (D. P. Neves, A. L. Melo, O. Genaro & P. M. Linardi, orgs.), pp. 55-72. São Paulo: Ed. Atheneu. 1995.

GOMES, R.; BRODSKY, C.; DE OLIVEIRA, C.I.; COSTA, J.; MIRANDA, J.C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J.G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the

development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **J. Infect. Dis.**, **186**: 1530-1534, 2002.

GHOSH, K.N. & MUKHOPADHYAY, J. The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. **Int. J. Parasitol.**, **28**: 275-81, 1998.

HANDMAN, E. & BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitol** **18**:332–334, 2002.

HARISSON, L.H.; NAIDER, T.G.; DREW, J.S.; DE ALENCAR, J.E. ; PEARSON, R.D. Reciprocal relationships between undernutrition and parasitic disease visceral leishmaniasis. **Rev. Infect. Dis.** **8**: 447-453, 1986.

HIROHASHI, N. & MORRISON, D.C. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production *in vitro*. **Infect. Immun.**, **64** : 1011-1015, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Município de São Luís: informações básicas**. 9 pags. 2004

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Síntese do indicadores sociais – 2004**. Rio de Janeiro, 359 pags, 2005.

JERÔNIMO, S.M.; OLIVEIRA, S.M.; MACKAY, S.; COSTA, R.M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E.T.; LUZ, K.E.; FERNANDES, M.Z.; JERNIGAM, J.; PEARSON, R.D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **88**: 386-388, 1994.

KHALIL, E.A.G; ZIJLSTRA, E.E.; KAGER, P.A.; EL HASSAN, A.M. Epidemiology and clinical manifestations of *Leishmania donovani* infection in two villages in an endemic eastern Sudan. **Trop. Med. Int. Health.**, **7**: 35-44, 2002.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science.**, **290**: 1351-1354, 2000.

KATO, T.; YAMANE, H.; NARIUCHI, H. Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages. **Cell. Immunol.**, **181** : 59-67, 1997.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin. Dermatol.**, **17**: 227-289, 1999.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. Review articles: logy supplement. **Nature**, **237**: 595-600, 1978.

LAUFS, H.; MULLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J.C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect. Immun.**, **70**: 826-35, 2002.

LERNER, E.A.; RIBEIRO, J.M.; NELSON, R.J.; LERNER, M.R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, **266**:11234-11236, 1991

LIMA, H.C. & TITUS, R.G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect Immunol.**, **64**: 5442-5445, 1996.

LIMA, G.M.; VALLOCHI, A.L.; SILVA, U.R.; BEVILAQUA, E.M., KIFFER, M. M.; ABRAHAMSOHN, I.A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, **64**: 145-151, 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chemistry.** **193**: 265-275 1951.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; AMENDOEIRA, M.M.R. Leishmaniose visceral – Calazar. **J. Bras. Med.**, **41**: 69, 1981.

MARZOCHI, M.C.A. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Rev. Patol. Trop.**, **23**: 82-84, 1994.

MATHEWS, G.V.; SIDJANSKI, S.; VANDERBERG, J.P. Inhibition of mosquito salivary gland apyrase activity by antibodies produced in mice imed by bites of *Anopheles stephensi* mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**: 417-23, 1996.

MAURICIO, I.L.; GAUNT, M.W.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitol.**, **122**:393-403, 2001.

MBOW, M.L.; BLEYENBERG, J.A.; HALL, L.R.; TITUS, R.G. *Phlebotomus papatasi* sand fly gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. **J. immunol.**, **161**:5571-5577. 1998

MONTEIRO, O.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **27**: 67-72, 1994.

MORENO, E.C.; MELO, M.N.; GENARO, O.; LAMBERTUCCI, J.R.; SERUFO, J.C.; ANDRADE, A.S.R.; ANTUNES, C.M.F.; CARNEIRO, M. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in na urban área of Minas Gerais State. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **38**: 460-463, 2005.

