



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**

**MARCADORES PRECOSES DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA  
NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA  
EM CRIANÇAS E ADULTOS.**

**ARLENE DE JESUS MENDES CALDAS**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2004**



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

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

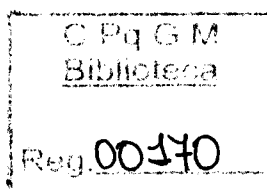
**MARCADORES PRECOSES DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA NA  
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA EM CRIANÇAS E ADULTOS.**

**ARLENE DE JESUS MENDES CALDAS**

**Orientador : Dra. 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  
2004



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador – Bahia

Caldas, Arlene de Jesus Mendes  
C145m Marcadores precoces de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral  
humana em crianças e adultos [manuscrito]. / Arlene de Jesus Mendes Caldas.  
– 2004.  
105 f. ; 29 cm.

Datilografado (fotocópia)  
Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina.  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.  
Orientadora: Profa. Dra. Aldina Maria Prado Barral, Laboratório de  
Imunoparasitologia.

1. Leishmaniose visceral humana. 2. Imunoglobulinas. 3. Imunidade  
celular. I. Título.

CDU 616.993.161:577.27

C16.993.161-085:577.27  
C145m

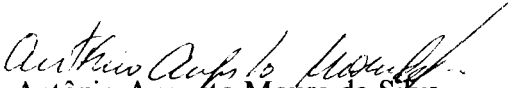
11/11/04  
121

Marcadores precoces de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral humana em crianças e adultos.

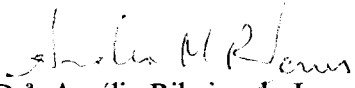
**ARLENE DE JESUS MENDES CALDAS**

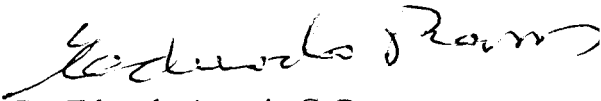
FOLHA DE APROVAÇÃO


COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dr. Antônio Augusto Moura da Silva  
Professor Adjunto  
UFMA

  
Dr. Carlos Henrique Nery Costa  
Professor Adjunto  
UFPI

  
Dr. Amélia Ribeiro de Jesus  
Professora Adjunta  
UFBA

  
Dr. Eduardo Antonio G. Ramos  
Pesquisador Titular  
CPqGM- FIOCRUZ

  
Dr. Aldina Maria Prado Barral  
Pesquisadora Titular  
CPqGM-FIOCRUZ

*Aos fatos que vivi.  
Aos receios que ainda temo.  
Aos desejos que ainda sonho.  
Às pessoas que observei.  
Aos amigos que ainda admiro.  
À minha mãe e meu pai (in memoriam) que amo  
Aos meus filhos e meu esposo que eu amo e amarei  
sempre.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos, Alyne e Anderson, meu amor e admiração.

A José Caldas, companheiro de 20 anos, meu amor e afeto.

A minha mãe e meus irmãos, meu carinho, amizade e ternura.

À Profª Drª Aldina Barral, pela orientação e amizade.

Aos Drs. Johan van Weyenbergh, Jackson Maurício Lopes Costa e Antônio Augusto Moura da Silva, pelas sugestões e críticas ao manuscrito.

A toda equipe (médicos, bioquímicos, enfermeiros, agentes de saúde) que trabalhou e apoiou de diversas formas, durante os quatro anos de estudo.

A equipe do laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, ressaltando por maior proximidade e amizade: Veras Vinhas e Cecília Favali.

Aos meus colegas do Departamento de Enfermagem/UFMA por todo o apoio, amizade e compreensão, em particular Dorlene Maria de Cardoso de Aquino.

Aos meus colegas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ/BA, pelo agradável convívio.

À Secretaria da Pós-Graduação em Patologia e do Laboratório de Imunoparasitologia pelo suporte administrativo.

À Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pelo suporte, e a bibliotecária Ana Fiscina Sampaio pela normalização desta tese e elaboração da ficha catalográfica.

Ao PRONEX pelo suporte financeiro, ao PICDT pela concessão da bolsa de estudo.

A todos, meus sinceros agradecimentos, certa que esse contato, esse apoio, essa corrente humana formada, profissional e emocional, foram fundamentais para o desenvolvimento desse estudo, assim como, para o meu desenvolvimento pessoal.

*O meu olhar é nítido como um girassol,  
Tenho o costume de andar pelas estradas  
Olhando para direita e para a esquerda,  
E de vez em quando olhando para trás...  
E o que vejo a cada momento  
É aquilo que nunca antes eu tinha visto,  
Eu sei dar por isso muito bem...  
Sei ter o pasmo essencial  
Que tem uma criança se, ao nascer,  
Reparasse que nascera deveras...  
Sinto-me nascido a cada momento  
Para a eterna novidade do Mundo...*

(Fernando Pessoa- O Guardador de rebanhos)

# SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	7
	LISTA DE TABELAS.....	8
	<b>RESUMO</b>	
	<b>ABSTRACT</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	11
2	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	31
3	<b>OBJETIVOS.....</b>	34
4	<b>MATERIAL E METODOS.....</b>	35
5	<b>RESULTADOS.....</b>	47
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	68
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	83
	REFERÊNCIAS .....	84
	APÊNDICE.....	95
	ANEXO I – Ficha protocolo.....	97
	ANEXO II – Dados laboratoriais.....	102
	ANEXO III- Níveis de IgG.....	104
	ANEXO IV- Produção Científica (2000 a 2003).....	105



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Distribuição das médias de IgG (cut-off $\geq$ 0,056), IgG1 (cut-off $\geq$ 0,044), IgG2 (cut-off $\geq$ 0,023), IgG3 (cut-off $\geq$ 0,012) e IgG4 (cut-off $\geq$ 0,013) de crianças e adultos em densidade ótica (OD) nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento ..... 54
- Figura 2 Concentrações plasmáticas de IgG (cut-off=0,056) em densidade ótica (OD) de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: zero dia, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as médias..... 56
- Figura 3 Concentrações plasmáticas de IgG1 (cut-off=0,044) em densidade ótica (OD) de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as médias. .... 56
- Figura 4 Concentrações plasmáticas de IgG3 (cut-off= 0,012) em densidade ótica (OD) de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as médias..... 57
- Figura 5 Concentrações plasmáticas de IgE ( cut-off= 0,027) em densidade ótica (OD) de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: zero dia, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as médias..... 58
- Figura 6 Distribuição do percentual de conversão do teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM) após tratamento de crianças e adultos com leishmaniose visceral..... 59
- Figura 7 Índice de estimulação linfocitária em crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as medianas. SI  $\geq$  5. .... 60
- Figura 8 Concentrações de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de CMPS estimuladas com antígeno de *Leishmania* e em plasma de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto representa um indivíduo. As barras horizontais indicam a mediana. .. 64
- Figura 9 Concentrações de IL-10 em sobrenadante CMPS estimuladas com antígeno de *Leishmania* e em plasma de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto representa um indivíduo. As barras horizontais indicam a mediana. .... 65

- Figura 10 Concentrações de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de CMPS estimuladas com antígeno de *Leishmania* em crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto representa um indivíduo. As barras horizontais indicam a mediana. .... 66
- Figura 11 Concentrações plasmáticas de IL-12p40 em crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto representa um indivíduo. As barras horizontais indicam a média..... 67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aspectos demográficos e epidemiológicos dos pacientes com leishmaniose visceral. São Luis-MA, 2002.....	48
Tabela 2	Aspectos clínicos de crianças e adultos com leishmaniose visceral São Luís-MA, 2002.....	51
Tabela 3	Dados hematológicos e bioquímicos de crianças e adultos com leishmaniose visceral, antes do tratamento (dia zero) e no término do tratamento (30 dias). São Luís-Maranhão, 2002.....	52
Tabela 4	Diferenças entre os percentuais de variação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de crianças e adultos com leishmaniose visceral. São Luís-Maranhão, 2002.....	53
Tabela 5	Concentrações de citocinas (CMSP e plasma) em crianças e adultos com leishmaniose visceral nos seguintes tempos: zero dia, 30 dias, 120 dias e 210 dias após o tratamento. São Luís-Maranhão, 2002.....	63

## RESUMO

MARCADORES CLÍNICO-LABORATORIAIS E IMUNOLÓGICOS DA RESPOSTA TERAPÊUTICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA EM CRIANÇAS E ADULTOS. **ARLENE DE JESUS MENDES CALDAS.** Realizou-se estudo prospectivo com 23 pacientes, sendo 14 crianças e 9 adultos com leishmaniose visceral (LV), em São Luís-MA no período de julho de 2000 a agosto de 2002, com o objetivo de avaliar os aspectos clínico-laboratoriais e marcadores precoces de eficácia terapêutica na LV, em crianças e adultos, antes e após o tratamento. Utilizou-se uma ficha-protocolo para coleta dos dados clínico-laboratoriais. Realizou-se avaliação imunológica através do teste de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) das concentrações de imunoglobulinas (IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgE), citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) em sobrenadantes de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) estimulados com antígeno de *Leishmania* e citocinas plasmáticas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12p40) no dia zero, no término do tratamento (30 dias) e após o tratamento (120 e 210 dias), bem como realização da intradermorreação de Montenegro (IDRM) e blastogênese com antígeno de *Leishmania*. A duração da doença, linfadenopatia e sangramento foram estatisticamente significantes no grupo de adultos, hepatomegalia e palidez cutâneo-mucosa, significantes no grupo de crianças. Observou-se diferença significativa entre os dois grupos no percentual de variação (valor final menos valor inicial, dividido pelo valor inicial) dos segmentados, linfócitos e velocidade de hemossedimentação, bem como as concentrações de IgG, IgG1, IgG3 e IgG4. A queda de IgG e IgG1 foram mais acentuadas aos 120 dias, mas permaneceram detectáveis nos tempos avaliados. O aumento das concentrações de IgG parece ser devido a ativação policlonal de células B e a diferença entre os dois grupos, seja porque as concentrações séricas de IgG variam com a idade. A maioria dos pacientes (91%) apresentou concentrações detectáveis de IgE antes do tratamento, mantendo-se inalterados nos tempos avaliados. Observou-se resposta linfoproliferativa em 14% dos indivíduos no término da terapêutica, e em 48% aos 120 dias após o tratamento. Setenta e sete por cento dos pacientes converteram a IDRM após seis meses de tratamento. A explicação para este achado seria a população de células participantes da IDRM diferente da envolvida na blastogênese. Detectou-se, na maioria dos indivíduos, elevadas concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  (90%), IL-10 (90%) e IL-12p40 (86%) no dia zero, com queda acentuada de IFN- $\gamma$  (43%) ao término do tratamento. Por outro lado, em sobrenadante de CMSP as concentrações de IL-10 encontravam-se elevadas e as de IFN- $\gamma$  não detectáveis, no dia zero. Em seguida, as concentrações de IL-10 declinavam e as de IFN- $\gamma$  aumentavam, à medida que avançava o tratamento. O TNF- $\alpha$  foi detectado somente em cultura de CMSP após o tratamento. Em consequência de uma resposta terapêutica favorável foi observada redução precoce da produção de citocinas plasmáticas tanto inflamatórias como supressoras. A depressão da resposta imune celular presente nos pacientes de LV pode ser devida à predominância da atividade biológica de IL-10 e não à ausência de INF- $\gamma$ . As concentrações plasmáticas de citocina do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) no dia zero e diminuição no término do tratamento, podem constituir-se num parâmetro de resposta à terapêutica na leishmaniose visceral humana.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral humana. Imunoglobulinas. Imunidade celular.

## ABSTRACT

CLINICAL-LABORATORY AND IMMUNOLOGY MARKERS OF RESPONSE THERAPEUTIC IN HUMAN VISCERAL LEISHMANIASIS IN CHILDREN AND ADULTS. **ARLENE DE JESUS MENDES CALDAS**. A prospective study was conducted on 23 patients with visceral leishmaniasis (VL), including 14 children and 9 adults, in São Luís, Maranhão, during the period from July 2000 to August 2002, in order to determine clinical and laboratory aspects and early markers of therapeutic efficacy in children and adults with VL before and after treatment. A protocol chart was used for collection of the following data clinical-laboratory. For immunological assessment, immunoglobulins (IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and IgE), plasma cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-12p40) and *Leishmania* in antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on days zero, 30 (end of treatment), 120 and 210 (after treatment). In addition, the Montenegro skin test (MST) and blastogenesis with anti-*Leishmania* antigen were also performed. Disease duration, adenomegaly and bleeding were significant in the adult group, while hepatomegaly and mucocutaneous paleness were significant in the children group. A significant difference between the two groups was found in the percent variation (final values minus initial value divided by initial value) of segmented leukocytes, lymphocytes and erythrocyte sedimentation rate, as well as in the levels of IgG, IgG1, IgG3 and IgG4. In IgG and IgG1 decreasing was more evident at 120 days, but both remained detectable at the other time points analyzed. The increase in IgG levels seems to be the result of polyclonal B cell activation and the difference observed between the two groups can be due to the fact that seric IgG concentrations change with age. Most patients (91%) had detectable IgE levels before treatment, which remained unchanged at the time points studied. A lymphoproliferative response was observed in 41% of patients at the end of treatment, and 48% in day 120 after treatment. The conversion of MST was observed in 77% of patients after 6 months of treatment, what could be explained by differences between the cellular population involved in MST and blastogenesis. In the most of patients was detected great plasmic levels of IFN- $\gamma$  (90%), IL-10 (90%) and IL-12p40 (86%) in the day zero, with a significant decreasing of IFN- $\gamma$  (43%) in the end of treatment. On the other hand, PBMC levels of IL-10 were high on day zero, while IFN- $\gamma$  was undetectable. Subsequently, IL-10 levels declined and IFN- $\gamma$  increased with advanced treatment. TNF- $\alpha$  was only detected in PBMC cultures after treatment. The results indicate that a favorable therapeutic response leads to an early reduction in the production of both inflammatory and suppressive cytokines in plasma. The cellular immune depression observed in patients with VL might be due to a predominance of the biological activity of IL-10 and not to the lack of IFN- $\gamma$ . The high plasma levels of both Th1 type (IFN- $\gamma$ , IL-12p40) and Th2 type (IL-10) cytokines on day zero and their decreasing at the end of treatment may represent good parameter to indicate the therapeutical efficacy in human VL.

Key words: Human visceral leishmaniasis. Immunoglobulin. Cellular immunity.

# Introdução

# 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e, clinicamente, podem se apresentar sob a forma visceral, cutânea, cutâneo-mucosa e mucosa. Constituem-se em importantes antropozoonoses amplamente distribuídas nos quatro continentes, predominando nas regiões tropicais e subtropicais, caracterizando-se como um grave problema de saúde pública em muitas regiões. Atualmente, encontra-se entre as seis doenças endêmicas de maior relevância no mundo (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1997; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existam cerca de 12 milhões de indivíduos infectados e que 360 milhões encontram-se sob o risco de adquirir infecção por parasitas do gênero *Leishmania*; um a dois milhões de novos casos ocorrem anualmente, sendo que 500 mil apresentam a forma visceral da doença (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1997; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000;)

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar já foi notificada em pelo menos 12 países da América Latina. O Brasil responde por mais de 90% dos casos do continente, sendo que 94% dos casos do país são originários da região Nordeste (BRASIL, 2003). A doença é descrita como própria de áreas montanhosas e de vales, de clima seco e precipitação pluviométrica anual inferior a 800mm. Entretanto, na década de oitenta, as transformações ambientais provocadas pelo processo migratório, com conseqüente aumento da concentração de moradias nas áreas peri-urbanas e esvaziamento rural, determinaram uma redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias e a nítida urbanização do calazar. Fato este exemplificado pela ocorrência dos surtos no Rio de Janeiro (RJ), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari

(BA) e mais recentemente Três Lagoas (MG), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (VIEIRA & COELHO, 1998; BRASIL, 2003).

No período de 1991 a 2001 foram registrados no Brasil cerca 31.897 casos de LV, sendo que 62% dos casos ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Ao analisar a evolução da LV no Brasil, observa-se a expansão geográfica no decorrer dos anos. Na década de 80 foram registrados casos em 17 unidades federadas e nos últimos anos da década de 90 foram registrados casos autóctones da doença nos estados de São Paulo, Mato Grosso e Tocantins, totalizando 19 unidades federadas com registro de casos autóctones da doença. No Brasil, aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, contribuem para a ampla distribuição da doença, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2003).

No Maranhão, os primeiros relatos da LV datam de 1934. Posteriormente, FIQUENE (1964) e BRANDÃO (1974), confirmaram a presença da doença por meio do acompanhamento de pacientes procedentes do interior do Estado e de áreas peri-urbanas da Ilha de São Luís. Desde então os números vêm aumentando a cada ano. Em 1982, teve início um surto epidêmico que se manteve até 1986, com aproximadamente 1.124 casos. O pico da epidemia, no entanto, ocorreu em 1984, atingindo principalmente crianças menores de cinco anos procedentes da meso e micro região de São Luís - área litorânea ao norte do Maranhão (COSTA *et al.*, 1995; NASCIMENTO *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1997).

Durante a epidemia, algumas medidas de controle foram aplicadas nas áreas de risco, contribuindo para a diminuição dos casos durante os dois anos subseqüentes. Entretanto, em 1988, houve ascensão da doença no Estado, sendo registrados 1.796 casos até junho de 1993, com maior expansão nos municípios da Ilha de São Luís (São Luís, São José de



Ribamar e Paço do Lumiar), principalmente nas áreas peri-urbanas (COSTA *et al.*, 1995; NASCIMENTO *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1997).

SILVA *et al.* (1997) relataram que a implantação da doença no estado do Maranhão talvez tenha ocorrido devido a vários fatores, tais como, as condições climáticas e o alto índice pluviométrico; e melhora da economia do Estado na época, com a implantação de grandes projetos industriais que ocasionou a migração de grupos populacionais vindos de outras regiões em busca de emprego, os quais se estabeleceram em áreas peri-urbanas, vivendo em condições inadequadas de moradia, saneamento básico e higiene.

Atualmente, a doença apresenta quadro epidemiológico inquietante, pois, além do padrão de peri-urbanização atingindo principalmente os municípios localizados na Ilha de São Luís (São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa), a doença tem se expandido a outros municípios do estado do Maranhão. Fato este demonstrado por notificação de casos em 50,2% (109 municípios) dos 217 municípios existentes, o que torna problemático o controle da doença no Estado.

A LV é causada por protozoários da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* e são conhecidas três espécies como agentes etiológicos da doença: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *L.(L.) infantum* e *L.(L.) chagasi* (SHAW, 1994). Existem algumas diferenças entre as formas da doença determinadas pelas espécies de *Leishmania*. A *L. infantum* (Mediterrâneo) e *L. chagasi* (América do Sul e Central) acometem mais crianças, havendo uma predominância do sexo masculino, enquanto a *L. donovani* (Ásia, Oriente, África Central e Oriental) acomete mais adulto (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; BRASIL, 2003).

A transmissão habitual ocorre, pela picada de flebotomíneos, de várias espécies, pertencentes a dois gêneros (*Phlebotomus* e *Lutzomyia*), com diferentes

comportamentos e distribuição geográfica. Os flebotomíneos são insetos pequenos (1,5 a 2,5 mm) com pêlos de coloração marrom ou preta. Podem ser identificados pela maneira como mantêm suas asas verticalmente sobre o tórax. Contudo, só as fêmeas alimentam-se de sangue dos mamíferos e, conseqüentemente, transmitem a *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado (LAINSON *et al.*, 1986). A transmissão congênita por *Leishmania* tem sido descrita em vários continentes, porém ainda há dúvidas se realmente é possível a contaminação transplacentária (ISAM *et al.*, 1992; MORAES *et al.*, 1995).

As leishmanias são parasitas dimórficos. Ao picar os reservatórios infectados, as fêmeas dos flebotomíneos adquirem as formas amastigotas do protozoário. No intestino dos insetos, essas formas amastigotas transformam-se em promastigotas, e se dividem ativamente. No novo repasto, ocorre deposição de formas promastigotas infectantes juntamente com a saliva do flebotomíneo, no interior da derme do hospedeiro. As promastigotas constituem as formas infectantes do parasita que invadem as células do sistema fagocítico mononuclear, transformando-se em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo e se multiplicam até o rompimento dos mesmos, com a invasão de novos macrófagos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; BRASIL, 2003).

O *Lutzomyia longipalpis*, o mais importante vetor da LV no Brasil, encontra-se bem adaptado ao domicílio e peri-domicílio, tanto no meio rural como nas áreas peri-urbanas. No ciclo epidemiológico da LV, o vetor representa o elo entre os reservatórios e o homem, que se comporta apenas como hospedeiro acidental da *Leishmania chagasi*, não parecendo assumir papel relevante na transmissão da doença no continente americano (COSTA *et al.*, 1990; REBÊLO *et al.*, 1996; BRASIL, 2003).

As raposas (*Pseudolopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) têm sido identificados como reservatórios silvestres apresentando um

papel de destaque tanto em áreas rurais como peri-urbanas, principalmente em decorrência das migrações e instalações não planejadas, assim como da construção de galinheiros que atraem esses animais para as proximidades dos domicílios em busca de alimentação. O cão (*Canis familiaris*) é considerado a principal fonte de infecção, caracterizado como reservatório doméstico da *L. chagasi*. A sua participação é importante na urbanização da LV, pois além de conviver próximo ao homem contribui na dispersão da doença durante os processos migratórios (COSTA *et al.*, 1990; SHERLOCK & MIRANDA, 1992; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; REBÊLO *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1997; BRASIL, 2003).

## 1.1 Aspectos imunológicos

O principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra *Leishmania* é a imunidade celular. As formas promastigotas desencadeiam, inicialmente, no local da inoculação uma resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam fatores séricos (anticorpos e sistema complemento) e celulares como células *natural killer* (NK), polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e macrófagos. Portanto, as formas promastigotas inoculadas que ainda estiverem no ambiente extracelular poderão ser destruídas e as fagocitadas formarão um vacúolo parasitóforo que sofrerá fusão com o lisossomo da célula, resultando em maior acidez no microambiente, e desta forma contribuindo para transformação da forma promastigota em amastigota, e conseqüentemente facilitando sua sobrevivência (ALEXANDER & RUSSEL, 1985; LAURENTI, 1993; GREEN *et al.*, 1994; MURRAY & NATHAN, 1999).

Para dar início à resposta imune específica, células de Langerhans transportam parasitos e antígenos aos linfonodos regionais, sensibilizando as células T, as quais proliferam

e ao liberarem linfocinas, regulam o potencial microbicida dos macrófagos. Entre os mecanismos efetivos de defesa contra *Leishmania* pode-se citar a ativação de macrófagos pelo interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$ , com conseqüente destruição de parasitas, e a citotoxicidade mediada por células NK ou células T citotóxicas (MOLL *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 1994).

O desenvolvimento da imunidade mediada por células é fundamental no controle da infecção leishmaniótica. Os modelos experimentais têm ajudado na compreensão da imunorregulação da LV ao longo dos últimos anos. MURRAY (1982) demonstrou que o parasitismo na LV está relacionado com a produção de um determinado perfil de citocinas pela célula hospedeira. Nestes modelos há associação entre controle ou resistência à doença com resposta imune do tipo 1 (Th1), com produção de interleucina 2 (IL-2) e IFN- $\gamma$ . A susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, por sua vez, se relaciona à resposta tipo 2 (Th2), com produção elevada de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) (BLOOM *et al.* 1990; PIRMEZ *et al.*, 1993).

Distintos padrões de produção de citocinas por células T CD4<sup>+</sup> caracterizando os subtipos Th1 e Th2 descritos em modelos experimentais, também, têm sido descritos em seres humanos (HOLADAY *et al.*, 1993; CENINI *et al.*, 1993;). Entretanto, outros estudos em LV humana com células T CD4<sup>+</sup> têm demonstrado a existência de um padrão Th0, no qual a dicotomia quanto à produção de citocinas não é tão evidente (SKEIKY *et al.*, 1995).

Na infecção humana por *L. chagasi* a resposta do tipo Th1 foi documentada em crianças infectadas capazes 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 (CARVALHO *et al.*, 1992).

O IFN- $\gamma$  tem importante papel na defesa contra a *Leishmania*, induzindo a atividade leishmanicida dos macrófagos, aumentando a produção de metabólitos de oxigênio e nitrogênio, ativando as células NK, e também as células T citolíticas, induzindo a expressão de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, e a secreção de TNF- $\alpha$ . As células T CD4<sup>+</sup> e as células NK estimuladas por interleucina 12 (IL-12) produzem IFN- $\gamma$ , cuja presença, na infecção, juntamente com a IL-12, são importante na diferenciação de células Th1, embora alguns estudos experimentais demonstrem que não necessariamente a produção inicial de IFN- $\gamma$  implique nessa diferenciação (REINER *et al.*, 1994; MORRIS *et al.*, 1994).

As células T CD4<sup>+</sup> do subtipo Th1, além de IL-2 e IFN- $\gamma$ , produzem fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interleucina 3 (IL-3) e fator de necrose tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ), que são responsáveis pela imunidade mediada por células, estimulando também em camundongos a produção de imunoglobulinas G2a (IgG2a) que ativam o complemento e opsonizam os antígenos para fagocitose (MOSMANN & COFFMAN, 1987).

De modo análogo ao modelo murino, a infecção humana por *L.chagasi* apresenta-se sob várias formas clínicas, provavelmente na dependência da eficácia com que a imunidade celular do indivíduo age sobre o parasita no interior dos macrófagos. Estes, além das funções de processamento e apresentação do antígeno e citotoxicidade, secretam citocinas com diversas ações biológicas, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 (SALOMÃO *et al.*, 1996)

O TNF- $\alpha$ , citocina produzida por macrófagos ativados, linfócitos T e células NK, também está associado com a LV doença, quando em níveis elevados, tendo sido descrita sua contribuição no quadro consumptivo de doenças infecciosas devido à ativação e produção de óxido nítrico em excesso, além de ser responsável por sinais e sintomas como febre,

anorexia, perda de peso, aumento do gasto energético, palidez cutâneo-mucosa e ativação policlonal de células B (BARRAL-NETTO *et al.*, 1991a; SALOMÃO *et al.*, 1996).

O fator  $\beta$  de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ) inibe a atividade leishmanicida dos macrófagos, estando associada à desativação dos macrófagos, inibição da ação do IFN- $\gamma$  e redução da expressão de moléculas MHC classe II. A IL-10 é outra citocina relacionada à inibição da resposta Th1, favorecendo a predominância do padrão Th2, levando a sobrevivência da *Leishmania* no interior de macrófagos, inibindo a síntese de citocinas produzidas por macrófagos como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e TNF- $\alpha$  (CARVALHO *et al.*, 1995). Ao contrário da IL-10 murina, a IL-10 humana parece agir deprimindo ambas as respostas Th1 e Th2, atuando de modo mais abrangente na depressão da resposta imune celular induzida por antígenos (De PRETE *et al.*, 1993).

A IL-12 é uma citocina produzida por células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B). Exerce funções biológicas múltiplas sobre as células T e NK, estimulando a produção de citocinas, principalmente, INF- $\gamma$ , induzindo a proliferação celular e citotoxicidade, tendo um papel importante na diferenciação e expansão de células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 (TRINCHIERI, 1996). A IL-12 ativa existe como um heterodímero de duas subunidades: uma de 35kD (p35) e outra de 40 kD (p40), ligadas por pontes de dissulfeto. Essas subunidades contêm regiões de homologia compartilhada mutuamente, porém com características estruturais peculiares. A síntese de IL-12p40 parece restringir-se, em grande parte, aos fagócitos mononucleares e às células dendríticas ativadas, enquanto a IL-12p35 muitas células parecem sintetizá-la. A IL-12p40 aumenta a resposta proliferativa e produção de IFN- $\gamma$  em pacientes com LV (BACELLAR *et al.*, 1996).