MORRIS, R.V.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; LANZARO, C.G.; TITUS, R.G. Sand fly Maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccination against it protects against *L. major* infection. **J. Immunol.** **167**: 5226-5230, 2001.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I- Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, **136**: 2348-2357, 1986.

MUNDER, M.; MALLO, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. **J. Exp. Med.**; **187**: 2103-2108, 1998.

MULLER, K.; VAN ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)**, **190**: 73-6, 2001.

NASCIMENTO, M.D.S.B. **Epidemiologia da leishmaniose visceral na Ilha de São Luís-Maranhão, Brasil: análise da dinâmica da transmissão e dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença.** Tese (Doutorado). São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 1996.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; COSTA, J.; FIORI, B.; VIANA, G.; ALVIM, A. BASTOS, NAKATANI, M.; REED, S.; BADARÓ, R.; SILVA, A. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose no Estado do Maranhão-Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **29**: 233-240, 1996.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; SOUSA, E.C.; SILVA, L.M.; LEAL, P.C.; CANTANHEDE, K.L.; BEZERRA, G.F.B.; VIANA, G.M.C. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cad Saude Publ.**, **21**: 1801-1807, 2005.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; BEZERRA, G.F.B.B.; BANDEIRA NETO, A.P.; SILVA, L.M.; BEZERRA, J.M.; VIANA, G.M.C. Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE anti-leishmania como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luís, MA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **39**: 38-42, 2006.

NORSWORTHY, N.B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand Fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating Interleukin-10 production. **Infect. Immun.**, **72**: 1240-1247, 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. OPAS. **Manual de Controle da Leishmaniose Visceral**. Genebra: Organização Mundial de Saúde, 1997. 89p.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. OPAS. Visceral Leishmaniasis. **Epidemiological Bulletin.**, **23**: 14, 2002.

PEARSON, R.D. & STEIGBIGEL, R.T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, **127** : 1438-43, 1981.

PEARSON, R.D.; COX, G.; JERONIMO, S.M.B.; CASCATRANE, J; DREW, J.S.; EVANS, T.; ALENCAR, J.E. Visceral Leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47** : 8-15, 1992.

PEARSON, R.D. & SOUSA A.D.O. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**, **22**: 1-13, 1996.

PENG, Z. & SIMINS, E.R. A prospective study of naturally acquired sensitization and subsequent desensitization and subsequent desensitization to mosquito bites and concurrent antibody response. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, **101**: 284-286, 1998.

PENG, Z.; HO, M.K.; LI, C.; SIMONS, E.R. Evidence for natural desensitization to mosquito salivary allergens: mosquito saliva specific IgE and IgG levels in children. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, **93**: 553-556, 2004.

PIMENTA, P.F.P.; MODI, G.B.; PEREIRA, S.T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D.L. A novel role for the peritrophic matrix in protection *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasit.**, **115**: 359-369, 1997.

RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; BARBOSA A.F.; ANDRADE, C.A. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz and Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae), under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**: 431-438, 1986.

REBÊLO, J.M.M.; MENDES, W.A.; COSTA, J.M.L.; CAVALEIRO, L. Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do estado do Maranhão, Brasil. **Cad. Saude Publ.**, **12**: 545-549, 1996.

REBÊLO, J.M.M. **Flebótomos Vetores das Leishmanioses. Manual para técnicos e profissionais da área de saúde**. Universidade Federal do Maranhão/Ministério da Saúde. 1999. 32p.

REBÊLO, J.M.M.; ARAÚJO, J.A.C; CARVALHO, M.L.; BARROS, V.L.L.; SILVA, F.S.; OLIVEIRA, S.T. Flebótomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São

Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32**: 247-253, 1999.

REED, S.G.; BADARÓ, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E.M.; LORENÇO, R.; LISBOA, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR., W.D.; JONES, T.C. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**: 79-85, 1986.

REIMANN, T.; BUSCHER, D.; HIPSKIND, R.A.; KRAUTWALD, S.; LOHMANN-MATTHES, M.L.; BACCARINI, M. Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 beta and the TNF-alpha genes. **J. Immunol.**, **153** : 5740-5749, 1994.

RIBEIRO, J.M.; ROSSIGNOL, P.A.; SPIELMAN, A. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, **83**: 686-686, 1986.

RIBEIRO, J.M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.** **32**: 463 -478, 1987

RIBEIRO, J.M; VACHEREAU, A.; MODI, G.B.; TESH, R.B. A novel vasodilatatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Science** **243**: 212-214, 1989.

RIBEIRO, J.M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, **4**: 143-152, 1995.

RIBEIRO, J.M.; CHARLAB, R.; ROWTON, E.D.; CUPP, E.W. *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland activity. **J. Med. Entomol.** **37**: 743-747, 2000

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by co-injection with sand fly saliva. **J Exp Med.**, **173**: 49-54, 1991.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**, **12**: 315-7, 1998.

SCAPINI, P. ; LAPINET-VERA, J.A. ; GASPERINI. S.; CALZETTI, F. ; BAZZONI, F. ; CASSATELLA, M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol. Rev.**, **177**: 195-203, 2000.

SCHAEFER, K.U.; KURTZHALS, J.A.; KAGER, P.A.; GACHIHI, G.S.; GRAMICCIA, M.; KAGAI, J.M.; SHERWOOD, J.A.; MULLER, A.S. Studies on the prevalence of leishmanin skin test positivity in the Baringo District, Rift Valley, Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **50**: 78-84, 1994.

SCHARTON, T.M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon- γ

that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J Exp Med** **178**: 567-577, 1993.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO MARANHÃO (SES-MA). **Casos novos e confirmados de LV – 2000 a 2006. Frequência por Município de residência e ano de notificação.** 2006, 3 pags.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE (SEMUS). Programa Saúde da Família. **Número populacional da Raposa-MA, por faixa etária.** 1 pag., 2005.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE (SEMUS) Centro de Controle de Zoonoses – Programa de Controle das Leishmaniosse. **Registro Casos novos e confirmados de LV – Registro de casos de calazar humano no período de 1998 a 2005.** 50 pag., 2006.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **89**: 471- 478, 1994.

SHERLOCK, I.A.; GUITTON, N. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia IV. Variação horária e estacional do *Phlebotomus longipalpis*. **Rev. Brás. Malariol. Doen. Trop.** **21**: 715-727, 1969a.

SHERLOCK, I. A. & GUITTON, N. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia III - Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis* o principal transmissor.. **Rev. Brás. Malariol. Doen. Trop.** **21**: 541-548, 1969 b.

SIELING, P.A. & MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology.**, **191**: 378-387, 1994.

SILVA, A.R.; VIANA, G.; VARONIL, C.; PIRES, B.; COSTA, J.M.L. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luis, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30**: 359-368, 1997.

SILVA, F.; GOMES, R.; PRATES, D.; MIRANDA, J. C.; ANDRADE, B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **72**: 94-98, 2005.

SIMPLÍCIO, A.; FURTADO, J.B.V.; MONTEIRO, O.S.; GARRETT, D. Leishmaniose Visceral no Brasil: análise epidemiológica nos últimos 16 anos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**: 298 , 2002.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, **49**:311-330, 2006.

SINGH, S. & SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of Leishmaniasis. **J. Postgrad Med.**, **49**: 55-60, 2003.

SOARES, M.B.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sandfly salivary inhibits TNF- α and induced IL-6 by mouse macrophage thought interaction with the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor. **J. Immunol.**, **160**: p.1811, 1998.

SOKAL, J.E. Editorial: measurement of delayed skin-test response. **New England J. Med.**, **297**: 501-502, 1975.

STEVENS, T.L.; BOSSIE, A.; SANDERS, V.M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; COFFMAN, R.L.; MOSMANN, T.R.; VITETTA, E.S. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature.**, **334**: 255-258, 1988.

TEIXEIRA, R. **Experiências vividas com a leishmaniose visceral, 1954-1980: aspectos epidemiológicos, sorológicos e evolutivos.** Tese de livre docência. 313 págs. Faculdade de Medica da UFBA. Salvador, 1980.