As células NK têm importante papel no início da infecção por *Leishmania*, respondendo rapidamente ao estímulo e não necessitando de sensibilização prévia

(SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1995). Essas células produzem citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , capazes, por sua vez, de inibir o crescimento do parasita no início da infecção, influenciando também na diferenciação de células T CD4+ para Th1 (TRINCHIERI, 1996). Estudos experimentais demonstram que a presença de células NK durante a imunização em camundongos BALB/c com antígeno de *L.major* e IL-12 aumentou significativamente o desenvolvimento de células Th1, já que a própria IL-12 apresenta também a capacidade de estimular a produção de IFN- $\gamma$  por essas células (AFONSO *et al.*, 1994).

Elevação simultânea de RNAm para citocinas do perfil tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) e tipo Th2 (IL-10) foi detectada em pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) (SKEIKY *et al.*, 1995) e visceral (GHALIB *et al.*, 1993; KARP *et al.*, 1993), demonstrando que a dicotomia entre os dois perfis de produção de citocinas pelos linfócitos humanos pode não ser tão evidente quanto no modelo murino. Fato este, também, demonstrado por MEDEIROS *et al.* (1998) no plasma de pacientes com calazar, onde foram encontradas concentrações elevadas tanto de IFN- $\gamma$  com de IL-10 antes do tratamento, e com a instituição da terapêutica, as concentrações circulantes de IL-10 declinaram exponencialmente e, IFN- $\gamma$  não foi mais detectado após 7 a 14 dias de terapêutica.

A depressão da resposta imunológica mediada por células é marcante na LV, pois os indivíduos não respondem aos testes de hipersensibilidade tardia com antígenos de *Leishmania* (MANSON-BAHR, 1961; BADARÓ *et al.*, 1985) durante a fase ativa da doença. Além disso, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) destes pacientes quando estimuladas *in vitro* com antígenos de *Leishmania*, apresentam resposta proliferativa significativamente inferior àquelas obtidas de indivíduos de grupo controle ou curados de calazar (CARVALHO *et al.*, 1981; HOLADAY *et al.*, 1993a). Entretanto, linfócitos de pacientes com doença ativa são incapazes de produzir IFN- $\gamma$  e IL-2 (CARVALHO *et al.*, 1985)

e, quando estimulados com antígenos de *Leishmania* não são capazes de ativar os mecanismos de destruição do parasita pelos macrófagos (BOGDAN *et al.*, 1990; CARVALHO *et al.*, 1994), mas os fatores séricos presentes na doença ativa são capazes de suprimir a resposta proliferativa (BARRAL *et al.*, 1986).

Portanto, a incapacidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imunológica eficaz à infecção por *Leishmania* está relacionada a diversos aspectos da imunidade celular, tais como: diferenciação dos linfócitos, apresentação dos antígenos, produção de citocinas e ativação dos mecanismos de lise dos macrófagos (CARVALHO *et al.*, 1981; KARP *et al.*, 1993; GHALIB *et al.*, 1993). A reversibilidade desta imunossupressão após a terapêutica específica sugere uma participação importante do próprio parasita (CARVALHO *et al.*, 1981). A quantidade de citocina disponível precocemente no local da infecção influenciará no padrão de secreção das mesmas e, conseqüentemente, no controle ou não da infecção.

O entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação de citocinas perfil tipo Th1 e Th2 e de seus efeitos sobre as células do sistema fagocítico mononuclear em pacientes com LV pode contribuir para uma melhor compreensão dos fenômenos imunobiológicos que ocorrem na doença.

Em decorrência da ativação de células B, a LV está associada não só a uma resposta de célula T ineficaz, o que pode ser comprovado por testes cutâneos de intradermorreação de Montenegro (IDRM) negativos e ensaios de linfoproliferação ineficientes, mas também à considerável indução da resposta humoral, com elevados títulos de imunoglobulinas inespecíficas (IgM e IgG) ou específicas para *Leishmania*. A presença desses anticorpos, no entanto, apresenta papel pouco relevante no controle da infecção, podendo, inclusive, participar na expansão da infecção opsonizando as amastigotas e facilitando a



fagocitose e infecção de novos macrófagos. Sua participação fica restrita, portanto, à interação inicial do parasito com elementos inespecíficos da resposta inflamatória (LIEW & O'DONNELL, 1993; ANAM *et al.*, 1999).

A IgG humana consiste de quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que diferem entre si nas estruturas e atividades biológicas. Em modelos experimentais, tem-se observado que o IFN- $\gamma$  induz a produção de IgG2a e IgG3 (FINKELMAN *et al.*, 1988; SNAPPER *et al.*, 1992), enquanto IL-4 estimula a produção de IgG1 e IgE (FINKELMAN *et al.*, 1986).

Existem vários estudos avaliando o efeito das citocinas sobre células humanas em diferentes doenças ou a diferentes antígenos. Assim, IL-4 e IL-13 relaciona-se com elevada produção de IgG4 e IgE; IL-10 com elevada produção de IgG1 e IgG3; INF- $\gamma$  com elevada produção de IgG2; TGF- $\beta$  com elevada produção de IgGA (KAWANO *et al.*, 1994). Em pacientes com infecções helmínticas IL-4 induz expansão de IgG4 e o INF- $\gamma$  exerce regulação negativa de todos os isotipos (KING & NUTMAN, 1993).

Na LV foram encontradas concentrações elevadas de IgG1 nos soros de pacientes na fase aguda da doença, porém não houve diferença nas concentrações de IgG3 e IgG4 (SHIDDO *et al.*, 1996). Entretanto, na LTA níveis significantes de IgG1, IgG2 e IgG3 foram detectados no soro de pacientes com forma cutânea localizada e as concentrações de IgG4 foram quase indetectáveis. Na forma mucosa predominou a subclasse IgG1 e na forma difusa a subclasse IgG4, porém nesta última, também, as concentrações de IgG1 e IgG2 foram elevadas (RODRIGUEZ *et al.*, 1996).

## 1.2 Aspectos clínico-laboratoriais e tratamento

As alterações no organismo a partir da presença do parasita dependem da virulência da *Leishmania* e da imunidade inata ou adquirida desenvolvida pelo hospedeiro. Em decorrência dessa interação, parasita-hospedeiro, o espectro clínico é variável, evoluindo desde formas assintomáticas a manifestações clínicas discretas (oligossintomáticas), moderadas e graves (RODRIGUES DA SILVA, 1957; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1997; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; BRASIL, 2003).

A forma assintomática é caracterizada pela ausência de manifestações clínicas. É identificada por meio de inquérito epidemiológico utilizando-se testes sorológicos anti-*Leishmania* ou IDRM. Em inquéritos sorológicos realizados em áreas endêmicas de LV, têm-se encontrado incidência de infecção variando de 4,6% a 28% (EVANS *et al.*, 1992; CALDAS *et al.*, 2001). Entretanto, a forma oligossintomática caracteriza-se pela presença de sinais e sintomas inespecíficos, discretos, de evolução prolongada, como mal estar, perda de peso, febrícula, tosse seca, diarreia, hepatomegalia discreta e, eventualmente, esplenomegalia. As alterações laboratoriais são discretas, sendo as vezes confundidas com infecções bacterianas ou virais (BADARÓ *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1992; GAMA, 2001).

A doença clinicamente manifestada compreende o período inicial, período de estado e o período final. Estes períodos diferem entre si, basicamente, pelo tempo de evolução. Caracterizam-se por febre intermitente, progressivamente aparecem anorexia, fraqueza e emagrecimento, tosse, diarreia, perda de peso, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Em caso de longa duração, a doença evolui para o período final com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral, surgindo sinais de

desnutrição, como cabelos secos e quebradiços, cílios longos e pele seca, bem como icterícia, que é um sinal de mau prognóstico. Os exames complementares evidenciam anemia, trombocitopenia, leucopenia com predominância acentuada de células linfomonocitárias e inversão da relação albumina versus globulina, observa-se também alterações bioquímicas com elevação das concentrações das aminotransferases e bilirrubinas, e aumento discreto das concentrações de uréia e creatinina (PRATA, 1957; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1997; BRASIL, 2003).

As manifestações clínicas da LV em crianças e adultos apresentam pequenas diferenças (RODRIGUES DA SILVA, 1957; ZIJLSTRA *et al.*, 1992; HOHENSCHILD & FELDMEIER, 1995). Na criança, a instalação da doença é mais insidiosa, bem como a ocorrência de fenômenos prodrômicos como palidez, anorexia, modificações do humor, sensação de fraqueza é mais freqüente. Por outro lado, nos adultos a anemia é menos proeminente e de progressão mais lenta, há maior freqüência de manifestações hemorrágicas.

Estudos realizados na Bahia em área endêmica de LV, estimaram que 7,5% dos indivíduos menores de 15 anos estão infectados por *Leishmania*. Os casos têm sido detectados na relação doença/infecção, numa proporção de 1:18,5 na Bahia, 1:11 no Ceará, 1:28 no Maranhão, e 1:260 no Piauí (BADARÓ *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1992; CALDAS *et al.*, 2001; WERNECK *et al.*, 2002).

O período de incubação da doença dificilmente consegue ser determinado, tendo em vista a impossibilidade de se precisar a data da inoculação da *Leishmania*, podendo variar de limites curtos (dez dias) a limites longos (três anos), porém a maioria dos casos varia de dois a quatro meses (RODRIGUES DA SILVA, 1957; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; BRASIL, 2003).

No Brasil, a doença acomete principalmente crianças com idade de zero a nove anos, sendo que 75% dos casos ocorrem em menores de cinco anos. A maior suscetibilidade nesta faixa etária pode ser devido à imaturidade do sistema imune associada a um determinado grau de desnutrição, comum entre as crianças de áreas endêmicas de LV. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem importância significativa na epidemiologia da LV, pelas formas assintomáticas frequentes e também pelos casos de doença neste grupo (BADARÓ *et al.*, 1986; GRIMALDI JUNIOR, 1989; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; BRASIL, 2003).

A importância do estado nutricional na evolução da infecção pela *Leishmania* tem sido demonstrada através de vários estudos. CERF *et al.* (1987) sugerem que, em geral, a desnutrição pode ser responsável direta ou indiretamente pela disfunção imunológica, desempenhando papel importante na progressão para as formas graves de LV. BADARÓ (1988), por sua vez, relatou que crianças com dois anos de idade nos focos de maior incidência da doença, apresentam probabilidade de 10% de serem infectadas por *Leishmania*, uma vez infectadas, a probabilidade de desenvolverem a doença será de 25%, subindo para 50% se as mesmas forem desnutridas. No entanto, EVANS *et al.* (1992) observaram que as crianças de área endêmica já apresentam certo grau de desnutrição crônica, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos com diferentes evoluções. Resultado similar foi obtido por CALDAS *et al.* (2002), no Maranhão, que também não encontraram associação entre infecção por *L. chagasi* e desnutrição aguda ou crônica.

A desnutrição acentuada, acompanhada de hipoalbuminemia intensa com quadros de edema generalizado, e as infecções secundárias (broncopneumonias ou pneumonites virais) são complicações frequentes nos pacientes com LV, sendo responsáveis

por sua evolução fatal, juntamente com os quadros hemorrágicos (ANDRADE *et al.*, 1990; GARCÊS *et al.*, 1990).

A LV pode se comportar como infecção oportunista, pois a doença tem sido documentada em indivíduos portadores de imunodeficiência como a Aids. A maioria dos relatos é em indivíduos adultos que muitas vezes estavam afastados da zona endêmica há um certo período de tempo. Nesses casos, pode haver manifestações clínicas não usuais, como ausência de esplenomegalia e refratariedade ao tratamento com antimonial pentavalente (BRASIL, 2003).

Em estudos histopatológicos foi constatado um processo inflamatório intersticial que atinge, dentre outros órgãos, o pulmão, causando a pneumonite intersticial atribuída à LV que se caracteriza por tosse seca, persistente, que surge no início da doença, permanece inalterada durante o período de estado e desaparece com o término da terapia anti-*Leishmania*. A persistência de material antigênico nos septos alveolares talvez seja responsável pela manutenção do processo inflamatório local, da mesma forma que a preferência de inflamação nos pulmões em relação a outros órgãos poderá ser explicada pelas alterações na dinâmica respiratória em virtude da pneumonia intersticial leishmaniótica (ANDRADE, 1959; GUERREIRO *et al.*, 1985; DUARTE *et al.*, 1989).

O comprometimento inflamatório do interstício renal que é semelhante ao dos pulmões, ocorre devido à persistência de material antigênico relacionado a *Leishmania* em macrófagos ou na matriz extracelular que poderá ser responsável pela manutenção do processo inflamatório local e pela reatividade dos elementos intersticiais. Clinicamente, os pacientes com LV não exibem sinais ou sintomas específicos de comprometimento renal, apresentando somente proteinúria discreta. A insuficiência renal aguda pode ocorrer quando

nefrite intersticial moderada ou intensa se associa com isquemia renal (DUARTE & CORBETT, 1994; SALGADO FILHO *et al*, 2003).

No trato gastrointestinal, detecta-se infiltração de macrófagos, com alterações na mucosa que levam aos episódios diarréicos. Quanto ao fígado e baço, observa-se hiperplasia e hipertrofia das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) com intenso parasitismo, explicando os graus variados de hepatoesplenomegalia. A forma e a consistência do fígado são preservadas, com bordas regulares e superfície lisa, e o baço, freqüentemente atinge a fossa ilíaca e apresenta consistência firme (DUARTE & CORBETT, 1994; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

O processo inflamatório intersticial observado nas mucosas do trato gastrointestinal e no fígado, além do comprometimento inflamatório do interstício renal resultante do depósito de material antigênico, influenciam na hipoalbuminemia freqüentemente encontradas nos pacientes com LV (MUGAI *et al.*, 1983; BENHANSSINE *et al.*, 1986). A adenomegalia é pouco expressiva na LVA. Os linfonodos encontram-se aumentados de volume e mostram proliferação e parasitismo de células do SFM. A proliferação folicular e a diferenciação de linfócitos em plasmócitos podem explicar a hipergamaglobulinemia na LV (DUARTE & CORBETT, 1994).

As principais alterações observadas nos exames complementares são leucopenia com linfocitose relativa, plaquetopenia e anemia, bem como hiperglobulinemia, geralmente por ativação policlonal inespecífica de linfócitos B, e hipoalbuminemia. A pancitopenia é de causa multifatorial. A anemia é devida ao bloqueio de produção na medula óssea, seqüestro esplênico e fenômenos de auto-imunidade. A trombocitopenia geralmente moderada é atribuída à diminuição de maturação medular e destruição periférica por mecanismos auto-imune. Embora esses exames não sejam específicos, quando associados à

epidemiologia e ao quadro clínico tornam-se importantes para auxiliar no diagnóstico da LV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; BRASIL, 2003).

O diagnóstico definitivo da LV deve ser feito por meio da demonstração do parasita por exame direto ou cultura em material coletado da medula óssea, fígado, baço e linfonodos. O aspirado esplênico é o método que oferece maior sensibilidade para demonstração do parasita, em seguida o aspirado de medula (CHULAY & BRYCESON, 1983; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990, 2000; BRASIL, 2003). Convém ressaltar que a presença do parasita nos exames parasitológicos é variável, por isso quando não for possível visualizar a presença de *Leishmania* deve-se estabelecer o diagnóstico presuntivo baseado nos achados clínicos e sorológicos. Os testes sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) são os mais comumente utilizados no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; BRASIL, 2003).

O teste de IDRM não é usado na prática clínica, pois geralmente apresenta resposta negativa devido à imunodeficiência celular observada nos pacientes durante a fase ativa da doença. Utiliza-se em inquéritos epidemiológicos para detecção de indivíduos infectados sem história prévia de doença ou para avaliar indivíduos já curados quanto à imunidade celular (BADARÓ *et al.*, 1986; WHITE JUNIOR *et al.*, 1992; BRASIL, 2003).

Há evidências de que o teste de IDRM pode sensibilizar o indivíduo e fazer com que o mesmo se torne positivo em uma segunda ou terceira aplicação do antígeno (NASCIMENTO *et al.*, 1993; JOSÉ *et al.*, 2001; BORGES *et al.*, 2003). Por outro lado, SATTI *et al.* (2002) demonstraram que sucessivas aplicações de antígeno não modularam *in vivo* ou *in vitro*, resposta imune para o antígeno de *Leishmania*. Entretanto, parece relevante a relação entre o antígeno de *Leishmania* e o intervalo de tempo da realização dos testes.

No tratamento da LV, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) e de segunda escolha, a anfotericina B. O antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime<sup>®</sup>) é o mais usado nas Américas (Central e Sul) e em algumas regiões da Europa, enquanto o Stibogluconato de sódio (Pentostan<sup>®</sup>) é mais usado no Velho Mundo. Parece não existir diferenças quanto à eficácia terapêutica destas formulações. No Brasil, a formulação disponível é o antimoniato-N-metil-glucamina (Glucantime<sup>®</sup>), e o esquema terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde, desde 1994, é de 20mg/ $Sb^{+5}$ /kg/dia por 20 a 40 dias. Em casos não tratados, a LV doença pode levar o paciente à morte, porém com o tratamento devido a ação leishmanicida da droga atinge índices de cura em torno de 95% a 98%. O mecanismo de ação da droga ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos (BERMAN, 1988; BRASIL, 2003).

No Brasil, não há informação precisa do número de pacientes não responsivos ao tratamento com antimoniais. Parecem raros os fracassos terapêuticos, o surgimento de recidiva e a comprovação de resistência medicamentosa, quando se utiliza a dose de antimônio preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Em termos de resistência parece não alcançar 5% dos doentes de leishmanioses no País (MARZOCHI *et al.*, 1985; SILVEIRA *et al.*, 1993). Na Índia, o percentual de não responsivos chega a 10% com o esquema preconizado pela OMS (20mg/ $Sb^{+5}$ /kg/dia, no mínimo 20 e máximo 40 dias), no Quênia, com 30 dias de tratamento chega a 20% (THAKUR *et al.*, 1988; CHUNGE *et al.*, 1990).

Os coeficientes gerais de mortalidade da LV no Brasil são relativamente baixos. Entretanto, na região Nordeste esses coeficientes são significativamente mais elevados que a média do País. Os coeficientes revelam um crescimento correspondente ao aumento da



endemia, variando de 0,04/100.000 habitantes em 1980 para 0,09/100.000 habitantes em 1990, com 124 óbitos registrados nesse último ano. Desde então, mesmo que a incidência tenha aumentado, as taxas de mortalidade se mantiveram nas faixas de 0,06-0,08/100.000 habitantes. Este fato sugere ter havido uma melhor atenção no atendimento dos casos, com diagnóstico mais ágil e tratamento mais oportuno e correto (VIEIRA & COELHO, 1998).

### **1.3 Marcadores de cura na leishmaniose visceral**

Sabe-se das dificuldades em estabelecer parâmetros de cura que sejam objetivos, reprodutíveis e confiáveis para a LV. Na experiência de MANSON-BAHR & HEICH (1956), não há critério infalível de cura, seja de ordem clínica, parasitológica ou sorológica, pois às vezes surgem recidivas após terapêutica adequada ou tratamentos aparentemente insatisfatórios serem seguidos de cura.

VERONESI (1954) e NEVES (1963), devido às dificuldades encontradas na avaliação de cura na LV estabeleceram alguns critérios, até hoje, recomendados pelo Ministério da Saúde (2003). A febre desaparece por volta da primeira semana de tratamento, redução do baço em torno de 40% no final do tratamento, normalização ou melhora dos parâmetros hematalógicos (hemoglobina e leucócitos), a relação albumina versus globulina tende à normalização, e ocorre aumento progressivo de peso. O seguimento dos pacientes deve ser feito aos 3, 6 e 12 meses após o tratamento, e na última avaliação se o quadro permanecer estável, o paciente é considerado curado. O controle através de exame parasitológico (mielograma) não é recomendável. O aparecimento de eosinofilia ao final do tratamento ou ao longo dos seguimentos é sinal de bom prognóstico.

Segundo a ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (1997) um bom progresso clínico significa não recorrência de febre, aumento progressivo de peso e regressão da esplenomegalia. Além disso, os valores da hemoglobina e dos leucócitos totais deverão aumentar. A IDRМ deverá positivar em 80% dos pacientes até 12 meses após o tratamento. Quanto às concentrações de IgG, NEOOY *et al.* (1986) observaram que há uma diminuição progressiva das concentrações de anticorpos e que a maioria dos indivíduos apresentaram diminuição mais acentuada após cinco meses do término do tratamento. Segundo os autores, estes achados podem ser usados como marcador sorológico para determinar a cura do calazar. ATTA *et al.* (1998), relataram que as concentrações de IgE específica para *Leishmania* encontram-se elevados durante a doença ativa porém diminuem após o tratamento, podendo inclusive servir como parâmetro para o diagnóstico de doença bem como resposta evolutiva do tratamento.

Além dos parâmetros clínicos e sorológicos, recentemente, vários estudos têm tentado definir marcadores imunológicos de eficácia terapêutica que possam nortear a cura dos pacientes com calazar. BARRAL-NETTO *et al.* (1991a, 1991b) demonstraram que a redução nas concentrações séricas de TNF- $\alpha$  e na quantidade de receptor solúvel para IL-2 se constituem em bons marcadores de resposta ao tratamento. SCHRIEFER *et al.* (1995) sugerem que sIL-2R pode ser usado como marcador de resposta terapêutica. MEDEIROS *et al.* (1998) propuseram que a redução das concentrações de citocinas inflamatórias (INF- $\gamma$ ) e supressoras (IL-10) durante o tratamento, podem constituir-se como bons parâmetros de resposta terapêutica no seguimento dos pacientes com LV. Isto porque com a instituição da terapêutica e melhora clínica dos pacientes, os autores observaram que as concentrações circulantes de IL-10 declinavam exponencialmente e, o INF- $\gamma$  não era mais detectado após 14 dias de tratamento.

# Justificativa

## 2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos dez anos foram notificados 30.334 casos de LV no Brasil, sendo 25.304 registrados somente no Nordeste, representando assim, as áreas de maior concentração da doença. Nesta década, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes. A má qualidade de vida, problemas graves de ordem sócioeconômica, falta de saneamento básico, promiscuidade, movimentos populacionais em busca de melhores condições de vida e as transformações ocorridas no meio ambiente, contribuíram para a ocorrência de epidemias (MONTEIRO *et al.*, 1994; BRASIL, 2003).

A LV no estado do Maranhão passou a ser considerada como problema de saúde pública a partir de 1982, quando foram diagnosticados 32 casos na Ilha de São Luís. A doença vem se expandindo e se urbanizando ao longo dos anos (COSTA *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 1997). Nos últimos dez anos foram notificados 4.155 casos da doença no Maranhão, correspondendo a 16,5% dos casos registrados no País (BRASIL, 2003).

Enquanto o número de casos aumentava as ações de controle sofriam descontinuidade. Em 1998 quase todas as atividades de rotina foram paralisadas, pela falta de insumos (inseticidas) e recursos para a realização dos convênios e conseqüente repasse de recursos aos municípios. Devido a esses problemas nos anos subseqüentes, 1999 e 2000, nos deparamos com o maior número de registro em toda a história da endemia no Estado, 724 e 842 casos respectivamente, sendo que 42% dos casos notificados em 2000 eram da Ilha de São Luís, principalmente em crianças menores de cinco anos.

O foco de atenção tem sido direcionado para a importância do diagnóstico preciso e o mais precocemente possível, o tratamento adequado, os critérios de cura e acompanhamento dos pacientes com a finalidade de reduzir as taxas de letalidade e o grau de

morbidade. Embora se tenha uma vasta literatura relacionada com a clínica, avaliação laboratorial e imunologia da LV, alguns aspectos da relação parasita/hospedeiro os quais estão envolvidos na progressão da infecção para a doença ainda não estão bem esclarecidos. A LV é mais freqüente em crianças menores de 10 anos no continente americano, o que difere da Índia e do continente africano, nos quais a predominância é em adultos. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV no Brasil tanto pela alta prevalência de infecção assintomática como pelas formas com expressão clínica mais grave.

Em função da alta prevalência da doença em crianças, os estudos clínicos e imunológicos estão mais voltados a essa faixa etária. Por outro lado, existem poucos relatos sobre o seguimento clínico-laboratorial e imunológico de indivíduos com LV antes e após o tratamento comparando crianças e adultos, bem como marcadores de eficácia terapêutica.

Atualmente, os critérios de cura utilizados no Brasil são essencialmente clínicos e as dificuldades em obter parâmetros que sejam objetivos e reprodutíveis são enormes. Portanto, a possibilidade de poder associar parâmetros clínicos com parâmetros imunológicos é de suma importância para avaliação da resposta terapêutica e conseqüentemente repercutir num melhor controle da doença.

Em virtude do comportamento epidêmico da LV nos municípios da Ilha de São Luís e da necessidade de ampliar os conhecimentos clínico-laboratoriais e imunológicos da evolução da doença, faz-se necessária a realização do presente estudo com a finalidade de analisar os aspectos clínico-laboratoriais de crianças e adultos com LV e avaliar as concentrações de citocinas do perfil tipo Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12p40) e tipo Th2 (IL-10), além das imunoglobulinas IgG e IgE antes do tratamento, no término do tratamento e após o tratamento

específico, e conseqüentemente oferecer subsídios que possam nortear os critérios de cura e o seguimento evolutivo desses pacientes visando uma redução da morbimortalidade.

# Objetivos

## 3 OBJETIVOS

### Geral

Avaliar os aspectos clínico-laboratoriais e marcadores precoces de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral, em crianças e adultos.

### Específicos

Analisar comparativamente os aspectos clínicos e os parâmetros laboratoriais de crianças e adultos antes do tratamento, no término do tratamento e após o tratamento;

Analisar as concentrações de IgG e IgE, e subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) antes do tratamento, no término do tratamento e após o tratamento;

Avaliar a resposta linfoproliferativa e de hipersensibilidade tardia em crianças e adultos antes do tratamento, no término do tratamento e após o tratamento;

Determinar as concentrações plasmáticas e em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania* de citocinas do perfil tipo Th1 (IFN- $\gamma$  e IL 12p40) e tipo Th2 (IL-10) bem como TNF- $\alpha$  antes tratamento, no término do tratamento e após o tratamento.



# Material e Métodos

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se estudo prospectivo com 23 pacientes com LV, procedentes da Ilha de São Luís-MA. O estudo foi realizado no período de julho de 2000 a dezembro de 2002.

### 4.1 Descrição da área

#### 4.1.1 Características da Ilha de São Luís

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 (exceto a leste), elevando-se a uma altitude média de 4m acima do nível do mar onde está localizada 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.

A Ilha possui uma área territorial de 905 km<sup>2</sup>, compreendendo politicamente os municípios de São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa. Apresenta uma população de 941.431 habitantes, sendo 780.833 habitantes do município de São Luís, 89.794 de São José de Ribamar, 55.729 de Paço do Lumiar e 15.075 habitantes do município de Raposa (IBGE, 1998).

O relevo é constituído de sedimentos do Terciário, proveniente da erosão do “craton” de São Luís (Carbonífero e Permiano), com dunas e aluviões do Quaternário recobrando as formações mais antigas. Compreende ainda áreas baixas de planície fluvio-

marinhas, atingidas pela oscilação das marés, que durante a baixa mar deixa descoberta uma grande extensão de sedimentos argilo-arenosos (IBGE, 1998).

A vegetação é um misto da floresta latifoliada e o babaçal (*Orbignya phalerata* Martins), além da floresta paludosa marítima (os manguezais). Ultimamente, a ecologia da Ilha vem-se modificando em função da demanda imobiliária e derrubadas constantes da vegetação. Os remanescentes da vegetação original são representadas por coberturas florísticas secundárias e extensas áreas de capoeiras baixas com intrusões de babaçu, com manchas de cerrados e formações pioneiras (campo e restingas) e, margeando os rios, onde ainda há matas ciliares, predominando os buritizais (*Mauritia vinifera*) e juçarais (*Euterpe oleraceae*) (IBGE, 1998).