THEODOS, C.M.; RIBEIRO, J.M.; TITUS, R.G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infect Immun.**, **59**: 1592-1598, 1991.

TESH, R.B., 1995. Control of zoonotic Leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **52**: 287-292.

TITUS, R.G. & RIBEIRO, J.M. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. **Parastol. Today**, **6**: 157-160, 1990.

TITUS, R.G.; THEODOS, C.M.; SHANKAR, A.; HALL, L.R. Interaction between *Leishmania major* and macrophages. **Immunol. Ser.**, **60**: 437-459. 1994.

TRAINING IN TROPICAL DISEASES (TDR). Leishmaniasis. **News & Analysis**. **2**: 692- 693, 2004.

VALENZUELA, J.G.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M.K.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.D.; SACKS, D.L.; RIBEIRO, J.M.C. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J. Exp. Med.**, **194**: 331-342, 2001

WALTERS, L.L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **J. Eukaryot. Microbiol.**, **40**: 196-206, 1993.

WALTERS, L.L.; IRON, K.P.; GUZMAN, H.; TESH, R.B. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera:Psycodidea). **J. Med. Entomol.**, **32**: 711-725, 1995.

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* siblings species differs in its composition and capacity

to enhance leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, **345**:223-230.1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of leishmaniasis. Geneva WHO **Techn. Rep. Ser.**, **793**. 158 p.1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector control: methods for use by individuals and communities**. Geneva, 1997. 390 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Geographical distribution, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Urbanization: an increasing risk factors for leishmaniasis. **Wkly Epidemiol. Rec.**, **77**: 365-370, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Strategic emphases for research. Disponível em <<http://WHO.int/tdr/diseases/leish/strategy.htm>>. Acesso em 4.03.2006.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J.C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.**; **18**: 272-278, 2002.

ZILTRA, E.E. & EL-HASSAN, A.M. Leishmanin and tuberculin sensitivity in leishmaniasis in the Sudan, with special reference to kala-azar. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, **87**: 425-427, 1993.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

FICHA PARA O CENSO

Ficha n.º _____ Data do preenchimento: ___/___/___

Localidade: _____ Município: _____

Chefe da família: _____ Apelido: _____

Endereço (rua, n.º da casa, quadra, n.º da FNS) _____

Ponto de referência: _____

Total de moradores na casa: _____

Número de crianças com menos de 10 anos de idade: _____

Crianças menores de dez anos de idade:

Criança 01. Nome: _____ D.N. ___/___/___

Criança 02. Nome: _____ D.N. ___/___/___

Criança 03. Nome: _____ D.N. ___/___/___

Criança 04. Nome: _____ D.N. ___/___/___

Criança 05. Nome: _____ D.N. ___/___/___

Criança 06. Nome: _____ D.N. ___/___/___

Responsável pelo censo: _____

APÊNDICE 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Ficha de aprazamento

Nº da ficha: _____ Agente de Saúde da família _____

Chefe da família: _____ Apelido: _____

Endereço (rua, nº, quadra, nº da FNS, etc) _____

Ponto de referência _____

Atendimento		Nome dos participantes	Retorno		Nº de registro
Data	Horário		Data	Horário	

APÊNDICE 3

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – Dados de identificação da mãe/pai do menor ou seu responsável legal

1. Nome do menor : _____

2. Sexo: M () F () **Data de nascimento :** __/ __/ __

Endereço: _____

Bairro: _____ **Cidade :** _____

CEP: _____ **Telefone** _____

2. Responsável legal: _____

Natureza do parentesco: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ **Cidade :** _____

CEP: _____ **Telefone** _____

I I – Explicações do pesquisador ao pai/mãe/responsável pela criança.

1. A Leshmaniose Visceral ou Calazar é uma doença que acomete frequentemente crianças menores de dez anos que residem em áreas com grande número de casos. Até o momento, não existem vacinas contra a doença, mas estudos realizados parecem indicar que o mosquito responsável pela transmissão da doença desempenha um papel importante para o seu desenvolvimento.
2. Para a realização desta pesquisa serão realizados os seguintes procedimentos com a criança: exame físico seguido de coleta semestral de 2 a 5 ml de sangue periférico e aplicação anual de IDR

no antebraço da criança. Estes procedimentos serão realizados anualmente. Se necessário, haverá coleta adicional de 20 ml de sangue.

3. Os desconfortos que poderão ocorrer são: dor no local da punção venosa e da aplicação do IDRМ. Poderá ainda ocorrer coceira, vermelhidão e formação de uma pápula no local da IDRМ.
4. Que tenho o direito de retirar o menor sob a minha responsabilidade, a qualquer momento da pesquisa, se assim o desejar, bastando para isso comunicar a minha decisão á professora responsável pela pesquisa, sem que isto prejudique o seu atendimento ou da família em qualquer serviço de saúde da UFMA ou FNS-MA.
5. Que haverá garantia para o atendimento, pela equipe da pesquisa, das alterações simples de saúde que o menor venha a apresentar.
6. Ocorrendo algum problema com as crianças ou dúvidas em relação à pesquisa e exames, procurar o Núcleo de Patologia e Medicina Tropical da Universidade Federal do Maranhão, localizado à Praça Madre Deus, s/n. Bairro Madre Deus. São Luís – MA. O atendimento será realizado por um dos membros integrantes da pesquisa.

IV – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto que meu filho/filha participe da pesquisa.

Raposa (MA), _____ de _____ de _____

Assinatura do responsável pela
criança.

Assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador

Apêndice 4

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

QUESTIONÁRIO

Ficha n.º _____

Data do preenchimento ___/___/___

I. IDENTIFICAÇÃO DA MÃE / RESPONSÁVEL

1. Nome: _____	Apelido _____	
2. Residência atual _____		Residual _____
3. Tempo de residência na localidade _____		Temporal _____
4. Última procedência _____		Último proced _____
5. Há quanto tempo _____		Tempo proced _____

II. DADOS SOCIOECONÔMICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E AMBIENTAIS.

6. Tipo de residência () 1.Casa 2.Apartamento 3.Outro _____		Reside _____
7. Tipo de parede da residência () 1.Alvenaria 2. Palha 3. Taipa 4. Adobe 5. outro _____		Parede _____
8. Tipo de Cobertura () 1.Telha 2.Palha 3.Laje 4.Outro _____		Cobertura _____
9. Número de pessoas residentes na casa _____		Pessoas _____
10. Procedência da água usada para beber () 1.Redes pública 2.Poço 3.Rio, riacho _____		Água _____
11. Destino do lixo () 1.Coleta pública 2.À céu aberto 3.Queimado 4.Enterrado 5.Outro _____		Lixo _____
12. Destino dos dejetos () 1.Redes de esgoto 2.Fossa séptica 3.Fossa negra 4.Vala 5.Mato 6.Outro _____		Dejetos _____
13. Criação de animais domésticos na casa () 1.Sim 2.Não _____		Anidom _____
14. Tipo de animal criado () 1.Cão 2.Gato 3.Macaco 4.Cavalo 5.Outro _____		Tipanimal _____
15. Presença de animais próximo de sua casa () 1.Sim 2.Não _____		Aniprox _____
16. Tipo de animais próximo à casa () 1.Cão 2.Gato 3.Mucura 4.Raposa 5. Outros _____		Tipaniprox _____
17. Presença de chiqueiro próximo à casa () 1.Sim 2.Não _____		Chiqueiro _____
18. Presença de galinheiro próximo à casa () 1.Sim 2.Não _____		Galinheiro _____
19. Presença de arrupiado (flebotomo) dentro/fora da casa () 1.Sim 2.Não _____		Arrupiado _____
20. Casos de Calazar na família () 1.Sim 2.Não 3.Ignorado _____		Calazar _____
21. Caso a resposta anterior seja positivo, grau de parentesco () 1.Irmão 2.Mãe 3.Pai 4.Tio 5.Avô 6.Avô 7. _____		ParentLVA _____