O clima é tropical quente e úmido, com duas estações bem definidas. A chuvosa, de janeiro a junho, onde 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, sendo os meses de setembro e outubro os mais secos, concentrando apenas 6% das chuvas anuais. O índice pluviométrico é elevado, em torno de 1.900mm anuais em média, a umidade relativa do ar é de  $\pm 77,0\%$ . A temperatura é elevada durante todos os meses do ano, sendo a mínima de 23,0 C° e a máxima de 33,3C°(média de 26°C) (IBGE, 1998).

## 4.2 População

A população foi constituída por 23 pacientes, sendo 14 crianças e 9 adultos, atendidos em unidades assistenciais vinculadas no Sistema Único de Saúde (SUS) no período de julho de 2000 a dezembro de 2001, e que preencheram os seguintes critérios de inclusão: residentes nos municípios da Ilha de São Luís (São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa), diagnóstico confirmado de LV através da identificação de formas

amastigotas de *Leishmania sp* no aspirado de medula óssea em esfregaços corados pelo método de Giemsa, não ter iniciado tratamento para LV, e concordar em participar do estudo; e, de exclusão, a não adesão ao seguimento regular, definido como comparecimento aos retornos agendados.

Para cada paciente foi preenchido uma ficha-protocolo padronizada (ANEXO I) constando dados de identificação, presença de animais no domicílio e vizinhança, queixas clínicas, exame físico, resultado de exames laboratoriais inespecíficos (hemograma, proteinograma, aminotransferase e glicemia) e exame parasitológico de fezes.

### **4.3 Avaliação clínico-laboratorial e imunológica**

Todos os pacientes tiveram acompanhamento clínico-evolutivo a cada dez dias durante o tratamento, mensal até três meses após o tratamento, e posteriormente, de três em três meses até completar 12 meses. A avaliação clínica constava da sintomatologia referida pelo paciente ou descrita pelo responsável e exame físico completo incluindo medição do baço e do fígado, e aferição do peso. Os exames laboratoriais (hemograma, proteinograma, aminotransferase, uréia, creatinina e glicemia) foram realizados antes do tratamento (dia zero) e no término do tratamento (30 dias).

A avaliação imunológica constou de pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* - imunoglobulinas (Ig) – IgG e subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM e IgE pela técnica *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), bem como da dosagem de citocinas em plasma (IFN- $\gamma$ , IL-12p40, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) e em sobrenadante de CMSP (IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ ), IDRMs e o teste de transformação linfoblástica, realizada antes do tratamento (dia zero),

término do tratamento (30 dias), e no seguimento (120 dias e 210 dias após o tratamento). Todos os pacientes foram submetidos ao teste anti-HIV para investigar possível co-infecção.

Os pacientes com anemia acentuada (hipocorado +++/4+ e ou hemoglobina menor ou igual a 5g/dl), fenômenos hemorrágicos, diarreia grave, estado geral e ou nutricional comprometidos, infecção ou doença associada foram tratados em hospitais da rede pública do SUS. O esquema terapêutico utilizado foi o antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime<sup>®</sup>), na dose de 20mg/Sb<sup>5+</sup>/kg/dia, por no mínimo 20 e máximo 30 dias, conforme padronização do Ministério da Saúde (Brasil, 2003).

#### 4.4 Descrição dos exames

Foram coletados 20ml de sangue periférico em tubos heparinizados antes do tratamento (dia zero), no término (30 dias) e após o tratamento (120 e 210 dias), e em seguida, encaminhados à temperatura aproximadamente de 4°C, em caixa térmica ao laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Salvador-BA, para realização do teste de transformação linfoblástica com antígeno de *Leishmania* e detecção de anticorpos específicos de *Leishmania* das classes IgG, IgM e IgE e subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) bem como para dosagem das concentrações de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-12p40, IL-10 e TNF- $\alpha$ ).

#### 4.4.1 Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

O antígeno solúvel de *Leishmania* foi preparado a partir uma cepa previamente caracterizada por anticorpos monoclonais e isoenzimas com *L. chagasi* (MHOMBr83BA-3). As formas promastigotas em cultura foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 e rompidas pelo choque térmico e sonicação, centrifugadas a 10.000g por 30 minutos e do sobrenadante obtido foi determinado o conteúdo protéico pelo método de LOWRY *et al.* (1951). A solução foi ajustada à concentração de 250µg/ml (REED *et al.* 1986).

Para realizar o IDRM foi administrado 0,1ml do antígeno (concentração de 250µg/ml em solução de PBS pH 7,2 com fenol a 0,4%) de antígeno de *Leishmania* a 3cm da dobra cubital no antebraço dos indivíduos, sendo a enduração mensurada após 48 horas. A leitura foi realizada pela técnica de SOKAL *et al.* (1975), e o teste considerado positivo quando a enduração foi igual ou maior a 5mm. Com a finalidade de avaliar, cronologicamente, o período de conversão da resposta do IDRM, realizou-se antes do tratamento, no término do tratamento, e a cada três meses após o tratamento até a conversão do teste.

#### 4.4.2 Teste de transformação linfoblástica (Linfoproliferação)

Células mononucleares do sangue periférico foram separadas através de centrifugação em gradiente de Ficoll. Em seguida foram lavadas e ressuspensas na concentração de  $10^6$ /ml, em meio RPMI suplementado com HEPES 25mM, L-glutamina 2mM, gentamicina 50µg/ml e soro AB humano 10%. A suspensão celular foi distribuída em placas de 96 poços e cultivada em triplicatas sem estímulo (controle negativo), com antígeno de *L. chagasi* (5µg/ml), ou com ConA (5µg/ml), a 37°C com 5%CO<sub>2</sub>. No quarto dia de

incubação foram adicionadas às culturas, 1 $\mu$ Ci de timidina tritiada ( $^3$ H timidina- Dupont-NEN Research products), incubadas por 16h e coletadas. A incorporação de timidina foi quantificada em contador beta. Os resultados foram expressos por meio de índices de estimulação (IE), o qual representa a razão entre o valor de captação de timidina em cpm da cultura estimulada pelo cpm da cultura não estimulada. Considerou-se como existência de resposta linfoproliferativa ao antígeno de *Leishmania* quando o índice de estimulação era maior do que 5 (BADARÓ *et al.*, 1985).

### 4.4.3 Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*

#### 4.4.3.1 ELISA para detectar IgG total anti-*Leishmania*

**Preparo do antígeno** - A cepa (MHOMBr83BA-3) de *L. chagasi* foi cultivada em meio LIT (infusão de fígado e triptose) com 10% de soro bovino fetal. Após atingirem a fase logaritmica, as leishmânias foram lavadas com PBS (pH 7.2) e centrifugadas (20.000g) a 4°C por dez minutos. Os parasitas lavados foram ajustados para a concentração de 5x10<sup>6</sup> 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 (100 $\mu$ g/ml) e, a sua concentração protéica verificada através do método de LOWRY *et al.* (1951).

**Reação** - As placas (microtitulação Limbro/Titertek – ICN BIOMEDICALS INC. Cat. Nº 76-381-4) foram sensibilizadas com antígeno de *L. chagasi* na concentração de 10 $\mu$ g/ml (100 $\mu$ l/poço), diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6 e incubadas durante a

noite a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS Tween a 0,05% e incubadas em soros diluídos 1:100 durante uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS/Tween - 0,05% foi adicionado o IgG anti-humano (cadeia gama específico) conjugada a fosfatase alcalina (Sigma Chemical Company) diluída em 1/1000. A placa foi incubada a 37°C durante 1 hora. Após 3 lavagens, adicionou-se o substrato (p-nitrofenilfosfato, Sigma), diluído em tampão carbonato-bicarbonato/ MgCl<sub>2</sub>, pH 9,6. Após 20 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com adição de NaOH a 3M (BADARÓ *et al.*, 1985). A leitura foi realizada em um espectrofotômetro multifocal para leitura de placas de microtitulação com filtro 405nm e o resultado expresso em densidade ótica (OD). A reação sorológica foi considerada positiva quando o nível de absorvância (cut-off) era igual ou superior a 0,056, representando a média mais dois desvios padrões das absorvâncias de 20 soros de indivíduos sadios não exposto a *Leishmania*.

#### 4.4.3.2 ELISA para detectar subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-*Leishmania*

As placas (microtitulação Limbro/Titertek – ICN BIOMEDICALS INC. Cat. N° 76-381-4) foram sensibilizadas com antígeno de *L. chagasi* na concentração de 10µg/ml, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6 e incubadas por 2 horas a 37°C. Em seguida as placas foram transferidas para a geladeira e incubadas durante a noite (4°C). As placas foram lavadas e os sítios livres bloqueados com PBS + BSA 1% a 37°C por duas horas. As amostras (plasma diluído 1:40) foram colocadas e incubadas a 4°C durante a noite. Os anticorpos específicos para as subclasses IgG1 (HP6069), IgG2 (HP6002) e IgG3 (HP6047) foram



acrescentadas na diluição de 1:1000 e IgG4 (HP6023) na diluição de 1:500. Estes anticorpos foram obtidos do Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA). As placas foram incubadas a 4°C durante a noite. A anti-IgG de camundongo conjugada à fosfatase alcalina (SIGMA) foi acrescentada na diluição de 1:1000 por 45 minutos a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-T 0,05%, foi feita a revelação com P-nitrofenilfosfato e interrompida com NaOH 3M (HUSSAIN *et al.*, 1994; SHIDDO *et al.*, 1996). A leitura foi realizada em um espectrofotômetro com filtro 405nm e o resultado expresso em densidade ótica (OD). O cut-off para IgG1 foi considerado igual ou superior a 0,044; para IgG2  $\geq$  0,023; para IgG3  $\geq$  0,012 e IgG4  $\geq$  0,013, representando a média mais dois desvios padrões das absorvâncias de 20 soros de indivíduos sadios não expostos a *Leishmania*.

#### 4.4.3.3 Detecção de IgE

**Preparo do RF-** Para realizar a dosagem do isotipo IgE foi necessário depletar IgG para evitar a competição do mesmo sitio antigênico. Na depletação de IgG usou-se um produto contendo fator reumatóide (RF-Absorbent, Dade Behring) que se liga a IgG deixando livre o isotipo IgE. O RF liofilizado foi ressuspenso em 1,5 ml de água destilada estéril e dividido em alíquotas para armazenamento (-20°C). As amostras de plasma foram pré-diluídas em PBS pH 7,2 na diluição 1:2. Esta mistura foi novamente diluída em RF (1:4) e deixada à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esta incubação, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm, durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para a dosagem de IgE.

**ELISA para IgE:** A placa foi sensibilizada com 40µg/ml de antígeno *L.chagasi* (100µl/poço), durante a noite a 4°C. Na etapa seguinte, lavou-se três vezes com PBS-T 0,05% (250µl/poço) e

bloqueada com 250µl/poço de PBS-T 0,1%, por 2h a 37°C. Em seguida, os plasmas (diluídos em 1:4) foram colocados (250µl/poço) e incubados a 4°C durante a noite. Após 3 lavagens, o anticorpo anti-IgE conjugado a fosfatase alcalina (SIGMA) foi colocado (100µl/poço) e incubado por 2 horas a 37°C. Foram realizados (SIGMA). Após 30 minutos a reação foi parada com NaOH 3M (ATTA *et al.*, 1998). A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando-se luz visível no comprimento de onda de 405nm e o resultado expresso em densidade ótica (OD). Considerou-se a reação positiva quando o nível de absorbância (cut-off) era igual ou superior a 0,027.

#### 4.4.4 Produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e plasma

As células CMSP foram obtidas por passagem em gradiente de Histopaque (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). As células foram lavadas e ressuspensas na concentração de  $3 \times 10^6$  cels/ml, em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY), contendo penicilina 100U/L e estreptomicina 100µg/ml e suplementado com L-glutamina 300mg/ (Gibco, grand Island, NY), e 10% de soro humano AB. A suspensão celular foi distribuída em placas (Nunc-Immuno™ Plate PolySorp™ Surface – Dinamarca) de 24 poços e cultivada sem estímulo (controle negativo), com antígeno de *L. chagasi* (10µg/ml) ou com ConA (5µg/ml), a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram colhidos após 24, 48 e 96 horas para avaliação das citocinas, TNF-α, IL-10 e IFN-γ, respectivamente, determinados através da técnica de *Enzyme-linked immunosorbent assay* de captura (ELISA sanduíche).

#### 4.4.5 Dosagem de citocinas no plasma e no sobrenadante de CMSP

As dosagens de citocinas do sobrenadante ou plasma dos pacientes foi realizado pela técnica de ELISA utilizando-se kits comerciais e seguindo as recomendações do fabricante (PharMingem, Sam Diego, CA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 450nm e os resultados expressos em pg/ml baseados numa curva padrão. A sensibilidade para o teste de IFN- $\gamma$  - 8pg/ml, TNF- $\alpha$  - 10 pg/ml, IL-10 - 5pg/ml, IL-12 - 5pg/ml.

### 4.5 Aspectos éticos

O estudo foi apreciado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Presidente Dutra-UFMA e todos os pacientes ou responsáveis por eles, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE).

### 4.6 Análise Estatística

Analisaram-se os dados nos programas EPI-INFO, versão 6.04b (CDC-Atlanta-EUA) e GraphPad Prism versão 2.0 (GraphPad Software INC, 1995). Para as variáveis idade e tempo de residência, calculou-se a média e o desvio padrão; para o sexo, a proporção. Em relação as variáveis epidemiológicas, reside em área endêmica, presença de

cães, presença de raposa e flebotomíneos, animais na vizinhança e história de LV na família, considerou-se a frequência absoluta; e para as variáveis clínicas como febre, esplenomegalia, hepatomegalia, palidez cutâneo-mucosa, tosse, diarreia, adenomegalia, sangramento, pneumonia e parasitose intestinal, considerou-se a frequência absoluta antes do tratamento. Para comparar essas variáveis entre crianças e adultos, utilizou-se o teste qui-quadrado e quando as frequências esperadas eram inferiores a 5 foi utilizado o teste de Fischer.

Calculou-se o percentual de variação para algumas variáveis com parâmetros de normalidade diferentes por faixa etária: tamanho do fígado e baço, peso, dados hematológicos e bioquímicos (ANEXO II), dosagens de imunoglobulinas (ANEXO II). Considerou-se como percentual de variação, valor final menos o valor inicial dividido pelo valor inicial, e o resultado expresso em proporção. O valor inicial corresponde aos dados antes do tratamento e o final, ao término do tratamento. O percentual de variação negativo significa que o valor final foi menor que o inicial e o positivo, significa valor final maior que o inicial. O teste t de Student não pareado foi utilizado para comparar essas variáveis entre crianças e adultos.

Na comparação dos exames laboratoriais, imunoglobulinas e citocinas antes e após o tratamento de cada grupo, utilizou-se o teste t de Student pareado, quando as observações apresentavam distribuição normal, e o teste não paramétrico de Wilcoxon para observações pareadas quando a distribuição não era normal. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando o valor de "P" era menor ou igual a 0,05, considerou-se a diferença estatisticamente significativa. Foram calculadas as médias para expressar os valores médios de densidade óptica (OD) do teste de ELISA para as imunoglobulinas e, em pg/ml para as citocinas. Na análise das imunoglobulinas e citocinas foram considerados somente 7 pacientes adultos (retirado a paciente gestante e o paciente com HIV positivo).

A duração do tratamento dos pacientes em ambulatório foi de 20 dias, e em internação hospitalar, 30 dias. Todavia, como não houve diferença entre os dados dos pacientes com tratamento de 20 e 30 dias, decidiu-se considerar o término do tratamento 30 dias.

# Resultados

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Aspectos clínico-laboratoriais

A análise prospectiva foi realizada com 23 pacientes com LV, sendo que 14 (61%) eram crianças com idade entre um a nove anos ( $3,82 \pm 2,39$ ); destas, 78% eram menores de cinco anos de idade. Nove (39%) eram adultos entre 16 a 51 anos ( $27,44 \pm 10,90$ ). Dos 23 pacientes, 10 foram tratados em hospitais pertencentes ao Sistema Único de Saúde (SUS) e 13 no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do Núcleo de Patologia Tropical da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, em São Luís-MA.

Quanto ao gênero, a relação entre o sexo masculino: feminino nas crianças foi 1:1 e nos adultos, 1,2:1. Em relação à ocupação, as mais frequentes entre os adultos foram domésticas (33%), estivadores (23%), vigilantes, estudantes, eletricitas e sem ocupação (11% respectivamente). As variáveis epidemiológicas não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre crianças e adultos (Tabela 1).

A duração da doença, desde o início dos sinais e sintomas até o diagnóstico, nas crianças ( $7,14 \pm 8,58$  semanas) foi menor que nos adultos ( $14,22 \pm 9,62$  semanas) (Tabela 2). Vinte e dois pacientes apresentaram o teste anti-HIV negativo, porém em um paciente adulto foi confirmado caso de síndrome da imunodeficiência adquirida/Aids por meio de exames específicos (IFI e carga viral) e dosagens de CD4 e CD8.

Tabela 1. Aspectos demográficos e epidemiológicos dos pacientes com leishmaniose visceral. São Luis-MA, 2002.

Variável	Crianças (n=14)	Adultos (n=9)	P
Idade (anos)	3,82± 2,39*	27,44± 10,90*	
Relação sexo M:F	1:1	1,2:1	
Tempo de residência (anos)	2,00± 3,50*	4,00±15,00*	0,147
Reside em área endêmica	13 / 14 (93%)	9 / 9 (100%)	0,423
Presença de cães	13 / 14 (93%)	9 / 9 (100%)	0,423
Presença de raposa	6 / 14 (49%)	5 / 9 (55%)	0,543
Presença de flebotomíneos	13 / 14 (93%)	9 / 9 (100%)	0,423
Animais doentes na vizinhança	9 / 14 (64%)	6 / 9 (67%)	0,909
História de LV na família	6 / 14 (43%)	3 / 9 (33%)	0,655

\*média ±desvio padrão

A redução do baço e fígado no grupo de crianças foi em média de 60% e 54% respectivamente, e no grupo de adultos, 36% e 49% respectivamente, no final do tratamento. Quanto ao peso, observou-se um aumento em média de 8% no grupo de crianças e 5% no grupo de adultos, no final do tratamento. Entretanto, aos 120 dias após o tratamento o ganho de peso foi mais acentuado, sendo em média de 141% no grupo de crianças e 128% no grupo de adultos. Não houve diferença estatisticamente significativa na duração do internamento, no percentual de variação do fígado e do baço, bem como no percentual de variação do peso entre o grupo de crianças e o grupo de adultos (Tabela 2).

Convém ressaltar que todas as crianças apresentaram hepatoesplenomegalia. Entretanto, dois pacientes adultos não apresentaram fígado palpável e no paciente adulto com co-infecção *Leishmania*/HIV não foi possível a palpação do baço e do fígado no exame físico. Sessenta por cento dos pacientes terminaram o tratamento apresentando



hepatoesplenomegalia porém bem menores em relação ao início do tratamento, anemia discreta e inversão albumina/globulina. Destes, 5% apresentaram o baço palpável ( $\pm 3$ cm do rebordo costal esquerdo-RCE) aos 120 dias após o tratamento, não sendo mais palpável ao sexto mês de seguimento.

Entre os aspectos clínicos observou-se que hepatomegalia e palidez cutâneo-mucosa foram mais frequentes no grupo de crianças. No grupo de adultos se destacaram adenomegalia e a presença de sangramentos (melena discreta). Não houve diferença significativa entre os dois grupos no que diz respeito à frequência de febre, esplenomegalia, tosse, diarreia, pneumonia e parasitoses intestinais (Tabela 2). A maioria dos pacientes (90%) tornou-se afebril no final da primeira semana de tratamento.

Quanto aos achados hematológicos e bioquímicos no grupo das crianças, observou-se um aumento significativo de eritrócitos ( $P=0,002$ ) hemoglobina ( $P<0,001$ ), hematócrito ( $P<0,001$ ), leucócitos ( $P=0,010$ ) eosinófilos ( $P=0,014$ ), segmentados ( $P=0,005$ ), plaquetas ( $P=0,002$ ), albumina ( $P=0,023$ ) e uma diminuição de globulina ( $P=0,006$ ) no final do tratamento. Sessenta por cento das crianças estavam com quadro hematológico e bioquímico dentro dos padrões de normalidade no final do tratamento e as demais, normalizaram no final do terceiro mês de seguimento.

No grupo de adultos foi observado aumento de eritrócitos ( $P=0,043$ ), hematócrito ( $P=0,013$ ), leucócitos ( $P=0,008$ ), plaquetas ( $P=0,007$ ) e albumina ( $P<0,001$ ), e redução de globulina ( $P=0,002$ ). Entretanto, somente 22% dos adultos atingiram os padrões de normalidade no final do tratamento (Tabela 3).

Para compararmos os dois grupos foi necessário calcular o percentual de variação dos achados hematológicos e bioquímicos devido às diferenças inerentes aos parâmetros por faixa etária. Entretanto, não houve diferença significativa quanto aos dados

hematológicos e bioquímicos entre os dois grupos (Tabela 4 ). Por outro lado, observou-se um aumento significativo na contagem relativa dos linfócitos ( $P < 0,001$ ) e segmentados ( $P = 0,014$ ) no grupo de crianças em relação ao grupo de adultos.

Os pacientes foram tratados com antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime<sup>®</sup>) na dose de  $20\text{mg/Sb}^{5+}/\text{Kg}/\text{dia}$  (dose máxima de 850 mg/dia), por via endovenosa, durante 20 a 30 dias. Uma paciente gestante foi tratada com Anfotericina B na dose de  $1\text{mg}/\text{Kg}/\text{dia}$  durante 14 dias. Dois pacientes adultos queixaram-se de mialgias no início do tratamento com o Glucantime<sup>®</sup>, porém não houve necessidade de suspendê-lo. Houve um óbito por acidente com carga elétrica e nenhum caso foi caracterizado como não responsivo à terapêutica.

Tabela 2. Aspectos clínicos de crianças e adultos com leishmaniose visceral. São Luís-MA, 2002.

Variável	Crianças	Adultos	P
Duração da doença (semanas)	7,14 ±8,58*	14,22 ±9,62*	0,039
Duração da internação (dias)	16,33 ±3,14*	21,25 ±6,29*	0,257
Percentual de variação do fígado	-0,362±0,214*	-0,496 ±0,291*	0,393
Percentual de variação do baço	-0,600 ±0,291*	-0,540 ±0,321*	0,659
Percentual de variação do peso	0,080± 0,116*	0,045± 0,073*	0,607
Febre	14 / 14 (100%)	7 / 9(78%)	0,071
Esplenomegalia	14 / 14(100%)	8 / 9(89%)	0,212
Hepatomegalia	14 / 14(100%)	6 / 9(67%)	0,023
Palidez cutâneo-mucosa	13 / 14(93%)	5 / 9(55.5%)	0,038
Tosse	8 / 14(57%)	4 / 9(44%)	0,560
Diarréia	7 / 14(50%)	6 / 9(67%)	0,441
Adenomegalia	2 / 14(22%)	6 / 9(67%)	0,017
Sangramento	0 / 14	4 / 9(44%)	0,014
Pneumonia	5 / 14(36%)	1 / 9(11%)	0,208
Parasitose intestinal	6 / 14(43%)	2 / 9(22%)	0,290

\*média ±desvio padrão

percentual de variação:  $\frac{\text{valor final} - \text{valor inicial}}{\text{valor inicial}}$

valor inicial

Tabela 3. Dados hematológicos e bioquímicos de crianças e adultos com leishmaniose visceral, antes do tratamento (dia zero) e no término do tratamento (30 dias). São Luís-MA, 2002.

EXAMES	Crianças			Adultos		P
	Dia zero	30 dias	P	Dia zero	30 dias	
	Média±Desvio padrão	Média±Desvio padrão		Média±Desvio padrão	Média±Desvio padrão	
Eritrócitos(x1000/mm)	2,98±0,65	4,0±0,60	<0,001	2,97±0,50	3,67±0,70	0,043
Hemoglobina(g/dl)	7,18±1,77	9,38±1,93	<0,001	8,0±0,87	9,44±1,85	0,056
Hematócrito (%)	22,7±5,18	29,7±4,84	<0,001	24,56±2,93	32,26±6,19	0,013
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	6371±5886	13410±6715	0,010	2448±775	4527±1506	0,008
Eosinófilos (mm <sup>3</sup> )	164±320	1641±2076	0,014	61,2±60,5	394,8±406,4	0,044
Segmentados (mm <sup>3</sup> )	1864±1706	5262±2992	0,005	1523±1199	1965±943,9	0,115
Linfócitos (mm <sup>3</sup> )	4109±4453	4817±2509	0,411	1022±372,5	1661±800,8	0,064
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	148,200±80,4	382,900±111,9	0,002	109,900±47,42	217,000±93,2	0,007
Uréia (mg/dl)	16,85±7,22	13,5±5,82	0,081	17,11±3,41	19,56±6,02	0,234
Creatinina (mg/dl)	0,46±0,13	0,43±0,12	0,456	1,21±1,24	1,27±1,41	0,802
Globulina (U/ml)	3,26±1,11	1,93±0,68	0,006	3,57±0,86	1,80±0,26	0,002
Albumina (U/ml)	2,49±0,91	3,45±0,83	0,023	2,13±0,67	3,63±0,61	<0,001
Glicemia (mg/dl)	79,86±4,94	79,57±4,94	0,611	78,44±4,6	77,44±2,74	0,505
AST <sup>1</sup> (U/l)	76,50±39,68	60,67±28,1	0,088	68,56±38,16	44,44±25,1	0,065
ALT <sup>2</sup> (U/l)	51,51±47,22	31,43±12,1	0,090	46,89±22,22	30,67±15,63	0,050
VHS <sup>3</sup> (mm)	95,29±35,68	76,29±25,53	0,125	114,2±24,45	111,4±29,59	0,606

<sup>1</sup>Aspartato amino transferase

<sup>2</sup>Alamina amino transferase

<sup>3</sup>Velocidade de hemossedimentação

Tabela 4. Diferença entre os percentuais de variação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de crianças e adultos com leishmaniose visceral. São Luís-MA, 2002.

EXAMES	Crianças	Adultos	P
	Média±Desvio padrão	Média±Desvio padrão	
Eritrócitos(x1000/mm)	0,221±0,855	0,200±0,260	0,943
Hemoglobina (g/dl)	0,357±0,355	0,200±0,224	0,250
Hematócrito (%)	0,364±0,361	0,344±0,240	0,825
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	2,81±4,118	-1,178±1,129	0,263
Eosinófilos (mm <sup>3</sup> )	8,950±39,59	7,878±8,00	0,196
Segmentados (mm <sup>3</sup> )	4,176±7,313	0,800±1,163	0,187
Linfócitos (mm <sup>3</sup> )	0,300±0,95	0,757±1,03	0,432
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	2,086±2,371	0,867±1,052	0,163
Uréia (mg/dl)	0,229±0,182	0,300±0,206	0,402
Creatinina (mg/dl)	0,186±0,192	0,389±0,379	0,102
Globulina (U/ml)	-0,343±0,277	-0,378±0,327	0,786
Albumina (U/ml)	0,529±0,521	0,789±0,446	0,231
Glicemia (mg/dl)	0,043±0,051	0,033±0,050	0,665
AST <sup>1</sup> (U/l)	0,324±0,176	0,400±0,269	0,405
ALT <sup>2</sup> (U/l)	0,586±0,789	0,411±0,247	0,537
VHS <sup>3</sup> (mm)	0,534±0,674	0,111±0,093	0,077

<sup>1</sup>Aspartato amino transferase

<sup>2</sup>Alamina amino transferase

<sup>3</sup>Velocidade de hemossedimentação

Percentual de variação:  $\frac{\text{valor final} - \text{valor inicial}}{\text{valor inicial}}$

## 5.2 Avaliação dos anticorpos anti-Leishmania

Avaliou-se as concentrações de anticorpos de IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra antígeno de *L.chagasi* em crianças e adultos (exceção gestante e HIV positivo), antes do tratamento, no término e após o tratamento. Analisando as médias das densidades óticas das imunoglobulinas dos dois grupos juntos (Figura 1), observou-se que as concentrações de IgG, IgG1, IgG3 e IgG4 foram mais elevadas que IgG2. Observou-se, também, que IgG e IgG1 apresentaram uma queda mais acentuada aos 120 dias, enquanto em IgG3 a queda foi menos acentuada. Mesmo assim, IgG, IgG1 e IgG3 permaneceram com as concentrações superiores ao cut-off nos tempos avaliados, portanto, não se comportando como bons marcadores precoces de cura.