Primo 8. Outro _____	
----------------------	--

III. DADOS CRIANÇA

22. Nome _____ Apelido _____	
23. Sexo () 1.Masculino 2.Feminino	Sexo _____
24. Cor () 1.Branca 2.Preta 3.Parda Outra _____	Cor _____
25. Data do nascimento ___ / ___ / ___ Idade _____	Idade _____
26. Costuma brincar ao redor da casa no final da tarde () 1.Sim 2.Não	Brincar _____
27. Usa mosquiteiro para dormir () 1.Sim 2.Não	Mosquiteiro _____
28. História de LVA () 1.Sim 2.Não	HistLVA _____
29. História de LVA há quanto tempo ?	TempLVA _____

IV. PRIMEIRO EXAME FÍSICO DA CRIANÇA

30. Data ___ / ___ / ___	
31. Peso _____	Peso1 _____
32. Altura _____	Altura1 _____
33. Linfonodos palpáveis () 1.Sim 2.Não	Linfonodos1 _____
34. Localização linfonodos _____	Loclinfo1 _____
35. Hepatomegalia () 1.Sim 2.Não	Hepato1 _____
36. Tamanho da Hepatomegalia RCD AX	ThepaRDC1 _____ ThepaAX1 _____
37. Esplenomegalia () 1.Sim 2.Não	Espleno1 _____
38. Tamanho da esplenomegalia RCE	TesplenoRCE1 _____
39 Febre () 1.Sim 2.Não	Febre1 _____
40. Duração da febre _____	Durafebre1 _____
41. Perdeu de peso () 1.Sim 2.Não 3.Ignorado	Ppeso1 _____
42.Peso perdido _____	Pesoperd1 _____
42.IDRM 1 () 1.Positivo 2.Negativo	IDRM1 _____
43. ELISA 1 () 1.Positivo 2.Negativo	ELISA 1 _____
44. LVA () 1. Sim 2. Não	LVA1 _____
45. Quando LVA?	QdoLVA1 _____
46. Outras alterações _____	
47. Conduta _____ _____	

V - EXAMES REALIZADOS

Exames	Data realização	Data do resultado	Resultado
ELISA (α Leishmania)			
IDRM			
ELISA (α I-Saliva)			
OBS:			

VI. SEGUNDO EXAME FÍSICO DA CRIANÇA

48. Data ___ / ___ / ___	
49. Peso _____	Peso2 _____
50. Altura _____	Altura2 _____
51. Linfonodos palpáveis () 1.Sim 2.Não	Linfonodos2 _____
52. Localização linfonodos _____	Loclinfo2 _____
53. Hepatomegalia () 1.Sim 2.Não	Hepato2 _____
54. Tamanho da Hepatomegalia RCD AX	ThepaRDC2 _____ ThepaAX2 _____
55. Esplenomegalia () 1.Sim 2.Não	Espleno2 _____
56. Tamanho da esplenomegalia RCE	TesplenoRCE2 _____
57 Febre () 1.Sim 2.Não	Febre2 _____
58. Duração da febre _____	Durafbre2 _____
58. Perdeu de peso () 1.Sim 2.Não 3.Ignorado	Ppeso2 _____
59.Peso perdido _____	Pesoperd2 _____
60.IDRM 1 () 1.Positivo 2.Negativo	IDRM2 _____
61. ELISA 1 () 1.Positivo 2.Negativo	ELIS2 2 _____
62. LVA () 1. Sim 2. Não	LVA2 _____
63. Quando LVA? _____	QdoLVA2 _____
64. Outras alterações _____ _____	
65. Conduta _____ _____ _____	

VII - EXAMES REALIZADOS

Exames	Data realização	Data do resultado	Resultado
ELISA (α Leishmania)			
IDRM			
ELISA (α I-Saliva)			
OBS.:			