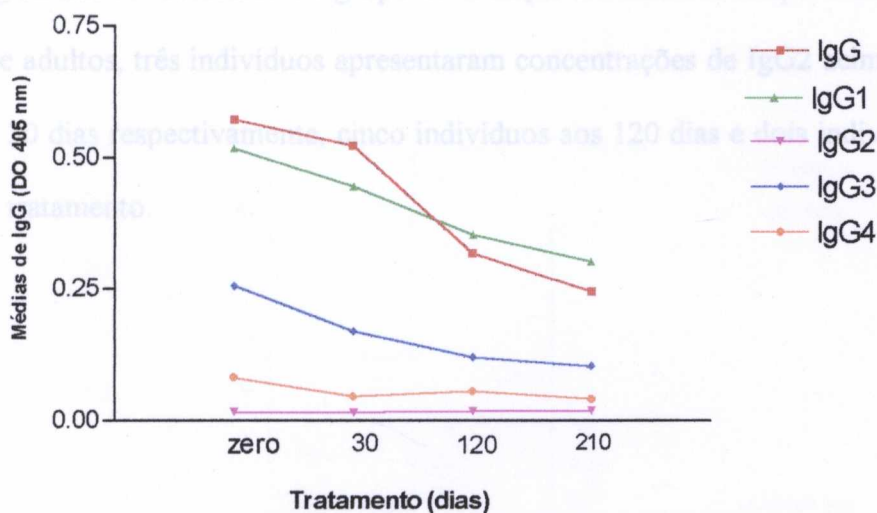


Figura 1 Distribuição das médias de IgG (cut-off  $\geq 0,056$ ), IgG1 (cut-off  $\geq 0,044$ ), IgG2 (cut-off  $\geq 0,023$ ), IgG3 (cut-off  $\geq 0,012$ ), e IgG4 (cut-off  $\geq 0,013$ ) de crianças e adultos em densidade ótica (OD) nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, e 120 e 210 dias após o tratamento.

Ao analisarmos os dois grupos separadamente, observou-se que as concentrações de IgG (Figura 2) no grupo de crianças foram mais baixas aos 210 dias ( $P=0,021$ ) do que no grupo de adultos. Analisando somente o grupo de crianças, observou-se que a diminuição das concentrações de IgG foi mais acentuada a partir dos 120 dias após o tratamento, porém uma criança apresentou concentração de IgG abaixo do cut-off no final do tratamento e três crianças aos 210 dias após o tratamento. Em relação as concentrações de IgG1 (Figura 3), observou-se que houve diferença entre crianças e adultos no término do tratamento ( $P=0,025$ ) e 120 dias após o tratamento ( $P= 0,030$ ).

Convém ressaltar que tanto as concentrações de IgG como de IgG1 mantiveram-se elevados nos dois grupos durante os seis meses de avaliação. Por outro lado, IgG2 não foi detectado no grupo de crianças em nenhum tempo avaliado, enquanto no grupo de adultos, três indivíduos apresentaram concentrações de IgG2 acima do cut-off no dia zero e 30 dias respectivamente, cinco indivíduos aos 120 dias e dois indivíduos aos 210 dias após o tratamento.

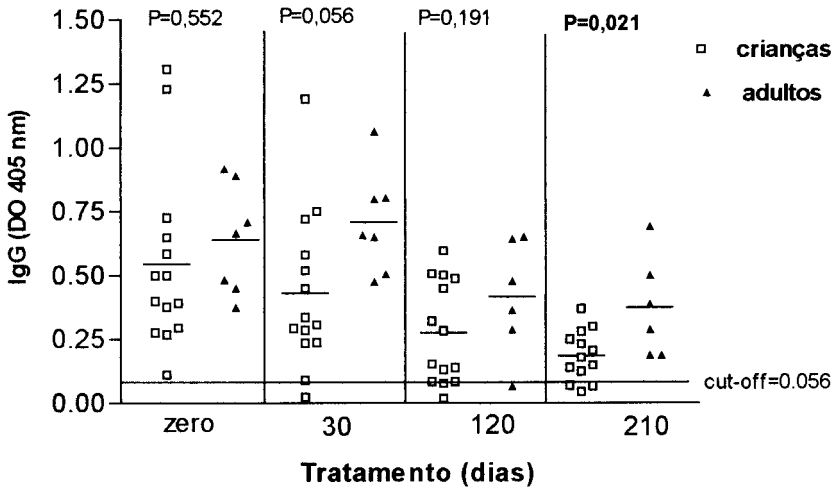


Figura 2. Concentrações plasmáticas de IgG (cut-off  $\geq 0,056$ ) em densidade ótica (OD) de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as médias. Teste t de Student não pareado

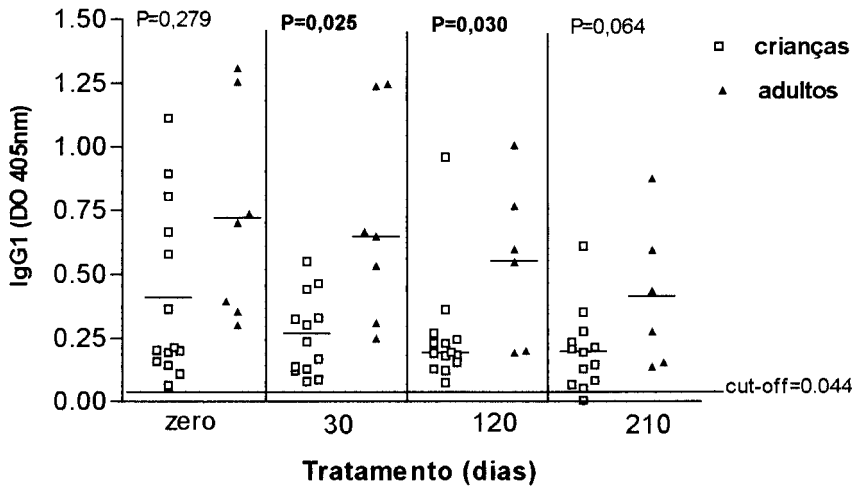


Figura 3. Concentrações plasmáticas de IgG1 (cut-off  $\geq 0,044$ ) em densidade ótica (OD) de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as médias. Teste t de Student não pareado



Comparando as concentrações de IgG3 entre crianças e adultos, observou-se que as concentrações eram mais elevadas nos adultos no término do tratamento ( $P=0,031$ ), aos 120 dias ( $P=0,004$ ) e 210 dias ( $P=0,024$ ) após o tratamento (Figura 4). Entretanto, quase todos os pacientes mantiveram as concentrações de IgG3 detectáveis até aos 210 dias de seguimento, com exceção de duas crianças que apresentaram concentrações de IgG3 baixo do cut-off no término do tratamento. Quanto às concentrações de IgG4, observou-se que não houve diferença entre crianças e adultos e as concentrações mantiveram-se inalteradas durante os quatro tempos avaliados.

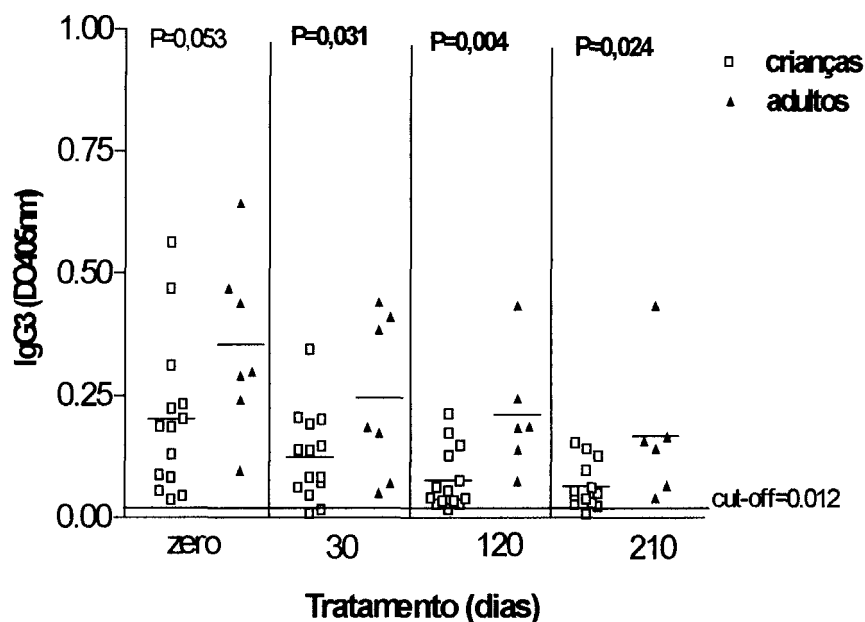


Figura 4. Concentrações plasmáticas de IgG3 (cut-off  $\geq 0,012$ ) em densidade ótica (OD) de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as médias. Teste t de Student não pareado.

Todos os pacientes adultos e doze crianças (87%) apresentaram níveis detectáveis de IgE (Figura 5) antes do início da terapêutica. As concentrações de IgE mantiveram-se praticamente inalterados nos quatro tempos avaliados, variando no início do tratamento de 0,014 a 0,232 no grupo de crianças e no grupo de adultos, de 0,037 a 0,221; a variação aos 210 dias foi de 0,010 a 0,0226 no grupo de crianças e no grupo de adultos, de 0,045 a 0,253. Não houve diferença significativa nas concentrações desta citocina entre crianças e adultos nos tempos avaliados.

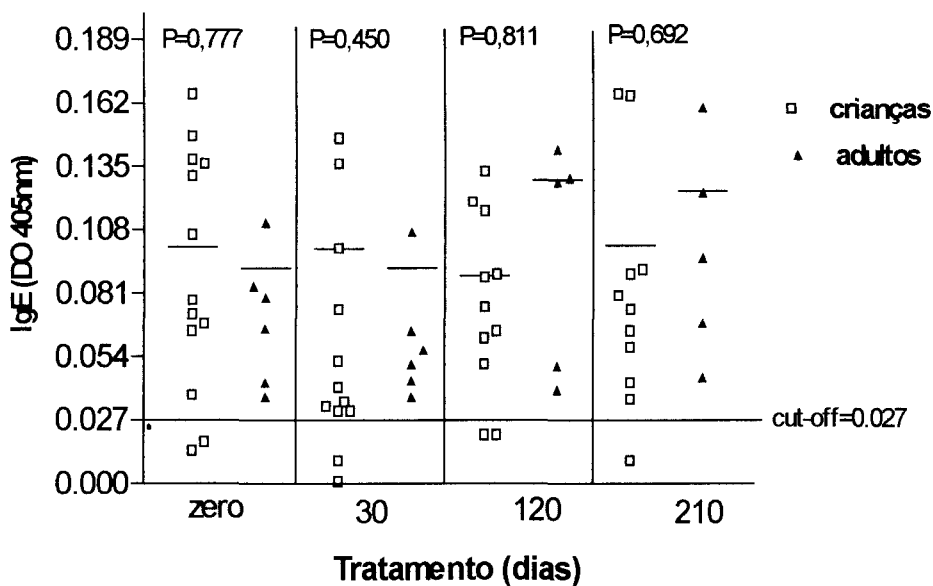


Figura 5 Concentrações plasmáticas de IgE (cut-off  $\geq 0,027$ ) em densidade ótica (OD) de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. As barras horizontais indicam as médias. Teste t de Student não pareado

### 5.3 Avaliação da resposta imune celular

A avaliação da resposta imune celular realizada por meio do IDRМ mostrou que há diferença significativa nas concentrações de resposta após seis meses do tratamento. Contudo, aos 120 dias somente 5% (2 crianças) dos indivíduos apresentaram positividade no IDRМ, e 13 % (3 crianças e 2 adultos) aos 210 dias, após o tratamento. Os demais indivíduos converteram a IDRМ ao longo de 360 dias. Não houve diferença no tempo de conversão do IDRМ entre crianças e adultos (Figura 6).

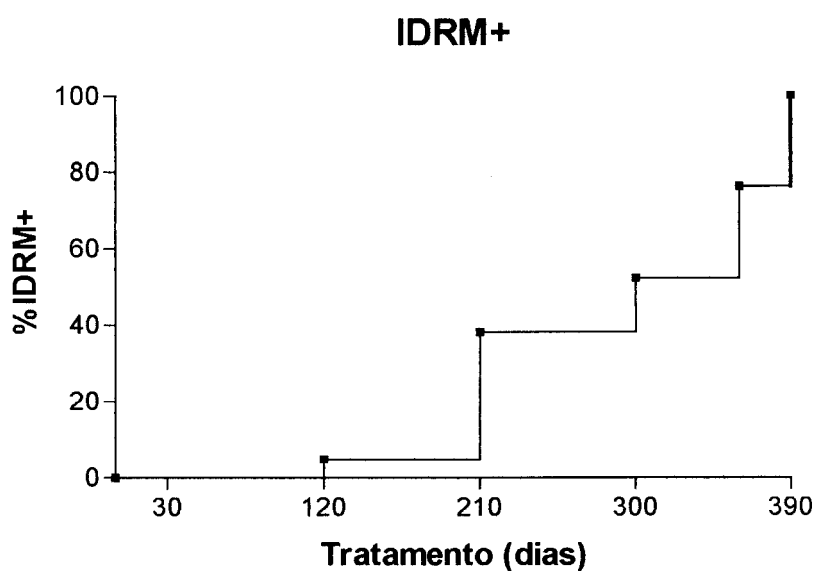


Figura 6 Distribuição do percentual de conversão da intradermorreação de Montenegro (IDRМ) após o tratamento das crianças e adultos com leishmaniose visceral.

Quanto a linfoproliferação (Figura 7), observou-se ausência de proliferação linfocitária no início do tratamento em todos os pacientes. Entretanto, ao término do tratamento duas crianças e dois adultos apresentaram índice de estimulação superior a 5, e o maior pico foi observado aos 120 dias (6 crianças e 4 adultos). Não há diferença significativa entre os dois grupos. Os indivíduos (13%) que apresentaram IDRM positivo aos 210 dias após o tratamento não foram os mesmos que apresentaram linfoproliferação positiva.

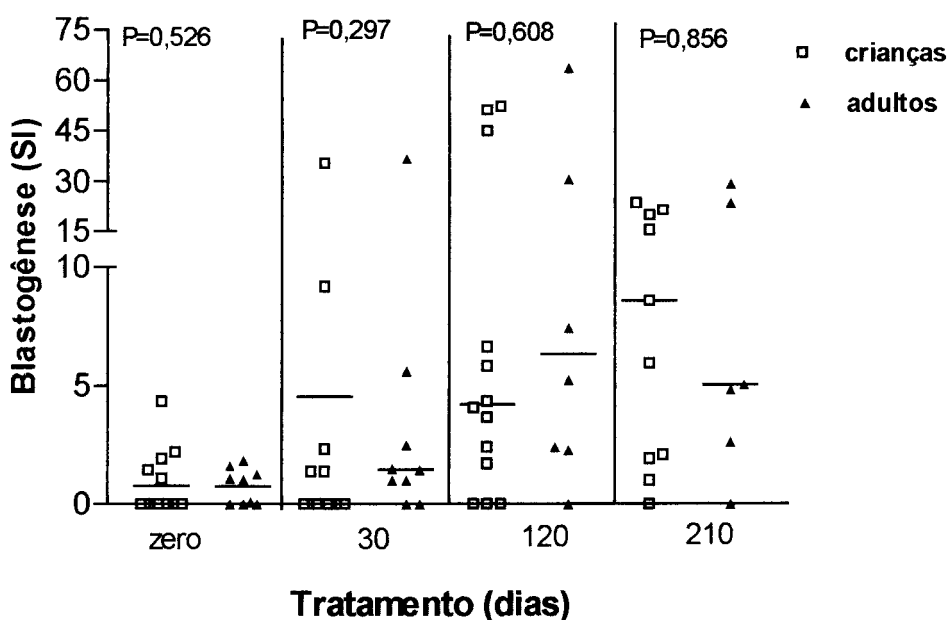


Figura 7 Índice de estimulação linfocitária em crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto indica um indivíduo. Os pontos vazios indicam crianças e os cheios, adultos. As barras horizontais indicam as medianas.  $SI \geq 5$ .

## 5.4 Avaliação das citocinas em CMSP e no plasma

Os dados gerais sobre as citocinas plasmáticas de crianças e adultas encontram-se na Tabela 5. A ausência de produção de IFN- $\gamma$  pelas CMSP estimuladas por antígeno anti-*Leishmania* foi documentada em quase todos os pacientes. No dia zero somente três indivíduos (uma criança e dois adultos) produziram IFN- $\gamma$  em concentrações acima de 50pg/ml, e à medida que apresentavam melhora clínica aumentava a produção de IFN- $\gamma$  (Figura 8A). Por outro lado, as concentrações de IFN- $\gamma$  no plasma foram mais significantes no dia zero, sendo detectáveis em 86% das crianças e em todos os adultos, diminuindo acentuadamente no final do tratamento (43% e 33% respectivamente), não sendo mais detectáveis nos adultos e somente em três crianças (21%) aos 120 dias após o tratamento (Figura 8B). Não houve diferença significativa entre crianças e adultos nas concentrações de IFN- $\gamma$  (CMSP e plasma).

Entretanto, ao compararmos as concentrações de IFN- $\gamma$  de CMSP e IFN- $\gamma$  no plasma dos dois grupos juntos, observou-se que a concentração de IFN- $\gamma$  no plasma era mais elevada no dia zero, mas ao término do tratamento não houve diferença significativa entre os dois parâmetros (CMSP e plasma) ( $P=0,111$ ), sendo que o IFN- $\gamma$  nas CMSP nos tempos subsequentes apresentou concentrações mais elevadas do que o IFN- $\gamma$  no plasma (Figura 8C). Portanto, à medida que o tratamento avançava as concentrações de IFN- $\gamma$  nas CMSP aumentavam e as concentrações do IFN- $\gamma$  no plasma, diminuam.

As concentrações plasmáticas de IL-10 foram significativamente mais elevadas que em culturas de CMSP em todos os tempos avaliados, principalmente no dia zero

( $P < 0,001$ ) (Figura 9C). Foram detectados em 86% das crianças e em 89% dos adultos no dia zero, porém não se observou diminuição significativa nos tempos subsequentes (93% e 78% respectivamente, em 30 dias; 93% e 89% respectivamente, em 120 dias; e 79% e 87,5% respectivamente, em 210 dias) (Figura 9B). Por outro lado, as concentrações desta citocina em CMSP diminuíam à medida que os pacientes apresentavam melhora clínica (Figura 9A). As concentrações de IL-10 tanto no sobrenadante de CMSP estimulados com antígeno de *Leishmania* como no plasma, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre crianças e adultos nos tempos avaliados (Figura 9A e B).

No que diz respeito às concentrações TNF- $\alpha$ , observou-se que as concentrações de TNF- $\alpha$  em CMSP aumentavam significativamente com o avançar do tratamento, porém com níveis mais elevados aos 30 dias de tratamento no grupo de crianças e aos 120 dias no grupo de adultos. Não há diferença significativa entre crianças e adultos (Figura 10A). Por outro lado, às concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  não foram detectáveis nos tempos avaliados. Observou-se diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e em cultura de CMSP em todos os tempos (Figura 10B).

Portanto, os indivíduos com leishmaniose visceral (crianças e adultos) apresentaram níveis plasmáticos elevados tanto de IFN- $\gamma$  como IL-10 antes do início da terapêutica específica, havendo concomitância entre a detecção destas citocinas e a presença de sinais e sintomas da doença. À medida que o tratamento foi instituído e houve melhora clínica, observou-se diminuição significativa das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  em 61% dos indivíduos no final do tratamento, 91% aos 120 dias após o tratamento, e em 95% dos indivíduos em 210 dias após o tratamento. Entretanto, o mesmo não aconteceu com as concentrações de IL-10, pois foram detectados significativamente em 86% dos indivíduos.

Tabela 5. Concentrações das citocinas (CMSP e Plasma) de crianças e adultos com leishmaniose visceral nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 dias e 210 dias após o tratamento. São Luís-MA, 2002.

	<b>Zero dia</b>	<b>30 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>210 dias</b>
<b>Citocinas</b>	Média±SD (Variação)	Média±SD (Variação)	Média±SD) (Variação)	Média±SD (Variação)
<b>CRIANÇAS</b>				
IFN- $\gamma$ CMSP	20±54 (0-207)	256±455 (0-1731)	1705±265 (0-9353)	2679±5994 (0-2237)
IFN- $\gamma$ Plasma	383±440 (0-1626)	195±94 (0-1009)	20±53 (0-193)	7±23 (0-84)
IL-10 CMSP	31±43 (0-155)	55±62 (0-238)	29±43 (0-124)	22±31 (0-119)
IL-10 Plasma	634±544 (96-1737)	134±114 (0-395)	154±178 (0-654)	152±143 (0-434)
TNF- $\alpha$ CMSP	4±8 (0-21)	50±84 (0-251)	22±27 (0-77)	21±25 (0-82)
IL-12p40 Plasma	145±154 (0-536)	75±93 (0-339)	42±40 (0-113)	49±49 (0-124)
<b>ADULTOS</b>				
IFN- $\gamma$ CMSP	28±26 (0-1731)	189±409 (0-1246)	842±272 (0-1824)	816±1045 (0-3136)
IFN- $\gamma$ Plasma	515±280 (0-2539)	41±13 (0-159)	0-0	0-0
IL-10 CMSP	53±95 (0-284)	32±57 (0-157)	19±20 (0-50)	58±104 (0-312)
IL-10 Plasma	384±206 (0-654)	90±120 (0-357)	137±53 (61-197)	114±49 (50-187)
TNF- $\alpha$ CMSP	114±221 (0-445)	67±97 (0-263)	127±90 (0-746)	54±87 (1,2-237)
IL-12p40 Plasma	275±221(15-646)	53±49 (0-158)	64±107 (0-316)	9±24 (0-63)

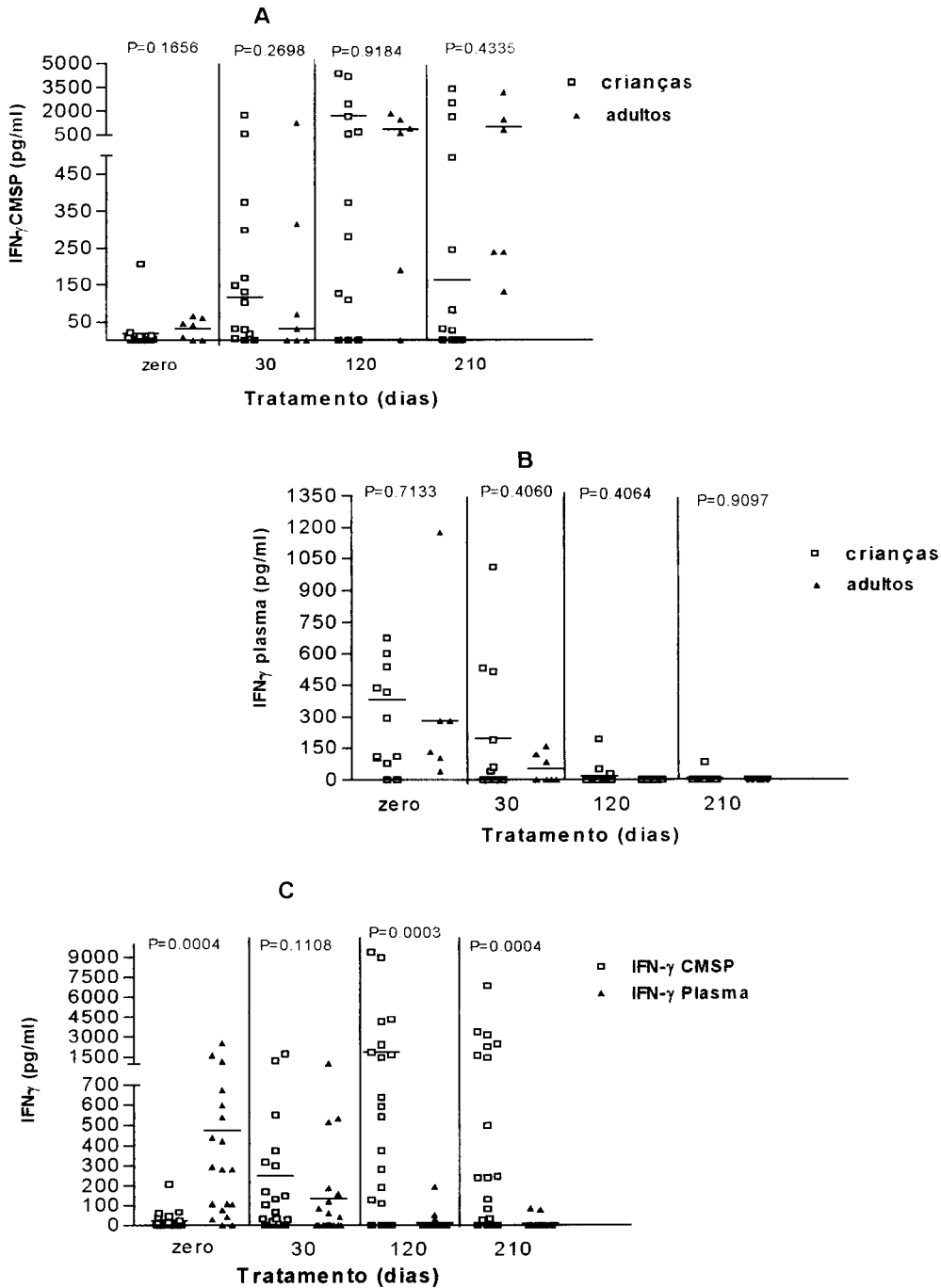


Figura 8. Concentrações de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de CMSP estimulados com antígeno de *Leishmania* e em plasma de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto representa um indivíduo. As barras horizontais indicam a mediana. Teste t de Wilcoxon



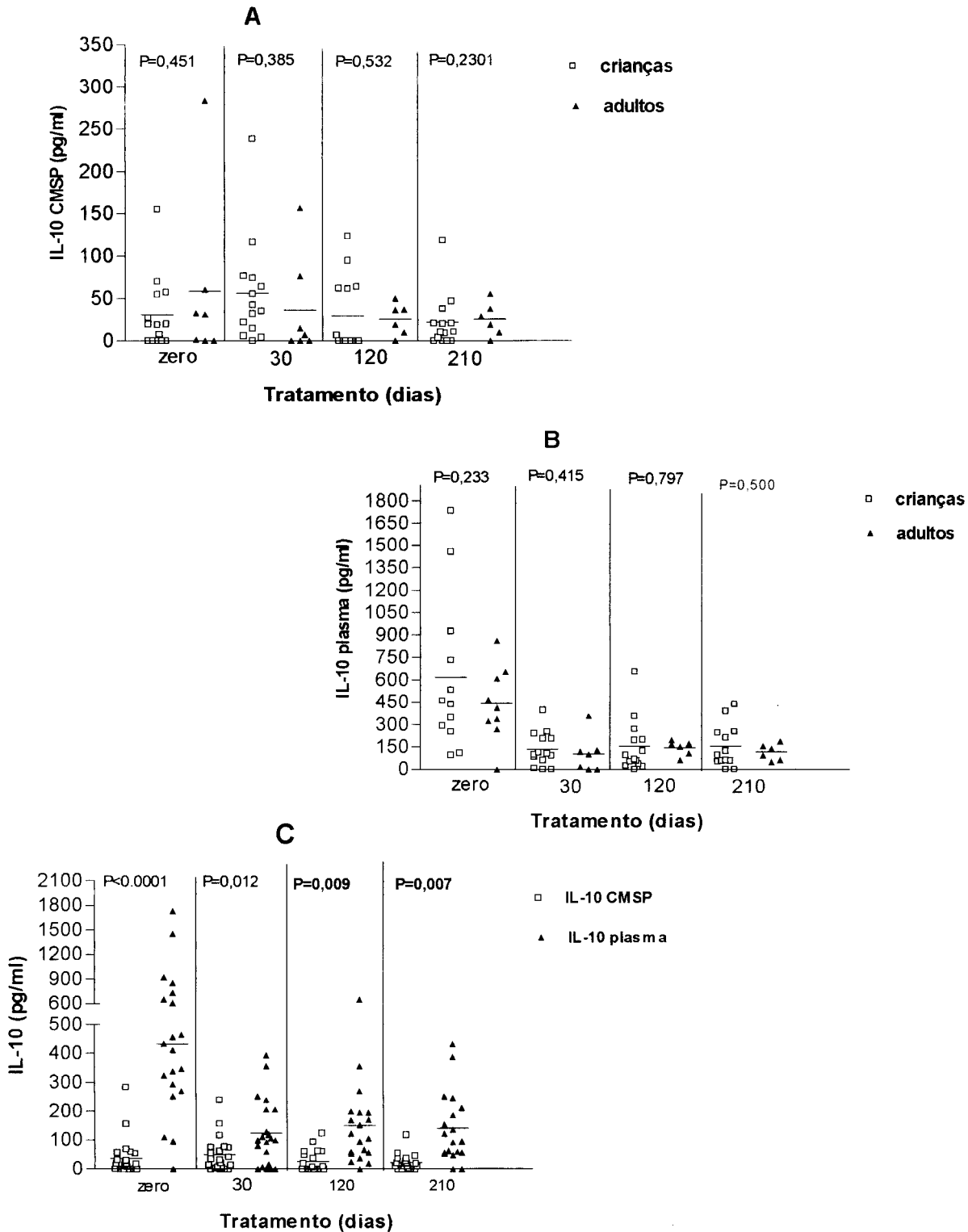


Figura 9 Concentrações de IL-10 em sobrenadante de CMSP estimulados com antígeno de *Leishmania* e em plasma de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto representa um indivíduo. As barras horizontais indicam a mediana. Teste de Wilcoxon

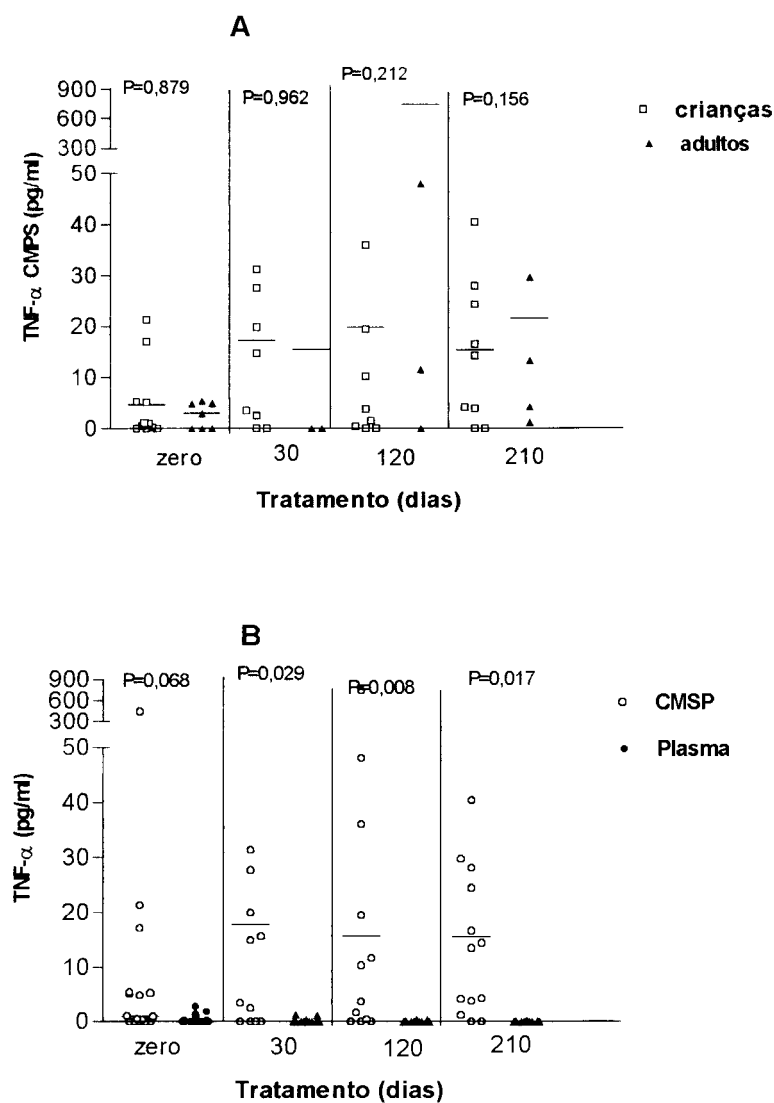


Figura 10. Concentrações de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de CMSP estimulados com antígeno de *Leishmania* de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias. Cada ponto representa um indivíduo (A). Os pontos vazios indicam crianças e os cheios, adultos. As barras horizontais indicam a mediana. Teste de Wilcoxon

As concentrações plasmáticas de IL-12p40 apresentaram-se elevadas antes do tratamento (dia zero), caindo acentuadamente ao término do tratamento (30 dias), e depois mais lentamente nos tempos subseqüentes (120 dias e 210 dias). Observou-se, também, que esta citocina apresentou comportamento similar do INF- $\gamma$  plasmático, porém com níveis superiores em todos os tempos avaliados. No grupo de crianças as concentrações de IL-12p40 foram detectáveis em 78% dos indivíduos no dia zero, 64,3% no término do tratamento, e 71% e 64 % respectivamente, 120 e 210 dias após o tratamento. Por outro lado, no grupo de adultos a detecção foi em 100% dos indivíduos no dia zero, 78% no término do tratamento, 50% e 12,5% respectivamente, 120 e 210 dias após o tratamento (Figura 11). Não houve diferença significativa entre crianças e adultos.

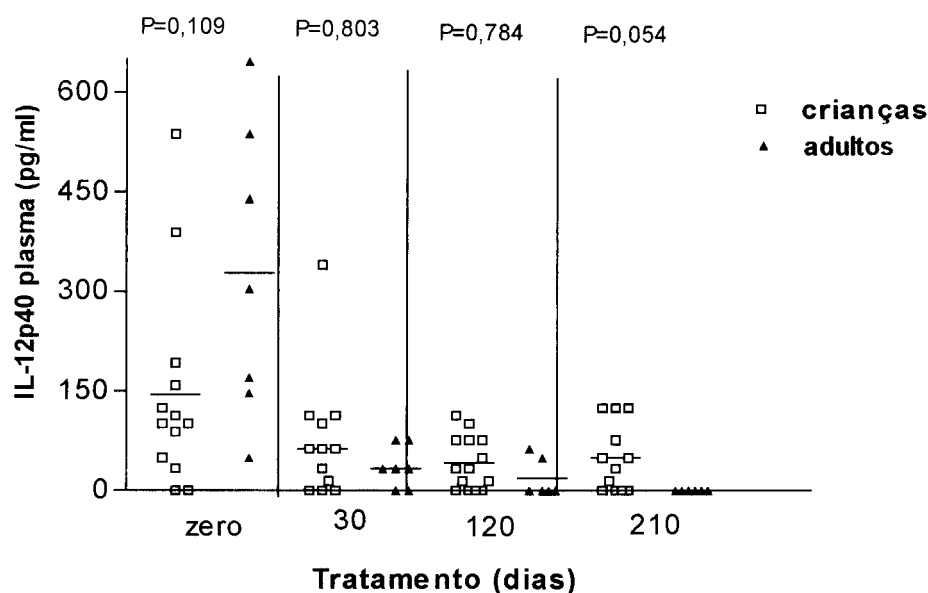


Figura 11 Concentrações plasmáticas de IL-12p40 de crianças e adultos com LV nos seguintes tempos: dia zero, 30 dias, 120 e 210 dias após o tratamento. Cada ponto representa um indivíduo. As barras horizontais indicam a média. Teste t de Student

# Discussão

---

## 6 DISCUSSÃO

Os municípios da Ilha de São Luís constituem-se na principal área endêmica de LV no Maranhão representando 70% dos casos notificados (COSTA *et al.*, 1995; NASCIMENTO *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1997). A maioria desses casos é atendida nos serviços de saúde da rede pública na capital do Estado que, apesar de ser uma rede unificada de serviços, não utiliza métodos e técnicas de diagnóstico e conduta terapêutica similares. Porém para que pudéssemos validar nosso estudo, padronizamos um protocolo de atendimento.

Mudanças ambientais têm sido associadas ao perfil epidemiológico da leishmaniose visceral, com descrições cada vez mais freqüentes de surtos em áreas urbanas e peri-urbanas, sugerindo uma adaptação do vetor e de seu ecossistema a essas áreas. Em nossa casuística constatou-se que não houve diferença na ocorrência da doença entre os sexos, porém a maioria das crianças era procedente de áreas de colonização recente enquanto os adultos, de áreas peri-urbanas antigas de São Luís e de São José de Ribamar. GAMA *et al.* (1998) constataram que em ambas as áreas existiam precárias condições de moradia e saneamento básico, entretanto as áreas peri-urbanas antigas da cidade de São Luís apresentavam características rurais, com árvores frutíferas e presença de animais silvestres como gambá (*Didelphis sp*) e raposa (*P. vetulus*). Tais fatos podem resultar na elevada incidência da doença em famílias com baixo poder aquisitivo (renda inferior a um salário mínimo), que residem em áreas endêmicas, com a presença dos reservatórios - doméstico (cão- *Canis familiares*) e silvestre (raposa- *P. vetulus*), e também com o vetor (*Lu. longipalpis*), e que, associados as precárias condições de moradia tornam o ambiente

propício para a transmissão da doença (LACERDA, 1994; CALDAS *et al.*, 2001; CALDAS *et al.*, 2002).

A duração da doença, desde o início dos sinais e sintomas até o diagnóstico, foi mais longa no adulto. Isto decorre, às vezes, pela dificuldade do profissional em identificar a doença no adulto, uma vez que ela é mais freqüente nas crianças. Tal fato prolonga o período de definição do diagnóstico da LV, tornando sua duração mais extensa no adulto.

RODRIGUES DA SILVA (1957) relatou que a duração prolongada da doença determina o comprometimento do estado nutricional, principal característica do quadro clássico da LV. O tempo de doença pode implicar em comprometimento da função hepática e conseqüentemente, em alterações de fatores de coagulação que determinam discrasia sangüínea, o que pode explicar a ocorrência de sangramentos nesta faixa etária.

As manifestações clínicas da LV nas crianças foram as mesmas encontradas por outros autores como febre, palidez cutâneo-mucosa, hepatomegalia, perda de peso e tosse (PRATA, 1957; RODRIGUES DA SILVA, 1957; HOHENSCHILDO & FELDMEIER, 1995; CAMPOS JUNIOR, 1995; ARAÚJO SOBRINHO *et al.*, 1999). Os achados que mais se destacaram entre as crianças foram hepatomegalia e palidez cutâneo-mucosa. A hepatomegalia pode ser justificada pela ativação de todo sistema fagocítico mononuclear típica do calazar, como também porque a criança nos primeiros anos de vida, até a segunda infância, normalmente, apresenta fígado palpável de mais ou menos 3cm (CARNEIRO-SAMPAIO & GRUMACH, 1992). As crianças geralmente são mais vulneráveis às doenças infecciosas, o que justificaria a presença de pneumonia em cinco crianças (36%) da nossa casuística, reforçado pela maior ocorrência de neutropenia e linfocitose relativa nesse grupo, pois os neutrófilos constituem-se nas células de primeira linha de defesa contra as bactérias.

Um outro sinal que se destacou nas crianças foi a palidez cutâneo-mucosa, confirmada pelos achados hematológicos. Isso mostra a importância dos exames complementares como meio auxiliar na avaliação dos pacientes com LV. A tosse estava presente em 57% das crianças, surgindo no início da doença, geralmente seca e persistente, permanecendo inalterada, desaparecendo no final da terapêutica, sugestivo de pneumonite intersticial atribuída à LV (ANDRADE, 1959; DUARTE *et al.*, 1989), que muitas vezes é confundida com outras doenças, especialmente broncopneumonias.

A diarreia apareceu em mais da metade dos pacientes estudados, porém em alguns pacientes não foi encontrada uma causa específica, desaparecendo durante o tratamento, sugerindo enterite por *Leishmania* (ANDRADE *et al.*, 1990). Adenomegalia é comum no calazar africano e asiático (ZIJLSTRA *et al.*, 1992; NASIR *et al.*, 1992), e pouco expressivo no americano, entretanto, apresentou-se em pequena dimensão em seis adultos e duas crianças da nossa casuística. AL-JURAYYAN *et al.* (1992) em estudo desenvolvido na Arábia Saudita com 63 casos de LV, encontraram 14 (22%) pacientes com pequenos linfonodos nas regiões axilar, cervical e inguinal. A ausência de esplenomegalia foi observada somente no paciente com co-infecção *Leishmania*/HIV. Entretanto, ZIJLSTRA *et al.* (1992) observaram que 9% dos casos de calazar (2% crianças e 7% adultos) por eles estudados não apresentaram esplenomegalia.

Entre as alterações hematológicas presentes em nossa casuística, destaca-se a anemia significativa na maioria dos pacientes. A anemia no calazar parece ser devida ao bloqueio de produção na medula óssea, ao seqüestro esplênico e à hemólise por mecanismo imunológico (DUARTE & CORBERTT, 1994; CAMPOS JUNIOR, 1995). Segundo PRATA (1957) uma das características da anemia no calazar é a de não ceder ao uso de ferro,

transfusões, dieta e outras medidas terapêuticas, exceto ao tratamento com antimoniais pentavalentes.

Foi evidente a redução ou ausência de eosinófilos antes do tratamento nos dois grupos, porém o grupo de crianças apresentou eosinofilia ao término do tratamento, o que parece ser sinal de bom prognóstico (PRATA, 1957; BRASIL, 2003). Porém, torna-se necessário levarmos em consideração a ocorrência de co-morbidade com outras parasitoses podendo elevar o percentual de eosinófilos acima de 20% (PRATA, 1957; RODRIGUES DA SILVA, 1957; CAMPOS JUNIOR, 1995).

No Brasil, a ocorrência de LV durante a gravidez é relativamente rara. Quatro casos foram relatados nos últimos anos, sendo três na região Nordeste (MORAES *et al.*, 1995; VIANA *et al.*, 2001) e um na região Norte (SILVEIRA *et al.*, 1993). Entretanto, tivemos um caso de LV em gestante em nosso estudo. Era uma primípara de três meses de gestação, 17 anos de idade, procedente da área peri-urbana do município de São Luís-MA. No presente caso, a transmissão vertical não foi observada, uma vez que a criança foi acompanhada por exame clínico e sorológico por doze meses e não apresentou sinais e sintomas da doença, mesmo residindo em área endêmica. A sorologia (ELISA) da criança foi positiva do nascimento até seis meses de idade e em seguida tornou-se negativa, portanto, semelhante ao caso descrito por SILVEIRA *et al.* (1993) no estado do Pará. A análise anatomopatológica da placenta não revelou presença de parasita, não houve, então, transmissão de *Leishmania* da mãe para o feto.

Outro aspecto a ser discutido é a toxicidade das drogas usadas no tratamento da LV tanto para a mãe como para o feto. Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ) atravessam a barreira placentária e podem impregnar tecidos nervosos do feto, levando às síndromes graves de retardo mental (MARSDEN, 1985). Contudo, NIAKUNDI *et al.* (1993) recomendaram



que, em áreas endêmica de calazar, mulheres grávidas devem ser tratadas com Stibogluconato de sódio na dose de 20 mg/Sb<sup>5+</sup>/Kg/dia por 30 dias.

Baseado nas altas taxas de cura do calazar (93 a 100%), o uso da anfotericina B tem sido estendido com segurança para mulheres grávidas sem repercussão negativa sobre o feto (MISH *et al.*, 1990; THAKUR *et al.*, 1993, 1999). THAKUR *et al.* (1993) administraram anfotericina B na dose de 1mg/Kg/dia por 20 dias com infusão de 2 horas em quatro mulheres grávidas com calazar e obtiveram êxito ao tratamento sem prejuízo para o feto.

No Brasil, não temos conhecimentos sobre relatos de experiência em tratamento de mulheres grávidas com calazar. Em nosso caso, optou-se por anfotericina B na dose de 1mg/Kg/dia por 14 dias consecutivos baseado no estudo em que a cura foi obtida em 97,5% de pacientes não grávidas com calazar (CARVALHO, 2000), demonstrando que a anfotericina B quando usada como droga de primeira escolha leva a uma alta taxa de cura associada com a redução da dose total. No presente caso, a mãe apresentou uma boa resposta ao tratamento, sem prejuízo para o feto.

Todos os pacientes apresentaram boa resposta à terapêutica com antimonial, havendo melhora progressiva do quadro, caracterizado pelo desaparecimento da febre na primeira semana do tratamento, e posterior melhora do estado geral, ganho de peso e regressão da anemia, leucopenia e plaquetopenia. A redução da hepatoesplenomegalia ocorreu de modo gradual, sendo que 60% dos pacientes no final do tratamento ainda encontravam-se com vísceras aumentadas, porém bem menores em relação ao início do tratamento. No entanto, ao final do primeiro trimestre de seguimento, observou-se normalização dos parâmetros hematológicos e desaparecimento da hepatoesplenomegalia. Não se realizou pesquisa do parasita no aspirado de medula óssea de controle. Entretanto,

com base nos dados expostos, consideramos que não houve falha terapêutica ou recidiva nos pacientes em estudo.

Convém ressaltar que, quando o diagnóstico e o tratamento são bem conduzidos, os pacientes apresentam boa resposta ao antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime<sup>®</sup>) bem como a anfotericina B, prevenindo aparecimento de complicações e refratariedade à droga. A resposta terapêutica ao antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime<sup>®</sup>) no paciente co-infectado *Leishmania*/HIV foi semelhante a dos outros pacientes quando associado às drogas anti-retrovirais, pois quando o paciente realizou tratamento somente com antimoniais a resposta não foi satisfatória. Até os doze meses de seguimento o paciente não havia apresentado recidiva. Todos os pacientes foram acompanhados semanalmente durante o tratamento, mensalmente até três meses após o término do tratamento e trimestralmente durante um ano.

Com relação às imunoglobulinas, observou-se que ambos os grupos apresentaram elevadas concentrações de IgG, IgG1 e IgG3, e em menor proporção IgG4. Resultados semelhantes foram encontrados por SHIDDO *et al.* (1996), onde foram determinadas elevadas concentrações de IgG1 nos pacientes com LV, porém não houve diferença nas concentrações de IgG3 e IgG4, e uma diminuição significativa na concentração de IgG2. Isto indica que o aumento de maior parte destas imunoglobulinas seja consequência da ativação policlonal das células B, típica da doença. A resposta a IgG4 parece ser dependente de um período prolongado de doença, e os nossos pacientes tinham menos de um ano de história de LV, o que pode explicar as baixas concentrações de IgG4 em nosso estudo.

Quando se avalia o sistema imune no calazar, observa-se preponderância de citocinas do subtipo Th2, como IL-4, IL-6 e IL-10 que podem levar a hipergamaglobulemia (FINKELMAN *et al.*, 1986; ANAM *et al.*, 1999) . Em nosso estudo não encontramos

correlação entre IgG e IL-10, porém as concentrações de IgG, IgG2 e IgG3 foram mais elevadas no grupo de adultos. As concentrações séricas de subclasses de IgG normalmente variam de acordo com a idade (CARNEIRO-SAMPAIO, 1992) sendo mais elevadas no adulto que na criança. Isto nos leva a crer que as diferenças encontradas em nosso estudo nas concentrações de imunoglobulinas entre crianças e adultos com LV sejam devidas a essas variações. Nas crianças, as concentrações de IgG caíram mais rapidamente que no adulto no final do tratamento, mas mesmo assim em concentrações superiores ao *cut-off* (0,056) até os seis meses. Achado semelhante foi descrito por NEOOY *et al.* (1987), quando avaliaram 30 pacientes com calazar e que a maioria deles só apresentou concentrações de IgG mais baixas que as iniciais após cinco meses do término do tratamento.

Deve-se salientar que as concentrações de IgG e subclasses dependem de vários fatores como maturidade e estado de ativação celular, além da presença ou não de outros estímulos. RODRIGUEZ *et al.* (1996) mostraram que na leishmaniose cutânea localizada foram detectadas concentrações significativas de IgG1, IgG2 e IgG3, porém na forma mucosa e difusa a predominância foi de IgG1 e IgG4, respectivamente. Na hanseníase, a forma virchowiana apresenta concentrações mais elevadas de IgG2 e IgG3 quando comparado com a forma tuberculóide, porém os pacientes com eritema nodoso têm queda significativa de IgG3 (BEURIA *et al.*, 1998). DEPLAZES *et al.* (1995) analisando subclasses de IgG em cães parasitados demonstraram que anticorpos IgG1 estavam associados ao desenvolvimento de LV doença e que, anticorpos IgG2 com infecção assintomática, porém outros estudos não encontraram essa associação (LEANDRO *et al.*, 2001; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001).

Em nosso estudo as concentrações de IgG1 comportaram-se de modo semelhante às de IgG. A IgG2 não foi detectada nas crianças, porém foi detectada em cinco

adultos em tempos diferentes. As concentrações de IgG não nos pareceram bom parâmetro de resposta terapêutica para o calazar por serem detectáveis em longo período de tempo (seis meses), mas devem ser usados como meio auxiliar no diagnóstico da LV juntamente com os parâmetros clínicos e laboratoriais.

A produção de anticorpos IgE é frequentemente associada com parasitoses intestinais e doenças alérgicas. Isso pode explicar as elevadas concentrações de IgE total em indivíduos com infecção assintomática ou com doença que residem em áreas endêmicas de LV devido à alta prevalência de infecção helmíntica existente nestas áreas. Entretanto, concentrações elevadas de anticorpos do tipo IgE, anti-*Leishmania* foram detectadas por ATTA *et al.* (1998, 2002) em pacientes com LV antes do tratamento ( $0,100 \pm 0,033$ ) e caíram consideravelmente entre um a três meses após o tratamento ( $0,028 \pm 0,002$ ). Por outro lado, SHIDDO *et al.* (1996) detectaram anticorpos IgE somente em quatro dos vinte soros de pacientes com LV, antes do tratamento. Em nosso estudo, as concentrações de IgE foram detectáveis em doze crianças e em todos os adultos nos quatro tempos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de IgE antes e após o tratamento, e nem entre pacientes com ou sem parasitose intestinal. Portanto, a IgE não se comportou como marcador de resposta terapêutica.

Faz-se necessário destacar que na LV ocorrem alterações significativas na resposta imune do hospedeiro caracterizada por ativação policlonal de linfócitos B e marcante depressão da resposta mediada por linfócitos T e macrófagos. Vários estudos têm demonstrado que estas alterações são antígeno-específicas e reversíveis após terapêutica adequada (CARVALHO *et al.*, 1981; HOLADAY *et al.*, 1993a). O caráter reversível desta imunodepressão após terapêutica específica nos leva a acreditar que a mesma seja induzida por mecanismos desencadeados e intrinsecamente relacionados ao parasita, os quais, em

associação aos fatores inerentes ao hospedeiro, definem o curso da infecção a depender do perfil de citocinas produzidas (CARVALHO *et al.*,1981; BARRAL-NETTO *et al.*,1991b; HOLADAY,2000).

A imunidade celular foi avaliada em todos os pacientes antes e após o tratamento, através da IDRM e do teste de transformação linfoblástica com CMSP. Observou-se que a incapacidade dos linfócitos em responder *in vitro* aconteceu antes do tratamento. Contudo, 15% dos pacientes apresentaram resposta ao estímulo induzido por antígeno de *Leishmania* no final do tratamento, e 60% aos 210 dias após a terapêutica específica. Entretanto, a IDRM não acompanhou os achados da blastogênese, uma vez que mais da metade dos pacientes tiveram uma boa resposta linfoproliferativa *in vitro* aos 120 dias após o tratamento e somente três crianças (13%) responderam a IDRM neste período. Segundo BADARÓ *et al.*(1985), uma das possibilidades para explicar estes achados seria que a população de células participantes da IDRM ser diferente da envolvida na blastogênese, e também pelo fato do ensaio *in vitro* responder diferentemente do que ocorre *in vivo*, o que foi documentado por BARRAL-NETTO *et al.* (1991a) quando restauraram a capacidade proliferativa dos linfócitos e a produção de IFN- $\gamma$  ao adicionar rIL-2 humano exógeno em cultura contendo soro de pacientes com LV.

Em nossa casuística, 77% dos pacientes converteram a resposta a IDRM seis meses após o tratamento, vindo ao encontro aos achados ZIJLSTRA & EL HASSAN (1993) onde 80% dos pacientes de sua casuística apresentaram conversão ao IDRM, também, seis meses após o tratamento. Assim, a IDRM não deve ser utilizada como diagnóstico na prática clínica por apresentar sempre resposta negativa na doença ativa bem como em seguimento de paciente para avaliar resposta terapêutica devido apresentar resposta tardia. A IDRM é

utilizada com sucesso em inquéritos epidemiológicos para avaliar prevalência de infecção, fato este documentado por CALDAS *et al* (2001).

Com relação ao perfil de citocinas, o presente estudo revelou que pacientes com LV apresentaram, simultaneamente, concentrações elevadas de IL-10, tanto circulantes como em culturas de CMSP, enquanto o IFN- $\gamma$  foi detectado no plasma em concentração mais elevada ( $515\pm 280$ pg/ml) que em CMSP ( $28\pm 26$ pg/ml), antes do tratamento. A participação da IL-10 na imunodepressão associada à LV tem sido descrita por vários autores. HOLADAY *et al.* (1993a) demonstraram que anticorpos anti-IL-10 revertem o efeito inibitório mediado por células T (CD8+) obtidas de pacientes com LV, além de restaurarem a produção de IFN- $\gamma$  e a proliferação de linfócitos, um efeito melhor observado quando em combinação com anticorpos anti-IL-4. Por outro lado, a adição de IL-10 recombinante à cultura de CMSP, obtida de pacientes curados de LV, suprime a produção de IFN- $\gamma$  e a proliferação de linfócitos (CARVALHO *et al.*, 1994). Além disso, fenômenos evidenciados na LV como a inibição da ativação macrofágica e a ativação policlonal dos linfócitos B são funções inerentes à IL-10 e a outras citocinas tipo Th2 (MOSMANN, 1994). A detecção de níveis elevados de IL-10 durante a fase ativa da LV reforça as evidências de que a mesma está associada à expressão da doença e a imunossupressão que a caracteriza.

As elevadas concentrações de IFN- $\gamma$  no plasma de pacientes com LV, antes do tratamento nos chamaram atenção, pois a maioria dos estudos associa doença ativa à ausência de produção de IFN- $\gamma$ , quando CMSP destes pacientes são estimuladas *in vitro* com antígenos de *Leishmania* (HOLADAY *et al.*, 1993b; CARVALHO *et al.*, 1994). Todavia, em outros estudos já havia sido descritas concentrações elevadas de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no soro de pacientes com doença ativa (CENINI *et al.*, 1993; SUNDAR *et al.*, 1997; MEDEIROS *et al.*, 1998). A

detecção de IFN- $\gamma$  no plasma, antes da terapêutica, pode ser devida à ativação das células que estão seqüestradas no baço ou na medula óssea, principais sítio de replicação da *L.chagasi*, em resposta a alta carga parasitária, enquanto *in vitro* a elevada produção de IL-10 nas culturas de CMSP estimuladas com antígeno de *Leishmania* pode ser mais efetiva no bloqueio à produção de IFN- $\gamma$ , por isso a detecção desta citocina é menor em CMSP do que no plasma.

Uma outra explicação para a detecção de elevadas concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  seria que apesar do IFN- $\gamma$  estar aumentado no plasma dos indivíduos com calazar, citocinas como IL-10 que estão sendo produzidas em altas concentrações devem ter um efeito mais potente sobre as células infectadas pelo parasita, desativando-as. Por isso, o IFN- $\gamma$  não consegue suplantar os efeitos da IL-10. Por outro lado, em resposta à terapêutica, as concentrações de IL-10 plasmática diminuem consideravelmente, contribuindo para o sucesso do tratamento. Ao mesmo tempo, pode estar ocorrendo uma imunomodulação das células T seqüestradas no baço, o que repercutirá na diminuição das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  no pós-tratamento.

Para SUNDAR *et al.*(1997) a produção tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-10 no plasma pode ser devida a vários fatores, entre os quais pode-se citar, presença de uma ou mais infecções subclínicas ou intercorrentes não relacionadas a *Leishmania*, bem como variações regionais incluindo idade e estado nutricional do paciente ou à espécie de *Leishmania*. No nosso estudo não detectamos doenças que pudessem interferir em nossos resultados. Quanto à faixa etária dos pacientes não encontramos diferenças destas citocinas entre crianças e adultos. Em relação à espécie de *Leishmania*, os pacientes estavam infectados por *L.chagasi* e obteve-se resultados semelhantes aos de SUNDAR *et al.*(1997) com *L.donovani*. Por outro lado, realizou-se o teste de atividade biológica do IFN- $\gamma$  através da quantificação da inibição do efeito citopático do vírus da estomatite vesicular (VSV) em células de linhagem humana

Wish comparado com o padrão internacional da Organização Mundial de Saúde (OMS), e o resultado demonstrou bioatividade do IFN- $\gamma$  plasmático.

Estudos utilizando mRNA e ELISA, evidenciaram que CMSPs de pacientes com *L. braziliensis*, quando estimuladas *in vivo* com lisado de *Leishmania* produzem IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-2, bem como TNF- $\alpha$ . Além disso, os autores mostraram que, quando o estímulo era um antígeno de 43kd, havia indução apenas de resposta do tipo Th1, já quando o lisado de antígenos era de *Leishmania*, a indução apresentava um padrão misto de citocinas dos tipos Th1 e Th2. Estes achados sugerem que os pacientes com leishmaniose têm capacidade de produzir ambos perfis de citocinas e que tais perfis dependem, em parte, das propriedades do antígeno apresentado (SKEIKY *et al.*, 1995). A produção de um padrão misto de citocinas através de mRNA já havia sido descrita na LV, com células de linfonodo (GHALIB *et al.*, 1993) de medula óssea (KARP *et al.*, 1993), de CMSP (CARVALHO *et al.*, 1994), ou de baço (KENNEY *et al.*, 1998).

Convém ressaltar que nossos resultados corroboram as evidências de que ambos os perfis de citocinas sejam ativados durante a doença ativa, bem como que o IFN- $\gamma$  plasmático pode ser marcador de resposta terapêutica, pois à medida que havia uma melhora clínica dos pacientes observava-se um declínio das concentrações dessa citocina em 61% dos indivíduos no término do tratamento, e 91% aos 120 dias após o tratamento. O IFN- $\gamma$  endógeno além de marcador de resposta terapêutica pode também regular a resposta leishmanicida dos antomoniais por uma via não relacionada aos mecanismos microbicidas primários dos macrófagos, fato este documentado por meio de estudos experimentais (MURRAY & DELPH-ETIENNE, 2000). Dessa forma, a presença de IFN- $\gamma$  pode ser um bom indicativo clínico para a droga de escolha a ser utilizada no tratamento.



No presente estudo, a produção de TNF- $\alpha$  em cultura de CMSP aumentava significativamente à proporção que os pacientes apresentavam melhora nos parâmetros clínico-laboratoriais. Por outro lado, o TNF- $\alpha$  plasmático não foi detectado, discordando portanto, dos achados de outros autores (BARRAL-NETTO *et al.*, 1991a; SALOMÃO *et al.*, 1996; MEDEIROS *et al.* 1998) em que o TNF- $\alpha$  circulante estava aumentado antes do tratamento e declinava à medida que os pacientes melhoravam. É interessante observar que elevadas concentrações de TNF- $\alpha$  estão presentes paralelamente as elevadas concentrações de IL-10, um potente inibidor da secreção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos. É provável que, apesar do efeito inibitório da IL-10, o intenso parasitismo destas células possibilite a produção de TNF- $\alpha$  e conseqüentemente um certo grau de ativação macrofágica. A explicação para não detecção do TNF- $\alpha$  plasmático pode ser devido à diferença entre os protocolos ou “kits” comerciais para mensuração das citocinas entre os diferentes laboratórios, na sensibilidade do método utilizado ou das características do antígeno. Também não podemos descartar diferenças na amostragem entre os diversos estudos, e na obtenção e armazenamento das amostras.

A concentração de IL-12p40 foi também analisada devido aos múltiplos efeitos biológicos sobre a função das células T e natural killer (NK) (GHALIB *et al.*, 1995). A IL-12 talvez seja mais importante que o IFN- $\gamma$  para o hospedeiro em resposta a *Leishmania*. A produção de IFN- $\gamma$  é predominantemente regulada por IL-12 pela liberação de antígeno presente nas células. A IL-12 é capaz de estimular a ação citotóxica de células T e NK e a diferenciação de células T naive no subtipo Th1 (RIBEIRO DE JESUS *et al.*, 1998). A produção de IFN- $\gamma$  e IL-12p40 em CMSP após terapêutica parece estar associada com o processo de cura e pode desempenhar um importante papel na imunidade contra LV humana. Na doença, a produção tanto de IL-12 como de IFN- $\gamma$  está inibida por IL-10 (GHALIB *et al.*,

1995; RIBEIRO DE JESUS *et al.*, 1998). Em nosso estudo, avaliou-se as concentrações de IL-12p40 no plasma e o resultado foi similar as concentrações de IFN- $\gamma$ , em que a maior detecção aconteceu no dia zero (antes do tratamento), diminuindo consideravelmente no término do tratamento (30 dias). A IL-12p40 e IL-10 no plasma permaneceram detectáveis em mais da metade dos pacientes por mais de 120 dias após o tratamento, não sendo bons marcadores de resposta terapêutica.

Vários estudos vêm demonstrando que CMSPs obtidos de pacientes com LV apresentam diferentes perfis de produção de citocinas *in vitro*. Por exemplo, a IL-10 é detectável no sobrenadante de culturas destas células na fase ativa da doença (HOLADAY *et al.*, 1993), o IFN- $\gamma$  após a recuperação (CARVALHO *et al.*, 1994) bem como TNF- $\alpha$ . Concentrações circulantes destas citocinas no presente estudo revelaram a queda precoce das concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-10, diferindo portanto, dos achados em cultura de CMSP.

Os antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da LV têm atividade anti-*Leishmania*, reduzindo a carga parasitária dos macrófagos. A correlação dos parâmetros de cura utilizados na LV, a redução das concentrações plasmáticas, o aumento em CMSP de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e a redução de citocinas supressoras (IL-10) sugerem que no final do tratamento deve existir eliminação do parasita, podendo ser documentada pela boa resposta terapêutica apresentada pelos pacientes no final do seguimento. Não tivemos casos não responsivos à terapêutica ou recidivas. No entanto, convém analisar o perfil destas citocinas nestes grupos de pacientes. A queda precoce das concentrações de IL-10, observada na maioria dos pacientes com resposta satisfatória à terapêutica poderá ser importante para o sucesso do tratamento na LV, evidência que poderia ser reforçada caso pacientes não responsivos permanecessem com elevadas concentrações desta citocina.

Atualmente, os critérios de cura são essencialmente clínicos, pois não existe um parâmetro sorológico ou imunológico de cura para LV. Porém, existem estudos demonstrando marcadores imunológicos que se relacionam com a resposta terapêutica, como a redução nas concentrações séricas de TNF- $\alpha$  e a redução na quantidade de receptor solúvel para IL-2 (BARRAL-NETTO *et al.*, 1991a, 1991b), sIL-2R e sICAM-1 (SCHRIEFER *et al.*, 1995).

No presente estudo, constatou-se que as concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  que estavam elevadas antes da terapia declinaram consideravelmente com a instituição da terapêutica e melhora clínica dos pacientes, não sendo mais detectados aos 210 dias após o tratamento. Desse modo, concentrações plasmáticas desta citocina poderão nortear o seguimento de pacientes com LV, como marcador de resposta terapêutica. Por outro lado, a correlação dos parâmetros clínico-laboratoriais e a queda das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  no término do tratamento podem servir de parâmetro mais objetivo para a cura da LV tanto em crianças como em adultos. A avaliação desta citocina por meio de um método relativamente simples como ELISA, quando comparado ao estímulo de células *in vitro*, pode constituir-se numa vantagem para ser usado na prática como parâmetro de eficácia terapêutica.

# Conclusões

## 7 CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos propostos e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Os critérios clínicos (aumento progressivo de peso, regressão em 50% da esplenomegalia, diminuição da febre na primeira semana de tratamento, melhora dos parâmetros hematológicos) e o seguimento mensal nos primeiros três meses e trimestral a partir do terceiro mês, comportaram-se como bons parâmetros de cura a médio prazo, além da praticidade e do baixo custo;
2. As concentrações de IgG e IgE não são bons parâmetros como critério de cura da LV, uma vez que ambos os isotipos foram detectados em concentrações elevadas durante todo período de avaliação;
3. A avaliação das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  realizada através do teste de ELISA, pode constituir-se como um bom parâmetro precoce de resposta à terapêutica na LV, em crianças e adultos.

# Referências

---

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, LC.; SCHARTON, T.M.; VIEIRA, L.Q.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**, **263**: 235-237, 1994.
- ALEXANDER, J.; RUSSEL, D. Parasites antigens, their role in protection, diagnosis and scape in the leishmaniasis. **Curr. Trop. Microbiol. Immunol.**, **120**: 43-67, 1985.
- AL-JURAYYAN, N.A.M.; AL AYED, I.H.; AL-NASSER, M. N.S.; AL-MUGEIREN, M.M.A.; BOOHENE, A.G.; AL HERBISH, A.S. Visceral leishmaniasis in infancy and childhood epidemiology and clinicopathological study of 63 cases in Al-Baha Province, Saudi Arabia. **J. Trop. Ped.**, **38**: 12-16, 1992.
- ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S.; GOSWAMI, R.; SAHA, S.; ALI, N. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G IgG, IgM, IgE and IgG subclass antibodies in indian Kala-azar patients after chemotherapy. **Infect. Immun.**, **162**: 6663-6639, 1999.
- ANDRADE, Z.A. Pneumonia intersticial no kala-azar. **Hospital**, **71**: 55, 1959.
- ANDRADE, T.; CARVALHO, E.; ROCHA, R. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **162**: 1354-1359, 1990.
- ARAÚJO SOBRINHO, J., RODRIGUES, M.L.C., GONZAGA, A.A.D., CELINO, A.C.B.L. Aspectos epidemiológicos, laboratoriais e terapêuticos da leishmaniose visceral no hospital Universitário Alcides Carneiro-PB. **Rev. IMIP.**, **13**: 13-16, 1999.
- ATTA, A.M.; D' OLIVEIRA Jr., A.; CORREA, J.; ATTA, M.L.B.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E.M. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marked of active disease in visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **59**: 426-430, 1998.
- ATTA, A.M.; ATTA, M.L.B.; D' OLIVEIRA Jr., A.; ALMEIDA, R. P.; ARAÚJO, M.I.; CARVALHO, E.M. IgG anti-IgE autoantibodies in visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **97**: 101-103, 2002.
- BACELLAR, O.; BRONDSYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C.H.; COFFMAN, R.L.; JOHNSON, W.D.; CARVALHO, E.M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **173**: 1515-1518, 1996.
- BADARÓ, R.; CARVALHO E.M.; ORGE, M.G.O.; TEIXEIRA, R.S.; ROCHA, H. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**: 77-83, 1985.
- BADARÓ, R.; JONES, T.; CARVALHO, E.; SAMPAIO, D.; REED, S.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr, W. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **154**: 1003-1011, 1986.

BADARÓ, R. Editorial. Progressos nas pesquisas de leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina-Bahia 1934-1989. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **21**: 159-164, 1988.

BARRAL, A.; CARVALHO, E.M.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M. Suppression of lymphocyte proliferative response by sera from patients with american visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**: 735-42, 1986.

BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R.; SANTOS, S.; BADARÓ, F.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.; ROCHA, H.; FALCOFF, E.; FALCOFF, R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **163**: 853-857, 1991a.

BARRAL-NETTO, M. BARRAL, A., SANTOS, S.B., CARVALHO, E.M., BADARÓ, R., CARVALHO, L.C.P., ROCHA, H., REED, S.G., JOHNSON Jr., W.D. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum mediated suppression in human visceral leishmaniasis: Role of IgG and soluble interleukin-2 receptor. **J. Immunol.**, **147**: 281-284, 1991b.

BENHASSINE, M.; MOKRANI, T.; BENYAHIA, B.; BENDISSARI, K.; KEDDARI, M.; KHATI, B. Apport de la biopsie duodenale dans le diagnostic du Kala-azar. **Arch. Inst. Pasteur Tunis**, **55**: 125-130, 1986.

BERMAN, J. Chemoterapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **J. Infect. Dis.**, **10**: 560-586, 1988.

BEURIA, M.K.; PARKASI, O.; JOSIH, B.; MOHANTY, K.K.; KATOCH, K.; SEN GUPTA, U. Levels of IgG subclasses in active cases in the disease spectrum of leprosy. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **115**: 61-6, 1998.

BITTENCOURT, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: DOEER, W. **Tropical Pathology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 597-651.

BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with IFN-gamma, but not with IL-4, activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.** **20**: 1131-1135, 1990.

BORGES, V.C.; RUIZ, M.C.M.; GOMES, P.M.; COLOMBO, A.D.; 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, 2002.

BLOOM, W.; LIEBSTER, L.; ABBAS, K.; TITUS, R. Patterns of secretion in murine leishmaniasis: correlation with disease progression or resolution. **J. Immunol.**, **20**: 1131-1135, 1990.

BRANDÃO, A.A.R. leishmaniose visceral no Maranhão. Relato de caso. **Rev. Soc. Parasitol. Doenças Trop.**, **11**: 95-99, 1974.



BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 122 p.

CALDAS, A.J.M.; SILVA, D.R.C.; PEREIRA, C.C.R.; NUNES, P.M.S.; SILVA, P.S.; SILVA, A.A.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L. Infecção por *Leishmania(Leishmania)chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis-MA, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **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. Med. Hyg.**, **96**: 21-28, 2002.

CAMPOS JUNIOR, D. Características clínico-epidemiológicas do calazar na criança. Estudo de 75 casos. **J. Pediatr.**, **71**: 261-265, 1995.

CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S; GRUMACH, A.S. **Alergia e imunologia em pediatria**. São Paulo: SARVIER, 1992. p. 261.

CARVALHO, E.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR, W.D. Cell mediated immunity in american visceral leishmaniasis: reversible immune suppression during acute infection. **J. Immunol.**, **33**: 498-502, 1981.

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**: 2066-9, 1985.

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

CARVALHO, E.M; 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. donovani chagasi*. **J. Infect. Dis.**, **165**: 535-540, 1992.

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

CARVALHO, S. F. G. **Utilização de baixas doses de desoxicolato de Anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral em crianças e adolescentes**. 2000. 108 f. (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CENINI, P.; BERHE, N.; HAILU, A.; MCGINNES, K.; FROMMEL, D. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **J. Infect. Dis.**, **168**: 986-93, 1993.

CERF, B.J.; JONES, T.C.; SAMPAIO, D.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **156**: 1030-1033, 1987.

CHULAY, J.S.; BRYCESSON, A. D.M. Quantification of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**: 475-479, 1983.

CHUNGE, C.N; OWATE, J.; PAMBA, O.H.; DONNO, L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **84**: 221-225, 1990.

COSTA, J. M.; VIANA, G.; SALDANHA, A.; NASCIMENTO, M.; ALVIM, A.; BURATTINI, M.; SILVA, A. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cad. Saude Publ.**, **11**:321-324, 1995.

COSTA, C.H; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil (1980-1986). **Rev. Saude Publ.**, **24**: 361-372, 1990.

DEL PRETE, G.; DE CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F; GINDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; ROMOGNANI, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **J. Immunol.**, **150**: 353-360, 1993.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody response of dogs to *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **17**: 451-458, 1995.

DUARTE, M.; CORBETT, E. Leishmaniose visceral. In: BRASILEIRO FILHO, G.; PITTELLA, J.; PEREIRA, F.; BAMBIRRA, E.; BARBOSA, A. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. v. 5, p. 1150-1163.

DUARTE, M.; MATTA, V.; CORBETT, C.; LAURENTI, M.; CHEBABO, R.; GOTO, H. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **83**: 73-76, 1989.

EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA, J.M; McAULLIFE, I.T.; LOPES, U.G.; PEARSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, **166**: 1124-1132, 1992.

FINKELMAN, F.D.; KATONA, I.M.; RUBAN, J.J.F.; SNAPPER, C.M.; OHARA, J.; PAUL, W.E. Suppression of in vivo polyclonal IGE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **83**: 9675-9678, 1986.

FINKELMAN, F.D.; KATONA, I.M.; MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune response. **J. Immunol.**, **140**: 1022-1027, 1988.

FIQUENE, M.S.F. Analogias parasitárias, novo tratamento de leishmaniose. **Rev. Maranhão Med.**, **2**: 9-18, 1964.

GAMA, M.E.A.; BARBOSA, J.S.; PIRES, B.; 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, tem sobre leishmaniose visceral, estado do Maranhão, Brasil. **Cad. Saude Publ.**, **14**: 109-118, 1998.

GAMA, M.E.A. **Perfil clínico e laboratorial da forma oligossintomática da leishmaniose visceral americana**. 2001. 100 f. Tese (Doutorado em Patologia)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GARCÊS, J. Bacterial infection as a presenting manifestation of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **12**: 518-519, 1990.

GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SKEIKY, Y.A.W.; SIDDIG, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; RUSSO, D.M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, **92**: 324-329, 1993.

GHALIB, H. W.; WHITTLE, J.A.; KUBIN, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A. M.; GRABSTEIN, H.K.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J. Immunol.**, **154**: 4623-4629, 1995.

GREEN, S.J.; CHELLER, L.F.; MARLETTA, M.A.; SEGUIN, M.C.; KLOTZ, FW, SLAYTER, M.; NELSON, B.J.; NACY, C.A. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunol. Lett.**, **43**: 87-94, 1994.

GRIMALDI JUNIOR, G.; THESH, R.; McMAHON-PRAT T, D. Review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **41**: 687-725, 1989.

GUERREIRO, J; RIBEIRO, S.; CARVALHO, E.; BADARÓ, R.; ROCHA, H. Infecção bacteriana em pacientes portadores de leishmaniose visceral. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **80**: 447-452, 1985.

HOHENSCHILD, S.; FELDMIEIER, H. Imported kala-azar in children and adults comparison of medical history, clinical and diagnostic findings. **J. Trop. Pediatr.**, **41**: 378-379, 1995.

HOLADAY, B.J.; POMPEU, M.M.L.; JERONIMO, S.; TEIXEIRA, M.; DE QUEIROZ, S.A.; VASCONCELOS, R.; PEARSON, R.D.; ABRAMS, J.S.; LOCKSLEY, R.M. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala-azar. **J. Clin. Invest.**, **92**: 2626-2632, 1993a.

HOLADAY, B.J.; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.; BRAGA, D.N.M.; TEIXEIRA, M.J.; SOUSA, A.Q.; SADICK, M.D.; VASCONCELOS, A.W.; ABRAMS, J.S.; PEARSON, R.D.; LOCKSLEY, R.M. Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, **167**: 411-417, 1993b.

HOLADAY, B. Role of CD8+ cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **95**: 217-20, 2000.

HUSSAIN, R.; DOCKELL, H.M.; E CHIANG, T.J. IgG subclass antibody to *Mycobacterium leprae* 18000 MW antigen is restricted to IgG1 and IgG3 in leprosy. **Immunol.**, **83**: 495, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Município de São Luís: informações básicas**. São Luís, 1998. p. 9

ISAM, A.E.; EDWAIRD, E.Z.; MOHAMED, S.A.; HASHIM, W.G.; MARIA, M.H.S.; BUSHRA, E.; AHMED, M.E. Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta. **Am. J. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **46**: 57-62, 1992.

JOSÉ, F.F.; SILVA, I.M.; ARAÚJO, M.I.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**: 537-542, 2001.

KARP, C.L.; EL-SAFI, S.H.; WYNN, T.A.; SATTI, M.M.H.; KORDOFANI, A.M.; HASHIM, F.A.; HAG-ALI, M.; NEVA, F.A.; NUTMAN, T.B.; SACKS, D.L. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar: marked elevation of both interleukin 10 and interferon-gamma. **J. Clin. Invest.**, **91**: 1644-1648, 1993.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **J. Immunol.**, **153**: 4948-4958, 1994.

KENNEY, R.T.; SACKS, D.L.; GAM, A.A.; MURRAY, H.W. Splenic cytokine responses in indian kala-azar before and after treatment. **J. Infect. Dis.**, **177**: 815-819, 1997.

KING, C.L.; NUTMAN, T.B. IgE and IgG subclasses regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminthic infections. Assessment by B cell precursor frequencies. **J. Immunol.**, **151**: 458-465, 1993.

LACERDA, M. The brazilian leishmaniasis control program. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **89**: 484-495, 1994.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.; TYAN, L.; PÓVOA, M.M.; ISHIKAWA, E.A.Y. **A leishmania e as leishmanioses. Instituto Evandro Chagas-50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e a Medicina Tropical**. Belém: Ministério da Saúde, Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. v.1, p. 83-124.

LAURENTI, A. **Aspectos patogênicos da resposta inflamatória aguda induzida experimentalmente em *Mesocricetus auratus* pele inoculação subcutânea de *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 1993. 120f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, M.J.; RIÇA CAPELA, M.J.; ABRANTES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 273-284, 2001.

- LIEW, F.; O'DONNELL, C. Immunology of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, **32**: 162-222, 1993.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chemistry**, **193**: 245, 1951.
- MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M.; PICCINNI, M.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1- specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. **J. Exp. Med.**, **177**: 1199-1204, 1993.
- MANSON-BAHR, P.E.C.; HEICH, R.B. Studies in leishmaniasis in East Africa. III. Clinical features and treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **50**: 465, 1956.
- MANSON-BAHR, P.E.C. Immunity in kala-azar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **55**: 550, 1961.
- MARSDEN, P.D. Old drugs for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**: 187-198, 1985.
- MARZOCHI, M.C.A.; SABROZA, P.C.; TOLEDO, L.M.; MARZOCHI, K.B.; TRAMONTANO, N.C.; RANGEL-FILHO, F.B. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saude Publ.**, **1**: 5-17, 1985.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saude Publ.**, **10**: 359-375, 1994.
- MEDEIROS, I.M.; CASTELO, A.; SALOMÃO, R. Presence of circulating levels of interferon- $\gamma$ , interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **40**: 31-34, 1998.
- MISH, M.; BISWAS, U.K.; JHA, D.N.; KHAN, A.B. Amphoterecin B for second-line treatment of Indian kala-azar. **Lancet**, **337**: 926, 1990.
- MOLL, H.; FUCS, H.; BLANK, C.; HOFMAN. Langerhans cells transport *Leishmania major* from infected skin to the draining lymph node presentation to antigen-specific T cells. **J. Immunol.**, **23**: 1595-1601, 1993.
- MONTEIRO, P.S.; LACERDA, M.N.; ARIAS, R.R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **27**: 187, 1994. Suplemento III.
- MORAES, C.; TOPYLA, V.S.; PAES, R.A.; CURY, A.F.; TEDESCO, J.J.A. Leishmaniose visceral durante a gestação: relato de caso. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, **17**: 667-669, 1995.
- MORRIS, S.C.; MADEN, K.B.; ADAMOVICZ, J.J.; GAUSE, W.C.; HUBBARD, B.R.; GATELY, M.K.; FINKELMAN, E.D. Effects of IL-12 on *in vivo* cytokine gene expression and Ig isotype selection. **J. Immunol.**, **152**: 1047-1056, 1994.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. Two types of Mouse helper T- cell clone- implications for immune regulation. **Immunol. Today**, **8**: 223-227, 1987.

MOSMANN, T.R. Proprieties and functions of interleukin-10. **Advanc. Immunol.**, **138**: 1-26, 1994.

MUGAI, R.; GATEI, D.; SHAUNAK, S.; WOZNOAK, A.; BRYCESON, A. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. **Lancet**, **2**: 476-479, 1983.

MURRAY, H. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I- correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. **J. Immunol.**, **129**: 344-350, 1982.

MURRAY H.W.; NATHAN, C.F. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.**, **189**: 741-746, 1999.

MURAY, H.W.; DEL-ETIENNE, S. Role of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **68**: 288-293, 2000.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; ALCANTARA-NEVES, N.M.; MUNIZ, M.E.B.; NUNES, S.F.; PARANHOS, M.; CARVALHO, L.C.P. Introduction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **87**: 91-93, 1993.

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

NEVES, J. **Tratamento da leishmaniose visceral americana pelo antimoniato de N-metilglucamina. Subsídio para o conceito de cura.** 1963. 100 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de Minas Gerais, Minas Gerais.

NEOOY, A.B.; NANDY, A.; GHOSH DASTIDAR, B.; CHOWDHURY, A.B. Antibody kinetics in kala-azar in response to treatment. **Trop. Med. Parasit.**, **81**: 727-729, 1987.

NIKUNDI, P.M.; MUIGAI, R.; WERE, J.B.O.; OSTER, C.N.; GACHIHI, G.S.; KIRIGI, G. Congenital visceral leishmaniasis: case report. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **82**: 564, 1993.

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

PRATA, A. Quadro clínico e laboratorial do calazar. **Arq. Bras. Med. Naval**, **65**: 12-260, 1957.

- PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MODLIN, R.L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J. Clin. Invest.** **91**: 1390-1395, 1993.
- REED, S.G.; BADARÓ, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E.M.; LORENZO, R.; LISBOA, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.; JONES JR., T.C. Selection of a skin test antigen for american visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**: 79-85, 1986.
- REINER, S.L.; ZHENG, S.; CORRY, D.B.; LOCKSLEY, R.M. Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR. **J. Immunol. Methods**, **175**: 275, 1994.
- REBÊLO, J.M.M.; MENDES, W.A.; COSTA, J.M.L.; CAVALEIRO, N. Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia* França, 1924 (*Psychodidae*, *Phlebotominae*) do estado do Maranhão, Brasil. **Cad. Saude Publ.**, **12**: 545-549, 1996.
- RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**: 143-148, 1998.
- RODRIGUES DA SILVA, J. **Leishmaniose visceral (calazar)**. 1957. Tese (Cátedra)-Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro. Serviço Nacional de Educação Sanitária.
- RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; ULRICH, M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with american cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasite Immunol.**, **18**: 341-345, 1996.
- SALGADO FILHO, N.; FERREIRA, T.M.A.F.; COSTA, J.M.L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **36**: 217-221, 2003.
- SATTI, I.; EL HASSAN, A.; KHALIL, E. T A.G.; AKUFFO, H. The effect of repeated leishmanin skin testing on the immune responses to *Leishmania* antigen in healthy volunteers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **96**: 565-567, 2002.
- SALOMÃO, R.; CASTELO FILHO, A.; MEDEIROS, I.; SICOLO, M. Plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with visceral leishmaniasis: association with activity of the disease and clinical remission following antimonial therapy. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38**: 113-118, 1996.
- SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L.C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, **154**: 5320-5330, 1995.
- SCHRIEFER, A.; BARRAL, A.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M. Serum soluble markers in the evaluation of treatment in human visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **102**: 535-540, 1995.

- 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.; MIRANDA, J.C. Is vector and reservoir control possible from visceral leishmaniasis? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **25**:84, 1992.
- SHIDDO, S.A.; HULDT, G.; NILSSON, L-A.; OUCHTERLONY, R.; THORSTENSSON, R. Visceral leishmaniasis in Somalia. Significance of IgG subclasses and of IgE response. **Immunol. Lett.**, **50**: 87-93, 1996.
- SILVA, A.; VIANA, G.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M.; COSTA, J. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. Evolução e perspectivas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30**: 359-368, 1997.
- SILVEIRA, F.T.; PINGARRILHO, D.A.; DUARTE, R.R.; GABRIEL, M.D.; DIAS, M.G.; MOURA, M.P.; BRAGA, M.E.; PRESTES, E.X.; MAUÉS, B.C. Avaliação de três esquemas terapêuticos com o antimoniato de N-metil-glucamina no tratamento da leishmaniose visceral no estado do Pará-Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **35**: 177-181, 1993.
- SILVEIRA, F.T.; COSTA, D.P.; MARQUES, K.C.C.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J.J.; MORAES, M.A.P. Leishmaniose visceral na gravidez: isolamento de *L. chagasi* da placena humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **27**:250, 1993. Suplemento I.
- SKEIKY, Y.A.W.; GUDERIN, J.A.; BENSON, D.R.; BACELAR, O.; CARVALHO, E.M.; KUBIN, M.; BADARO, R.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood monuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. **J. Exp. Med.**, **181**: 1527-1537, 1995.
- SNAPER, C.M.; MCINTYRE, T.M.; MANDLER, R.; PECANHA, L.M.T.; FINKELMAN, F.D.; LEES, A.; MOND, J.J. Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. **J. Exp. Med.**, **175**: 1367-1371, 1992.
- SOKAL, J.E. Editorial: measurement of delayed skin-test response. **New England J. Med.**, **297**: 501-502, 1975.
- SOLANO-GALLEGO, L., RIERA, C., ROUCA, X., INIESTA, L., GALLEGO, M., VALLADARES, J.E., FISA, R., CASTILLEJO, S., ALBEROLA, J., FERRER, L., ARBOIX, M., PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific igG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas evolution in the course of infection and after treatment. **Vet. Parasitol.** **96**: 265-276, 2001.
- SUNDAR, S.; REED, S.G.; SHARMA, S.; MEHROTRA, A.; MURRAY, H.W. Circulating T helper 1(Th1) cell- and Th2 cell- associated cytokines in indian patients with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **56**:522-525, 1997.
- THAKUR, C.P.; KUMAR, P.; MISHA, B.N.; PANDEY, A.K. Rationalization of regimes of treatment of kala-azar with sodium stibogluconate in India: a randomized study. **Br. Med. J.**, **296**: 1557-1561, 1988.



THAKUR, C.P.; SINHA, G.P.; SHARMA, V.; BARAT, D. The treatment of kala-azar during pregnancy. **Nat. Med. J. India**, **6**: 263-269, 1993.

THAKUR, C.P.; SINGH, S.M.; HASSAN, R.K.; NARIN, S.; KUMAR, A. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **93**: 319-328, 1999.

TRINCHIERI, G. Role of interleukin-12 in human Th1 response. **Chem. Immunol.**, **63**: 14-29, 1996.

VERONESI, R., JAMRA, M., SILVA, O.R.S., FIORILLO, A., CRUZ, O. Leishmaniose visceral (Kala-Azar). Estudo do quadro clínico, hematológico e eletroforético. **Rev. Hosp. Clin.**, **9**: 13, 1954.

VIANA, G.M.C.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; VIANA, M.G.C.; BURATTINI, M.M. transmissão congênita do calazar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**:247, 2001. Suplemento I.

VIEIRA, J.B.F. ; COELHO, G.E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**:85-92, 1998. Suplemento II.

WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, M.; RONCAROLO, G.; VELDE, A.; FIGDOR, G.; VRIES, E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.**, **174**: 915, 1991

WERNECK, G.L; RODRIGUES JUNIOR, L; SANTOS, M.V; ARAÚJO, I.B; MOURA, L.S; LIMA, S.S; GOMES, R.B.B; MAGUIRE, J.H; COSTA, C.H.N. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop.**, **83**: 13-18, 2002.

WHITE JUNIOR, A.; CASTES, M.; GARCIA, L.; TRUJILLO, D.; ZAMBRANO, L. *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **46**: 123-131, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. **WHO Techn. Rep. Ser.**, 1990. p. 793.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Geographical distribution, May,2000.

ZIJLSTRA, E.E.; SIDDIG ALI, M.; EL-HASSAN, A.M.; EL-TOURM, I.A.; SATTI, M.; GHALIB, H.W. Clinical aspects of kala-azar in children from the Sudan: a comparison with the disease in adults. **J. Trop. Pediatr.**, **38**: 17-21, 1992.

ZIJLSTRA, 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. Med. Hyg.**, **87**: 425-427, 1993.

# Apêndice

## APÊNDICE

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

### **TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. A pesquisa intitulada **“Marcadores precoces de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral humana em crianças e adultos”**, sob coordenação da Profa. Arlene de Jesus Mendes Caldas (telefone: 227-8519) tem como objetivo avaliar os aspectos clínico-laboratoriais e marcadores precoces de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral, em crianças e adultos antes do tratamento, no término e após o tratamento.

A leishmaniose visceral (calazar) é uma doença que acomete tanto crianças como adultos na Ilha de São Luís–MA e por isso é necessário realizar pesquisas que possam ajudar a diminuir o número de doentes bem como o número de óbitos. Serão realizados exame físico e alguns exames laboratoriais (hemograma e dosagens de citocinas), para isso é necessário coletar 20 ml de sangue, além da coleta de fezes para o exame parasitológico. Será realizado também, o exame anti-HIV para investigar a presença de Aids. Um teste no antebraço (IDRM) será realizado para investigar a resistência do paciente a doença. Pode no momento da punção venosa e do teste sentir dor na picada da agulha. Fica claro que as pessoas envolvidas nessa pesquisa não terão sua identidade revelada, o paciente, os pais ou responsáveis terão total liberdade de autorizar ou não a participação nesta pesquisa, sem

nenhum prejuízo, bem como de ser respeitada a decisão de sair da pesquisa a qualquer momento se assim desejar. Além disso, o sigilo das informações será garantido. Serão garantidos o tratamento e acompanhamento dos pacientes.

Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão pelo telefone 219-1092 ou no endereço: Rua Barão de Itapary, 227 Centro, São Luis-MA. O Coordenador do Comitê é o Prof. Dr. Raimundo Antonio da Silva.

Assim sendo, pergunto-lhe da sua decisão em autorizar a participação e do seu consentimento para a divulgação dos dados obtidos.

Declaro ter lido ou ouvido e entendido as explicações que foram apresentadas em relação à pesquisa e informo estar ciente do seguinte:

1 – Concordo, de livre e espontânea vontade, deixar participar o menor ou participar (adulto), sob a minha responsabilidade no estudo acima mencionado.

2 - Que a participação do menor ou minha participação compreende a aplicação do teste cutâneo de Montenegro (IDRM), coleta de sangue para os exames: sorológico de ELISA, hemograma, citocinas e anti-HIV, e exame físico.

DATA \_\_\_\_\_

RESPONSÁVEL \_\_\_\_\_

# Anexos

---

## ANEXO I- Ficha Protocolo

### FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Data de Preenchimento \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Nº de Registro \_\_\_\_\_

#### A- IDENTIFICAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_ Apelido: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_

Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Endereço atual: \_\_\_\_\_

Endereço para contato: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

#### B- EPIDEMIOLOGIA

Local provável de contágio: \_\_\_\_\_

Reside em área de risco: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Existem cães no domicílio/peri-domicílio: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Existem raposas/gambas nas proximidades: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Existem animais doentes nas proximidades: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Existem mosquitos no domicílio/peri-domicílio: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Número de familiares em casa (Excluir paciente): \_\_\_\_\_

Localidades freqüentadas nos últimos 12 meses

MUNICÍPIO / UF	MÊS / ANO	TEMPO

#### C- ANTECEDENTES MÓRBIDOS PESSOAIS

História anterior de calazar: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim: Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Droga: \_\_\_\_\_

Dose: \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_\_ Onde tratou \_\_\_\_\_

**D- ANTECEDENTES MORBIDOS FAMILIARES**

História anterior de calazar: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim: Quem? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

**E- HISTÓRIA CLÍNICA**

Início da doença: \_\_\_\_\_

Sinais e sintomas: \_\_\_\_\_

Febre: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim, caracterizar: \_\_\_\_\_

Queda de cabelos/pelos: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Anorexia: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Diarréia: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim, caracterizar: \_\_\_\_\_

Vômitos: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Sangramentos: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim, caracterizar: \_\_\_\_\_

Tosse: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Dispnéia: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Aumento de volume abdominal: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Outros sintomas: \_\_\_\_\_

**F- EXAME FÍSICO**

P.A: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Pulso: \_\_\_ T.A: \_\_\_ F.R: \_\_\_ Pcs: \_\_\_ Alt. \_\_\_

Estado geral: ( ) 1- Bom ( ) 2. Regular ( ) 3- Comprometido

Estado de Hidratação ( ) 1. Normal ( ) 2- Desidratado grau I

( ) 3. Desidratado grau II ( ) 4- Desidratado grau III

Emagrecido ( ) 1- Sim 2. Não

Febril ( ) 1- Sim 2. Não

Mucosas: ( ) 1. Normocoradas ( ) 2. Hipocoradas+/4+ ( ) 3. Hipocoradas++/4+

( ) 4. Hipocoradas+++/4+ ( ) 5. Hipocoradas ++++/4+

Ictérico: ( ) 1- Sim 2. Não

Alopecia: ( ) 1- Sim 2. Não

Manchas: ( ) 1- Sim 2. Não

Sangramento: ( ) 1- Sim 2. Não

Adenomegalia: ( ) 1- Sim 2. Não

Caso sim: Localização: ( ) 1. Subocciptal ( ) 2. Submandibular

( ) 3. Inguinal ( ) 4. Retroauricular  
 ( ) 5. Retrocervical ( ) 6. Axilar

Características: ( ) 1. Isolados ( ) 2. Normal  
 ( ) 3. Agrupados ( ) 4. Amolecidos  
 ( ) 5. Coalescentes ( ) 6. Endurecidos

Protusão Abdominal: ( ) 1- Sim 2. Não

Hepatomegalia: ( ) 1- Sim 2. Não

Caso Sim: \_\_\_\_\_ cm RCD \_\_\_\_\_ cm Apêndice Xifóide

Esplenomegalia: ( ) 1- Sim 2. Não

Caso Sim: \_\_\_\_\_ cm RCE

Edema

Caso Sim, caracterizar: \_\_\_\_\_

Alterações Ap. Cardio Vascular: ( ) 1- Sim 2. Não

Caso sim, especificar: \_\_\_\_\_

Alterações Ap. Respiratório: ( ) 1- Sim 2. Não

Caso sim, especificar: \_\_\_\_\_

Alterações Sist. Nervoso Central: ( ) 1- Sim 2. Não

Caso sim, especificar: \_\_\_\_\_

Outras alterações: ( ) 1- Sim 2. Não

Caso sim, especificar: \_\_\_\_\_

## G- TERAPÊUTICA

Usou ou está em uso de droga específica: ( ) 1- Sim 2. Não ( ) 9- Ignorado

Caso sim, Qual: \_\_\_\_\_

Dose ? Número de ampolas (Total e por dia): \_\_\_\_\_

Tempo se Uso: \_\_\_\_\_ Início do Tratamento: \_\_\_\_\_

Ocorreu internação durante a doença atual: ( ) 1- Sim 2. Não ( ) 9- Ignorado

Caso sim. Há quanto tempo/Por quanto tempo: \_\_\_\_\_ onde: \_\_\_\_\_

**CONDUTA:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_



**H- EXAMES LABORATORIAIS**

<b>DATA</b>				
<b>EXAMES</b>				
<b>HEMÁCIAS</b>				
<b>HEMOGLOBINA</b>				
<b>HEMATÓCRITO</b>				
<b>LEUCOCITOS</b>				
<b>META</b>				
<b>BASTÕES</b>				
<b>SEGMENTADOS</b>				
<b>EOSINÓFILOS</b>				
<b>LINFÓCITOS</b>				
<b>MONÓCITOS</b>				
<b>PLAQUETAS</b>				
<b>T.PROTROMBINA</b>				
<b>TGO/TGP</b>	/	/	/	/
<b>UREIA</b>				
<b>CREATININA</b>				
<b>GLOBULINA</b>				
<b>GLICEMIA</b>				
<b>MIELOGRAMA</b>				
<b>SOROLOGIA</b>				
<b>LEISHMANINA</b>				
<b>EKG</b>				
<b>VEL. HEMOSSED.</b>				
<b>OUTROS</b>				

**I – EVOLUÇÃO CLÍNICA**

Regressão da Febre: ( ) 1- Sim 2. Não ( ) 9- Ignorado

Caso sim, Quantos dias após o início do tratamento: \_\_\_\_\_ caso Não,

Descreva a febre: \_\_\_\_\_

	DIAS DE TRATAMENTO / DATA			MESES APÓS TRATAMENTO / DATA				
	Dia (0) /	Dia 10 /	Dia 20 /	1 <sup>o</sup> /	2 <sup>o</sup> /	3 <sup>o</sup> /	5 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>
<b>QUEIXAS</b>								
Peso (Kg)								
Palidez (em cruces)								
Fígado (cm)	___ RCD ___ AX	___ RCD ___ AX	___ RCD ___ AX	___ RCD ___ AX	___ RCD ___ AX	___ RCD ___ AX	___ RCD ___ AX	___ RCD ___ AX
Baço (cm)	RCE	RCE	RCE	RCE	RCE	RCE	RCE	RCE
Intercorrências								
Conduta								

Reg. 00170  
 C P q G M  
 Biblioteca

## ANEXO II- DADOS LABORATORIAIS (Valores de referência)

EXAMES	Crianças	Adultos
Eritrócitos	3.8 a 5.2 milhões/mm <sup>3</sup>	4.6 a 6.2 milhões/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	10.3 a 13.5 g/dl	14.0 a 17.0 g/dl
Hematócrito	32 a 40 %	40 a 54 %
Leucócitos	5000 a 10000/mm <sup>3</sup>	5000 a 10000/mm <sup>3</sup>
Segmentados	27 a 54%    1350 a 6200/mm <sup>3</sup>	54 a 62%    2700 a 6200/mm <sup>3</sup>
Eosinófilos	1 a 3%    50 a 400/mm <sup>3</sup>	1 a 4%    50 a 400/mm <sup>3</sup>
Linfócitos	32 a 55%    1600 a 3900/mm <sup>3</sup>	22 a 33%    1100 a 3300/mm <sup>3</sup>
Plaquetas	150.000 a 400.000/mm <sup>3</sup>	150.000 a 400.000/mm <sup>3</sup>
Uréia	10 a 50 mg/dl	10 a 50 mg/dl
Creatinina	0.4 a 1.3 mg/dl	0.4 a 1.3 mg/dl
AST	12 a 46 U/I (37C)	12 a 46 U/I (37C)
ALT	3 a 50 U/I (37C)	3 a 50 U/I (37C)
VHS	4 a 7 mm 1ª hora	4 a 7 mm 1ª hora
Globulina	0.70 a 1.50 g/dl	0.70 a 1.50 g/dl
Albumina	3.20 a 5.00 g/dl	3.20 a 5.00g/dl
Glicemia	70 a 110 mg/dl	70 a 110 mg/dl

Sistema Automatizado CELLDYN 4000 (Laboratório Cedro, São Luis-MA, 2002) .

### ANEXO III – Níveis de IgG em g/l

IDADE	IgG (variação)	IgG1 (variação)	IgG2 (variação)	IgG3 (variação)	IgG4 (variação)
0-2 meses	750-1.510	2.18-4.96	0.40-1.67	0.04-0.23	<0.01-0.03
3-5 meses	282-940	1.43-3.94	0.23-1.47	0.04-0.23	<0.01-0.14
6-8 meses	330-1.510	1.90-3.88	0.37-0.60	0.12-0.62	<0.01
9 meses-2anos	410-1.630	2.86-6.80	0.30-3.27	0.13-0.82	<0.01-0.65
3-4 anos	610-1.610	3.81-8.84	0.70-4.43	0.17-0.90	<0.01-1.16
5-6 anos	630-2.000	2.92-8.16	0.83-5.13	0.08-1.11	<0.01-1.21
7-8 anos	750-1.780	4.22-8.02	1.13-4.80	0.15-1.33	<0.01-0.8
9-10 anos	660—2.120	4.56-9.38	1.63-5.13	0.26-1.13	<0.01-1.21
11-12 anos	660-2.120	4.56-9+52	1.47-4.93	0.12-1.79	<0.01-1.68
13-14 anos	660-2.120	3.47-9.93	1.40-4.40	0.23-1.17	<0.01-0.83
Adultos	830-2.040	4.22-12.92	1.17-7.47	0.41-1.29	<0.01-2.91

NASPITZ *et al.* Níveis de imunoglobulinas séricas em adultos e crianças normais brasileiras nos diferentes períodos etários. **J. Pediat., 52:** 121, 1982.

**Anexos**  
**Produção 2000/2003**



## Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case report

Arlene J.M. Caldas<sup>a,\*</sup>, Jackson M.L. Costa<sup>a</sup>, Mônica E.A. Gama<sup>a</sup>,  
Eduardo A.G. Ramos<sup>b</sup>, Aldina Barral<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathology, Nucleus of Tropical Pathology and Social Medicine, Federal University of Maranhão, Praça Madre Deus No 2 (Bairro Madre Deus), CEP 65 025 560, São Luís, MA, Brazil

<sup>b</sup> Gonçalo Moniz Research Centre, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Bahia, Brazil

Received 31 January 2003; received in revised form 17 April 2003; accepted 7 May 2003

### Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is endemic in the island of São Luís, State of Maranhão, Brazil. Despite an increase in the number of VL cases, the frequency of the disease is low among pregnant women. We present here the case of a pregnant woman followed up by our group, who was treated with amphotericin B with excellent outcome.

© 2003 Published by Elsevier B.V.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis; *Leishmania chagasi*; Pregnancy

### 1. Introduction

American visceral leishmaniasis (AVL, kala-azar) is endemic in 18 (66.7%) states of Brazil and mainly affects children aged less than 5 years, with clear spreading throughout the country. Most cases have been reported in the north-eastern Brazilian states, including Bahia, Piauí, Ceará and Maranhão (FNS, 1996; Vieira and Coelho, 1998). In Maranhão, the main problem area is its capital São Luís, where 75% of notified cases are concentrated (Vieira and Coelho, 1998).

The occurrence of VL in Brazil is associated with the precarious socio-economic conditions of

communities. Dry periods that periodically hit the semi-arid North-east lead to human migration to the large centres, increasing the susceptibility of individuals to *Leishmania chagasi* infection and, in turn, the number of cases of the disease in this area, among them women of fertile age, with maternal–foetal implications (WHO, 1990; Silveira et al., 1993; Caldas et al., 2001).

In Brazil, four cases of VL in pregnant women have been reported, three of them from the Northeast (Moraes et al., 1995; Viana et al., 2001) and one from the North (Silveira et al., 1993). Despite an increase in the number of VL cases, the frequency of the disease is low among pregnant women. We present here the case of a woman followed up by our group, who was treated with amphotericin B with excellent outcome.

\* Corresponding author. Fax: +55-98-222-5135.

E-mail addresses: [ajmc@elo.com.br](mailto:ajmc@elo.com.br) (A.J.M. Caldas), [jcosta@cpqgm.fiocruz.br](mailto:jcosta@cpqgm.fiocruz.br) (J.M.L. Costa).

## 2. Case report

Patient J.C.C., a 17-year-old girl from Cidade Olímpica (neighbourhood at the periphery of São Luis, MA), with a 2 month history of intermittent fever associated with cutaneous paleness, weight loss, vomiting and anorexia, sought medical assistance at an emergency service where she received symptomatic medication and blood transfusion.

With the signs and symptoms described above, the patient was seen at the Infectious and Parasitic Diseases Outpatient Clinic, Nucleus of Tropical Pathology, Federal University of Maranhão (UFMA). Physical examination revealed a regular general condition, hydration, weight loss, and hypostained mucosae (++/4+), with small, motile, soft and painless ganglia being palpable in the submandibular and retrocervical chains. An enlarged liver (4.5 cm from the right costal margin and 8.5 cm from the xiphoid appendix) with smooth borders, a soft palpable spleen (6 cm from the left costal margin) and occupied Traube's space were observed. In addition, an increase in uterine volume suggestive of pregnancy was noted which was confirmed by the determination of human chorionic gonadotropin (105 913 mIU/ml). Ultrasonography of the inferior abdomen showed foetal vitality. It was the first pregnancy of the patient, with a period of evolution of 3 months.

The diagnosis of VL was confirmed at Mother–Infant University Hospital of UFMA by specific exams (indirect immunofluorescence, IIF—a titre of 1:320, and aspiration of bone marrow showed the presence of the amastigote forms of *Leishmania*), where she was admitted and treated with amphotericin B at the dose of 1 mg/kg per day for 14 days, with a good clinical response. Control exams were carried out during hospitalisation and after discharge (Table 1), and the electrocardiogram showed normal patterns. The patient was followed up after treatment at 3-month intervals for 12 months.

### 2.1. Evolution

Fever regressed on the third day of drug treatment and the other symptoms disappeared

between the sixth and eighth day. The intradermal Montenegro reaction was positive 10 months after treatment. Cytokine determination revealed decreasing tumour necrosis factor and interleukin 10 levels after institution of treatment, while interferon gamma levels increased.

During the prenatal period the patient was submitted to the following serological exams: cytomegalovirus (IgM negative), lues (negative), German measles (IgG/IgM negative), toxoplasmosis (IgG/IgM negative), and anti-HIV 1 and 2 (negative), and received three doses of anti-tetanus vaccine.

The woman had a normal delivery and gave birth to a term (9 months of gestation) boy weighing 2485 g, height 48 cm, who did not present any abnormalities upon physical examination. The *Leishmania* IIF result in the umbilical cord was 1:80 and the ELISA result in peripheral blood was 1:268. During the 10 months clinical follow-up of the child, serology for *Leishmania* in peripheral blood was positive at 3 months (1:80) and negative after 6 months of life.

Many sections were collected from placenta and its annexa for histological examinations. Microscopy revealed chorionic villi in the placental sections, which contained more stroma than usually observed for this gestational age, and an increase in the number of syncytial knots. In addition, various areas of chronic infarction as well as an increase in chorionic villus calcification were noted. Some arterial blood vessels of the villus trunks showed wall thickening. The amniotic epithelium was found to be simple and cylindrical, sometimes exfoliative, with apical nuclei. No alterations were observed for the extraplacental membranes or umbilical cord. No evidences of hematogenous placentitis were seen. The results of the final report were: placenta with delayed maturation, chronic infarction and ischemic alterations in placental villi, and the absence of *Leishmania* amastigotes.

## 3. Discussion

Low and Cooke (1926) reported the first Old World case of kala-azar in pregnancy which

Table 1  
Laboratory data obtained for the mother at the beginning, during and after treatment with amphotericin B (São Luís, Maranhão, Brazil, 2001)

Exam	Before treatment	First week	Second week	90 days	180 days
Red blood cells ( $\times 1000$ per $\text{mm}^3$ )	3.14	3.93	2.35	3.11	3.82
Haemoglobin (g/dl)	7.5	10.1	6.3	8.3	11.20
Hematocrit (%)	21.6	30.3	19.3	26.0	33
Leukocytes ( $\text{mm}^3$ )	3.4	4.0	5.0	6.3	11.8
Segmented cells (%)	65	75	78	61	75
Lymphocytes (%)	30.1	21	17	28.6	18
Platelets ( $\text{mm}^3$ )	96 000	148 000	148 000	156 000	160 000
Oxalacetate transaminase (U/l)	15	ND	ND	6	23
Pyruvate transaminase (U/l)	28	ND	ND	5	16
Total bilirubin (mg/dl)	0.48	ND	ND	0.48	0.49
Direct bilirubin (mg/dl)	0.08			0.05	0.03
Erythrocyte sedimentation rate during the 1st h (mm)	59	ND	ND	35	23
Urea (mg/dl)	12	17	13	12	10
Creatinine (mg/dl)	0.5	1.1	2.5	0.9	0.40
Albumin (U/ml)	3.1	3.9	2.0	3.4	2.53
Globulin (U/ml)	5.3	3.7	1.6	3.2	1.20
Glycemia (mg/dl)	79	79	79	78	77
Potassium (mEq/dl)	3.1	3.1	3.1	3.0	ND
Sodium (mEq/dl)	135	135	135	141	ND
Phosphorus (mg/100 ml)	4.8	4.9	4.8	ND	ND

ND, not done.

occurred in Africa, with the child being born with signs and symptoms of the disease. Banerjee (1955) reported the case of a child born in England who manifested clinical signs and symptoms of laboratory confirmed kala-azar at 7 months of age. The mother of the child, who contracted the disease at 5 months of gestation, was returning to England from India where she had lived for several years.

Isam et al. (1992) reported the possible occurrence of two cases of congenital kala-azar in Sudan. In the first case, the child presented signs and symptoms of the disease at 7 months of age and died. *Leishmania* was detected in the liver, kidneys and thymus at autopsy. In the second case, parasites were found in the placenta in a 5-month-old foetus. Congenital transmission could not be confirmed in either case. Other authors (Niakundi et al., 1988; Yadav et al., 1989; Gradoni et al., 1994) have described cases of possible congenital kala-azar in the Old World similar to those reported by Isam et al. (1992).

In the New World, kala-azar in pregnancy is considered to be a rare occurrence in view of the number of cases reported in the literature. However, with the spreading of the disease in Brazil among urban and peri-urban areas where adults were generally not previously exposed to *Leishmania*, cases of pregnant women with kala-azar have been notified (Silveira et al., 1993; Moraes et al., 1995; Viana et al., 2001).

In Maranhão, Viana et al. (2001) reported two cases of kala-azar in pregnancy. In the first case, the mother had shown signs and symptoms of the disease since the seventh month of pregnancy, with the child being born at term. In the other case, the mother contracted kala-azar during the second month of pregnancy, with the child being born premature at 7 month. In both cases the diagnosis was confirmed after delivery by detection of *Leishmania* amastigotes in bone marrow aspirates. The mothers were treated after delivery with *N*-methylglucamine antimony (20 mg/kg per day for



20 days), and the children were clinically and serologically (IF) followed up for 6 months. Neither child showed clinical signs suggestive of the disease during this period and the IF tests were negative.

In the present case, no vertical transmission was observed, since the child followed up clinically and serologically for 10 months did not show any signs or symptoms of the disease, even though he was living in an endemic area. Serology (IF/ELISA) was positive from birth to 6 months of age and negative, thereafter, in agreement with cases from the State of Pará, Brazil, reported by Silveira et al. (1993). Anatomopathological analysis of the placenta did not reveal any parasites, thus suggesting the absence of *Leishmania* transmission from the mother to the infant.

Another important aspect to be discussed is the toxicity of the drugs used in the treatment of kala-azar to both mother and foetus. Pentavalent antimony compounds ( $Sb^{+5}$ ) cross the placental barrier and might impregnate foetal nervous tissue, leading to severe syndromes of mental retardation (Marsden, 1985). However, Niakundi et al. (1988) recommended that, in areas endemic for kala-azar, pregnant women be treated with sodium stibogluconate at the dose of 20 mg  $Sb^{+5}$  per kg per day for 30 days.

Since amphotericin B has been recognised as a drug with leishmanicidal action but high toxic potential, therapeutic schemes (dosage, interval, total dose) have been modified over the years, a fact that led to progressive reduction and control of its toxicity and side effects (Mish et al., 1990; Giri, 1993; Thakur et al., 1999).

Based on the high rates of cure of kala-azar (93–100%), the use of amphotericin B has been extended and its safe use in pregnant women without repercussions on the foetus has been reported (Mish et al., 1990; Thakur et al., 1993, 1999). Thakur et al. (1993) administered amphotericin B at the dose of 1 mg/kg per day for 20 days infused during a 2 h period to four pregnant women with kala-azar.

In Brazil, no reports on the treatment of pregnant women with kala-azar are available. In view of the variability of the proposed schemes, in the present case we opted for amphotericin B at

the dose of 1 mg/kg per day for 14 consecutive days based on a study, which cure was obtained in 97.5% of non-pregnant patients with kala-azar (Carvalho, SFG, pers. inf.), demonstrating that amphotericin B, when used as the first-choice drug, leads to high rates of cure associated with a reduced total dose. In the present case, both the mother and the foetus showed a good response to treatment, with the foetus being followed up by abdominal ultrasonography.

## References

- Banerjee, D.N., 1955. Possible congenital infection in kala-azar. *J. Indian Med. Assoc.* 24, 433–435.
- Caldas, A.J.M., Costa, J.M.L., Silva, A.A.M., Vinhas, V., Barral, A., 2001. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 1–8.
- Fundação Nacional de Saúde, 1996. Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar) Brasília: Ministério da Saúde, Brasil.
- Giri, O.P., 1993. Amphotericin B therapy in kala-azar. *J. Assoc. Phys. India* 4, 91–93.
- Gradoni, L., Gaeta, G.B., Pellizzer, G., Maisto, A., Scalone, A., 1994. Mediterranean visceral leishmaniasis in pregnancy. *Scand. J. Infect. Dis.* 26, 627–629.
- Isam, I.A.E., Zijlstra, E.E., Ali, M.S., Ghalib, H.W., Satti, M.M.H., Eltoun, B., El-Hassan, A., 1992. Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 57–62.
- Low, G.C., Cooke, W.E., 1926. Congenital case of kala-azar. *Lancet* 211, 1209.
- Marsden, P.D., 1985. Old drugs for new diseases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18, 187–198.
- Mish, M., Biswas, U.K., Jha, D.N., Khan, A.B., 1990. Amphotericin B for second-line treatment of Indian kala-azar. *Lancet* 337, 926.
- Moraes, C., Topyla, S.V., Paes, R.A.P., Cury, A.F., Tedesco, J.J.A., 1995. Leishmaniose visceral durante a gestação. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 17, 667–669.
- Niakundi, P.M., Muigai, R., Were, J.B.O., Oster, C.N., Gachihi, G.S., Kirigi, G., 1988. Congenital visceral leishmaniasis: case report. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 564.
- Silveira, F.T., Costa, D.P., Marques, K.C.C., Ishikawa, E., Shaw, J.J., Moraes, M.A.P., 1993. Leishmaniose visceral na gravidez: isolamento de *L. chagasi* da placenta humana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27 (Suppl 1), 250.
- Thakur, C.P., Sinha, G.P., Sharma, V., Barat, D., 1993. The treatment of kala-azar during pregnancy. *Nat. Med. J. India* 6, 263–269.

- Thakur, C.P., Singh, S.M., Hassan, R.K., Narin, S., Kumar, A., 1999. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 319–328.
- Viana, G.M.C., Nascimento, M.D.S.B., Viana, M.G.C., Burtattini, M.M., 2001. Transmissão congênita do calazar. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34 (Suppl I), 247.
- Vieira, J.B.F., Coelho, G.E., 1998. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31 (Suppl II), 85–92.
- WHO, 1990. Control of Leishmaniasis. Technical Report Series, No.793.
- Yadav, B.T.P., Gupta, H., Sattaya, R., Kumar, R., Mital, V., 1989. Congenital kala-azar. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83, 535–537.

## CONCISE COMMUNICATION

## Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* Saliva Concurrent with the Development of Anti-*Leishmania chagasi* Delayed-Type Hypersensitivity

Regis B. Gomes,<sup>1,2</sup> Cláudia Brodskyn,<sup>1,3,5</sup>  
Camila I. de Oliveira,<sup>1</sup> Jackson Costa,<sup>4</sup>  
José C. Miranda,<sup>1</sup> Arlene Caldas,<sup>1,4</sup> Jesus G. Valenzuela,<sup>6</sup>  
Manoel Barral-Netto,<sup>1,2,3</sup> and Aldina Barral<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, and <sup>2</sup>Faculdade de Medicina and <sup>3</sup>Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, <sup>4</sup>Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Maranhão, and <sup>5</sup>Immunology Investigation Institute, São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>6</sup>Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

Antibody responses to salivary gland sonicate (SGS) from *Lutzomyia longipalpis* were investigated using serum samples from individuals living in an area where visceral leishmaniasis is endemic. Individuals were classified into 2 groups, according to the alteration of their responses to *Leishmania chagasi* antigen over the course of 6 months. Group 1 included children who experienced anti-*L. chagasi* seroconversion from negative to positive; group 2 included children who experienced delayed-type hypersensitivity (DTH) response to *L. chagasi* antigen conversion from negative to positive. Individuals who experienced seroconversion against *L. chagasi* antigens did not have increased anti-saliva antibody response, whereas those who developed a positive anti-*L. chagasi* DTH response had increased immunoglobulin (Ig) G, IgG1 and IgE anti-SGS antibody levels. Despite wide variation, serum samples from individuals in group 2 recognized more bands in SGS than did those from individuals in group 1. This simultaneous appearance of anti-saliva humoral response and anti-*L. chagasi* cell-mediated immunity supports the hypothesis that induction of immune response against SGS can facilitate induction of a protective response against leishmaniasis.

*Leishmania* species are transmitted by sand flies. The saliva of these and other blood-sucking insects contains a varied repertoire of pharmacologically active molecules that are able to interfere with host hemostatic, inflammatory, and immune responses [1]. In mice, these products exacerbate infection with *L. chagasi* and may, in fact, be elemental for establishing the parasite in the vertebrate host [2]. The presence of salivary gland sonicate (SGS) changes the pattern of the anti-*L. chagasi* immune response from a protective Th1 pattern to an unresponsive Th2 pattern [3]. This effect was completely abrogated in

mice that were preexposed to salivary components or bites from uninfected sand flies [4, 5]. The protection given by immunization with SGS [2] or the 15-kDa protein from the saliva of *Phlebotomus papatasi* (SP15) [4] also is indicative of the importance of sand fly saliva on the initial steps of infection with *L. chagasi*. Of interest, even in B cell knockout mice, immunization with SP15 cDNA leads to protection, suggesting that a delayed-type hypersensitivity (DTH) response against saliva provides most, if not all, of the protective effects of this vaccine [4]. However, the importance of sand fly saliva in human *L. chagasi* infection is less clear.

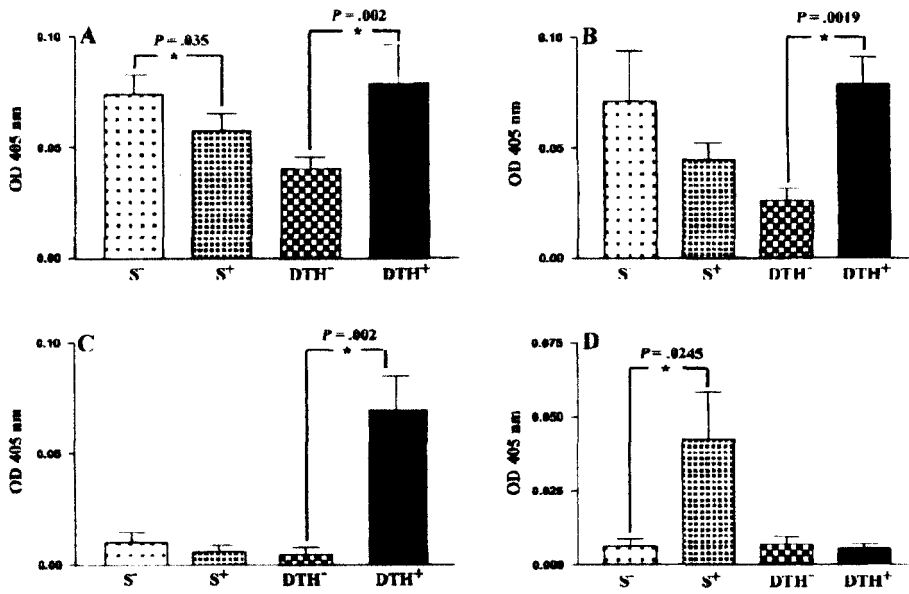
We have previously shown that serum samples from children living in an area endemic for visceral leishmaniasis (VL) have anti-SGS IgG antibodies that differentially recognize salivary gland antigens [6]. Individuals with a positive anti-*L. chagasi* DTH response exhibited anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies. A positive correlation was observed between anti-*Lu. longipalpis* saliva antibodies and anti-*L. chagasi* DTH response, but no correlation was observed between anti-saliva antibodies and anti-*L. chagasi* serologic status [6]. In the present study, we explore the change in humoral and cell-mediated anti-*L. chagasi* responses in a 6-month follow-up of individuals in an area where VL is endemic, as well as the change in anti-*Lu. longipalpis* saliva antibody responses in the same individuals.

Received 5 March 2002; revised 9 August 2002; electronically published 16 October 2002.

Informed written consent was obtained from parents or legal guardians of minors. Human experimentation guidelines from Universidade Federal do Maranhão Ethics Committee were followed and approved.

Financial support: National Institutes of Health (AI-30639). C.B., A.B., and M.B.-N. are investigators from the Brazilian National Research Council.

Reprints or correspondence: Dr. Aldina Barral, Laboratório de Imunoparasitologia, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Valdemar Falcão, 121 Salvador, 40295-001 Bahia, Brazil (abarral@cpqgm.fiocruz.br).



**Figure 1.** Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva. Human serum samples were obtained at time 0 (negative anti-*Leishmania chagasi* serologic status [S<sup>-</sup>] or negative delayed-type hypersensitivity [DTH<sup>-</sup>] and 6 months later (positive anti-*L. chagasi* serologic status [S<sup>+</sup>] or positive anti-*L. chagasi* DTH response [DTH<sup>+</sup>]). ELISAs were performed with these serum samples using salivary gland sonicate of the sand fly *Lu. longipalpis*. A, Anti-saliva IgG levels in individuals whose anti-*L. chagasi* serologic status converted (S<sup>-</sup> to S<sup>+</sup>) and whose anti-*L. chagasi* DTH response converted (DTH<sup>-</sup> to DTH<sup>+</sup>). B, Anti-saliva IgE levels in the individuals described in panel A. C, Anti-saliva IgG1 levels in the individuals described in panel A. D, Anti-saliva IgG4 levels in the individuals described in panel A. The nonparametric paired Wilcoxon test was used to compare levels of anti-*Lu. longipalpis* saliva antibodies at time 0 and after 6 months.  $P < .05$  was considered to be significant. OD, optical density.

**Methods**

**Study population.** Serum samples used in the present study were obtained from an epidemiologic survey of VL in children <7 years old living in a region of São Luiz, Maranhão State, in northeastern Brazil, where VL is endemic. During this prospective study, anti-*L. chagasi* DTH response and serologic tests were performed twice a year during 1997 and 1998. Only children who did not have VL, a positive serologic test result, or a DTH response at the first survey were included in the present study. None of the individuals in the data set had disease, and all had negative responses to leishmanial antigen during the preceding 6-month period. Positivity in the anti-leishmanial tests reported here indicates a recent conversion, as determined by a sensitive and specific ELISA [6] and/or DTH test [6]. To determine the cutoff value for IgG anti-*Lu. longipalpis* in ELISAs, serum samples were obtained from children in the same age range from an area where *Lu. longipalpis* is not endemic. Assuming that recent seroconversion represents infection and that a positive DTH response is a marker of protection against leishmaniasis in subclinical cases, we classified children in 2 groups, according to their anti-*L. chagasi* responses. Children in group 1 experienced serologic status conversion, from negative to positive ( $n = 15$ ), and children in group 2 experienced DTH response conversion, from negative to positive ( $n = 15$ ).

**Anti-sand fly saliva serologic testing.** Anti-sand fly saliva serologic test ELISA was performed as described elsewhere [6]. Serum IgG subclasses were determined using anti-human IgG1, IgG3, or

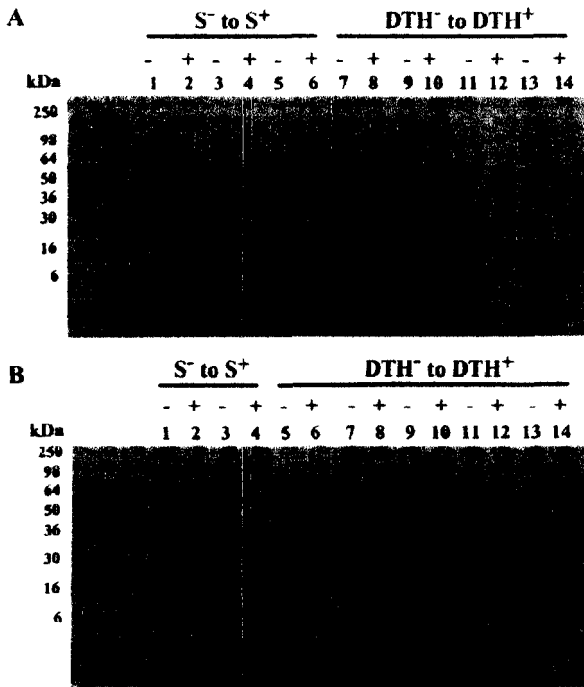
IgG4 alkaline-phosphatase conjugates (Sigma-Aldrich). To determine IgE levels, serum samples were previously absorbed using rheumatoid factor. Anti-human IgE (Sigma-Aldrich) was used in the ELISA.

**Western blots.** Western blots of salivary gland antigens were performed as described elsewhere [6].

**Statistical analysis.** The nonparametric paired Wilcoxon test was used to compare levels of anti-*Lu. longipalpis* saliva antibodies in the same children at time 0 (beginning of survey) and after 6 months.  $P < .05$  was established as the significance level. GraphPad Prism Software was used to perform the statistical tests.

**Results**

**Antibodies against *Lu. longipalpis* saliva.** Individuals ( $n = 15$ ) who experienced conversion to a positive anti-*L. chagasi* DTH response had significantly increased anti-*Lu. longipalpis* IgG (figure 1A;  $P = .02$ ) and IgE antibody levels (figure 1B;  $P = .002$ ). IgG1 was the principal antibody subclass involved in the increase of anti-saliva antibodies in the group who experienced anti-*L. chagasi* DTH response conversion, from negative to positive ( $n = 15$ ) (figure 1C); no significant changes were observed in other IgG subclasses. The cutoff value for anti-*Lu. longipalpis* IgG level in ELISA was 0.045, as measured by optical density. A significant decrease in anti-saliva IgG antibody levels



**Figure 2.** *Lutzomyia longipalpis* salivary proteins recognized by human serum samples of individuals whose anti-*Leishmania chagasi* serologic status converted from negative (S<sup>-</sup>) to (S<sup>+</sup>) or whose anti-*L. chagasi* delayed-type hypersensitivity (DTH) response converted from negative (DTH<sup>-</sup>) to positive (DTH<sup>+</sup>). *A* and *B*, Western blot of *Lu. longipalpis* salivary proteins reacted to human serum samples of individuals whose anti-*L. chagasi* serologic status converted from negative (S<sup>-</sup>) to positive (S<sup>+</sup>) (lanes 1–6) or whose DTH response converted from negative to positive (lanes 7–14). –, Time 0; +, time 6 months.

( $P = .035$ ) was observed in serum samples from children who experienced anti-*L. chagasi* serologic status conversion from negative to positive (group 1; figure 1*A*). No significant changes were observed in anti-saliva IgE in group 1 (figure 1*B*). Although IgG anti-saliva levels in group 1 children decreased in the 6-month period, a significant increase in IgG4 anti-saliva was observed in this group ( $P = .0245$ ; figure 1*D*).

**Components of saliva recognized by IgG.** We evaluated by Western blot the number and pattern of *Lu. longipalpis* salivary proteins recognized by the serum samples of individuals who experienced anti-*L. chagasi* serologic status or anti-*L. chagasi* DTH response conversion from negative to positive. Of 7 randomly selected serum samples from individuals who experienced anti-*L. chagasi* serologic status conversion, samples from 2 individuals poorly recognized 2 different salivary proteins of 33 and 200 kDa, respectively (data not shown; figure 2*B*, lane 4). The remaining serum samples did not recognize any salivary protein at any time point.

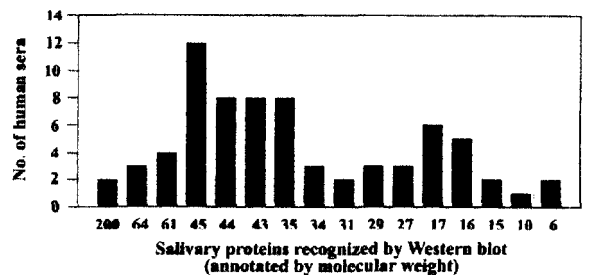
Conversely, of 13 randomly selected serum samples of individuals who experienced anti-*L. chagasi* DTH response con-

version, 12 recognized a variety of salivary proteins with various intensities. Figure 2*A* and 2*B* show the diversity of salivary antigens recognized by these serum samples (lanes 7–14). In addition, serum samples from 6 individuals who experienced anti-*L. chagasi* DTH response conversion from negative to positive showed an increase in the number and/or intensity of salivary proteins recognition, when time points 0 (negative) and 6 months (positive) were compared (figure 2*A*, lanes 7 [negative] and 8 [positive], 11 [negative] and 12 [positive], and 13 [negative] and 14 [positive]; figure 2*B*, lanes 11 [negative] and 12 [positive], 13 [negative] and 14 [positive]; data not shown). Some individuals in this group did not show any change from time 0 to 6 months (figure 2*A*, lanes 9 [negative] and 10 [positive]; figure 2*B*, lanes 7 [negative] and 8 [positive]) or did not recognize any salivary protein (figure 2*B*, lanes 9 [negative] and 10 [positive]).

The serum samples of the individuals who experienced anti-*L. chagasi* DTH response conversion recognized a total of 16 different salivary proteins; however, the frequency of recognition varied among these individuals (figure 3). A salivary protein of 45 kDa was recognized by 12 serum samples, followed by proteins of 44, 43, and 35 kDa recognized by 8 serum samples each, a protein of 17 kDa recognized by 6 serum samples, and a protein of 16 kDa recognized by 5 serum samples. Other salivary proteins were recognized as well but with less frequency ( $\leq 3$  serum samples).

**Discussion**

The present report indicates that children who experience anti-*L. chagasi* DTH response conversion also have an increase in anti-sand fly saliva antibodies, as evidenced by ELISA and Western blot results. We have previously shown a correlation between anti-saliva antibody titers and anti-*L. chagasi* DTH response [6], and the present results expand those findings, showing that the development of anti-parasite DTH coincides temporally with the development of anti-*Lu. longipalpis* saliva antibodies.



**Figure 3.** Frequency of salivary proteins recognized by serum samples of 13 individuals whose anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity (DTH) response converted from negative to positive. X-axis, Different *Lutzomyia longipalpis* salivary proteins (labeled by the approximate molecular weight) recognized by Western blot analysis. Y-axis, No. of human serum samples recognizing a particular salivary protein.

It is tempting to speculate that neutralization of sand fly salivary component(s) by antibodies or cellular response to salivary proteins allows for a more efficient mounting of an anti-*L. chagasi* cell-mediated immune response, probably developing a Th1 response against the parasite. Sand fly saliva components, such as maxadilan, are able to impair macrophage function [7], which interferes with *L. chagasi* survival and antigen presentation [8]. Recently, it was reported that this molecule exacerbated infection with *L. chagasi* to the same degree as whole saliva, and that vaccinating against maxadilan protected mice against infection with *L. chagasi* [9]. The higher antibody levels observed in individuals who experienced anti-*L. chagasi* DTH response conversion suggest that mounting an anti-saliva component immune response is linked to developing cell-mediated immunity against *L. chagasi*. In our study, we did not evaluate anti-saliva cell-mediated immunity in the exposed children. Serum samples used in this study were made available from a study conducted during 1997–1998, and it was impossible to perform anti-saliva DTH tests. Even in a prospective study, performing anti-saliva DTH tests in a population is a challenging task, because of limitations of SGS availability and problems of injecting material from sand flies in children.

The Western blot analysis results reported here show that serum samples from individuals who experienced anti-*L. chagasi* serologic status conversion did not recognize any salivary protein, whereas serum samples from individuals who experienced anti-*L. chagasi* DTH response conversion recognized a number of different salivary proteins. The frequency of salivary antigens recognized by these serum samples reveals a cluster of only few proteins, including antigens with approximate molecular masses of 45, 44, 43, 35, 27, and 16 kDa, respectively (figure 3). Among these antigens, we suggest the recognition of at least 2 salivary proteins (45 and 35 kDa), which may be similar to the Yellow related protein and to the salivary amylase from the saliva of *Lu. longipalpis*, respectively [10]. These salivary proteins (45 and 35 kDa) represent 2 of the highest frequencies of recognition by human serum samples and could be candidates to either study the exposure to sand fly bites or as vaccine candidates to control infection with *L. chagasi*. Although the molecular weight of these salivary antigens are related to the previously described *Lu. longipalpis* proteins [10], identification and characterization of all these antigens need further study. Surprisingly, only 2 serum samples recognized a protein at the range of 6 kDa, the molecular weight of maxadilan [1], suggesting that, in humans, maxadilan may not induce a strong antibody response but could be a strong inducer of cellular immunity.

Individuals who experienced anti-*L. chagasi* cell-mediated immunity conversion had increased IgG1 and IgE levels. IgG1 has been related to a human Th1 response [11], although this relationship has not been fully established. The elevation of IgE antibodies suggests the development of an immediate hypersensitivity, since IgE is considered to be a marker of a Th2 type responses [11]. It is likely that a mixed Th2 type (related to

immediate hypersensitivity) and Th1 type response (related to DTH) against saliva components coexist in individuals who recently experienced anti-*L. chagasi* DTH response conversion. In fact, this type of mixed response was reported in individuals exposed to insect bites, where the host immune response against insect saliva starts with DTH response, evolves to a predominant immediate type hypersensitivity, and finally desensitization [12]. In addition, we have observed in mice that immunization with *Lu. longipalpis* salivary genes resulted in a typical DTH and/or antibody response to *Lu. longipalpis* salivary proteins (J.G.V., unpublished results), suggesting that bites of *Lu. longipalpis* could induce Th1 and Th2 responses in humans, a phenomenon described for the bites of the sand flies from the Eastern Hemisphere [4]. Of interest, SP15, which is responsible for the DTH response in mice, is highly homologous to the SL1 protein present in the saliva of *Lu. longipalpis* [10]. Our results suggest that a mixed anti-saliva response with both Th1 and Th2 components may help in establishing an anti-immune *L. chagasi* response.

An indication of a possible down-modulation of immediate hypersensitivity came from elevation of IgG4 antibodies in individuals who experienced anti-*L. chagasi* serologic status conversion. IgG4 has been implicated as a blocking antibody in the control of allergic reactivity in human filariasis [13]. Developing allergy against insect saliva is frequently observed in populations exposed to insects [14]. The presence of an immediate hypersensitivity at the site of obichotomine bite may create an inhospitable microenvironment, noxious to the blood feeder [15], or even impairing parasite survival. The lack of studies evaluating anti-saliva immune responses in vector transmitted protozoan diseases may have precluded the description of immediate hypersensitivity as a protective mechanism in such conditions.

#### Acknowledgments

We thank Deborah Prates and Ana Cristina Bahia for technical assistance with the insect colony, José Marcos Ribeiro for critical review of this manuscript, and Nancy Shulman for editorial assistance.

#### References

1. Titus RG, Ribeiro J. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. *Parasitol Today* 1990;6:157–159.
2. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva pre-exposure on the long term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 1998;188:1941–53.
3. Mbow MT, Bleyenbergh JA, Hall ER, Titus RG. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 1998;161:5571–7.
4. Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, et al. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine: targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 2001;194:331–42.
5. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against

- cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* **2000**;290:1351-4.
6. Barral A, Honda E, Caldas A, et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* **2000**;62:740-5.
  7. Soares MB, Titus RG, Shoemaker CB, David J, Bozza M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF- $\alpha$  and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* **1998**;160:1811-6.
  8. Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* **1991**;59:1592-8.
  9. Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* **2001**;167:5226-30.
  10. Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JM. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**;96:15155-60.
  11. de Vries JE, Carballido JM, Sornasse T, Yssel H. Antagonizing the differentiation and functions of human T helper type 2 cells. *Curr Opin Immunol* **1995**;7:771-8.
  12. Mellanby K. Natural history of vertebrate host response to insect bites. *Nature* **1946**;158:554-5.
  13. Hussain R, Poindexter RW, Ottersen EA. Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass. *J Immunol* **1992**;148:2731-7.
  14. Arlian LG. Arthropod allergens and human health. *Annu Rev Entomol* **2002**;47:395-433.
  15. Stebbings JHJ. Immediate hypersensitivity: a defense against arthropods? *Perspect Biol Med* **1974**;17:233-9.

## Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil

A. J. M. Caldas<sup>1</sup>, J. M. L. Costa<sup>1</sup>, A. A. M. Silva<sup>2</sup>, V. Vinhas<sup>3</sup> and A. Barral<sup>3,4</sup> <sup>1</sup>Nucleus of Tropical Pathology and Social Medicine, Federal University of Maranhão, <sup>2</sup>Public Health Department, Federal University of Maranhão, <sup>3</sup>Immunology Service, Federal University of Bahia School of Medicine, <sup>4</sup>Gonçalo Moniz Research Centre, FIOCRUZ, Bahia, Brazil

### Abstract

Various factors have been associated with a predisposition to the development of clinical American visceral leishmaniasis (AVL). However, little information is available about the factors that predispose to asymptomatic infection. To identify the risk factors associated with asymptomatic infection, a study was carried out between July 1997 and June 1998 on children aged 0–5 years in the districts of Vila Nova and Bom Viver in the municipality of Raposa in the island of São Luís, State of Maranhão, Brazil. A questionnaire containing socioeconomic, demographic and epidemiological data was used. The delayed-type hypersensitivity (DTH) test was carried out on 639 children in the first phase, and on 572 in the second, 7 months after the first survey, using *Leishmania amazonensis* antigen. Infection was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 638 children during the first phase, and in 572 during the second. Six outcome measures were used: initial prevalence, final prevalence and incidence, each determined by DTH and ELISA. The incidence of infection was 10.8% when determined by DTH and 28.5% when determined by ELISA. After adjustment for confounding variables using Cox regression, infection by *L. chagasi* was associated with child's age ( $\geq 2$  years), location of the dwellings (Vila Nova) and reporting of relatives with AVL. Bathing outside the house and playing outdoors between 18:00 and 20:00 were identified as risk factors in some analyses but not in others. Presence of intra- and peridomestic *Lutzomyia* sandflies and animals such as dogs or chickens in the house or in the neighbourhood appeared as risk factors in some analyses but in others they unexpectedly seemed to protect from infection. Malnutrition was not found to be associated with infection.

**Keywords:** visceral leishmaniasis, *Leishmania chagasi*, asymptomatic infection, children, prevalence, incidence, risk factors, Brazil

### Introduction

American visceral leishmaniasis (AVL) is an infectious disease causing significant immunological changes that lead to alterations in both cellular and humoral immunity. Of these, alterations in humoral immunity have been used as a criterion for diagnosis of the infection owing to the presence of elevated titres of specific antibodies (BADARÓ *et al.*, 1986a; WHO, 1990; FNS, 1996).

AVL is caused by the parasite *Leishmania chagasi* and is transmitted by the bite of a *Lutzomyia* sandfly. It has been recently determined that large numbers of individuals in endemic areas are infected with the parasite but do not develop the classical signs and symptoms of the disease. A recent advance in our ability to identify persons in this group has been the development of a *Leishmania*-specific antibody test and skin test for the detection of leishmanial infection (BADARÓ *et al.*, 1986b; REED *et al.*, 1986).

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been used in both Brazil and Kenya to monitor asymptomatic and subclinical disease in addition