VIII. TERCEIRO FÍSICO DA CRIANÇA

66. Data / /	
67. Peso	Peso3
68. Altura	Altura3
69. Linfonodos palpáveis () 1.Sim 2.Não	Linfonodos3
70. Localização linfonodos	Loclinfo3
71. Hepatomegalia () 1.Sim 2.Não	Hepato3
72. Tamanho da Hepatomegalia RCD AX	ThepaRDC3 ThepaAX3
73. Esplenomegalia () 1.Sim 2.Não	Espleno3
74. Tamanho da esplenomegalia RCE	TesplenoRCE3
75 Febre () 1.Sim 2.Não	Febre3
76. Duração da febre	Durafebre3
77. Perdeu de peso () 1.Sim 2.Não 3.Ignorado	Ppeso3
78. Peso perdido	Pesoperd3
79. IDRM 1 () 1.Positivo 2.Negativo	IDRM3
80. ELISA 1 () 1.Positivo 2.Negativo	ELISA3
81. LVA () 1. Sim 2. Não	LVA3
82. Quando LVA?	QdoLVA3
83. Outras alterações	
84. Conduta	

IX - EXAMES REALIZADOS

Exames	Data realização	Data do resultado	Resultado
ELISA (α Leishmania)			
IDRM			
ELISA (α I-Saliva)			
OBS.:			

X. QUARTO FÍSICO DA CRIANÇA

85. Data / /	
86. Peso	Peso4
87. Altura	Altura4
88. Linfonodos palpáveis () 1.Sim 2.Não	Linfonodos4
89. Localização linfonodos	Loclinfo4
90. Hepatomegalia () 1.Sim 2.Não	Hepato4
91. Tamanho da Hepatomegalia RCD AX	ThepaRDC4 ThepaAX4
92. Esplenomegalia () 1.Sim 2.Não	Espleno4
93. Tamanho da esplenomegalia RCE	TesplenoRCE4
94. Febre () 1.Sim 2.Não	Febre4
95. Duração da febre	Durafebre4
96. Perdeu de peso () 1.Sim 2.Não 3.Ignorado	Ppeso4
97. Peso perdido	Pesoperd4
98. IDRM 1 () 1.Positivo 2.Negativo	IDRM4
99. ELISA 1 () 1.Positivo 2.Negativo	ELISA4
100. LVA () 1. Sim 2. Não	LVA4
101. Quando LVA?	QdoLVA4
102. Outras alterações	
103. Conduta	

XI - EXAMES REALIZADOS

Exames	Data realização	Data do resultado	Resultado
ELISA (α Leishmania)			
IDRM			
ELISA (α I-Saliva)			
OBS.:			

XII. QUINTO FÍSICO DA CRIANÇA

104. Data ____ / ____ / ____	
105. Peso _____	Peso5 _____
106. Altura _____	Altura5 _____
107. Linfonodos palpáveis () 1.Sim 2.Não	Linfonodos5 _____
108. Localização linfonodos _____	Loclinfo5 _____
109. Hepatomegalia () 1.Sim 2.Não	Hepato5 _____
110. Tamanho da Hepatomegalia RCD AX	ThepaRDC5 _____ ThepaAX5 _____
111. Esplenomegalia () 1.Sim 2.Não	Espleno5 _____
112. Tamanho da esplenomegalia RCE	TesplenoRCE5 _____
113. Febre () 1.Sim 2.Não	Febre5 _____
114. Duração da febre _____	Durafebre5 _____
115. Perdeu de peso () 1.Sim 2.Não 3.Ignorado	Ppeso5 _____
116. Peso perdido _____	Pesoperd5 _____
117. IDRM 1 () 1.Positivo 2.Negativo	IDRM5 _____
118. ELISA 1 () 1.Positivo 2.Negativo	ELISA5 _____
119. LVA () 1. Sim 2. Não	LVA5 _____
120. Quando LVA? _____	QdoLVA5 _____
121. Outras alterações _____ _____	
111. Conduta _____ _____	

XI - EXAMES REALIZADOS

Exames	Data realização	Data do resultado	Resultado
ELISA (α Leishmania)			
IDRM			
ELISA (α I-Saliva)			
OBS.: _____ _____			

XII. OUTRAS ANOTAÇÕES IMPORTANTES:
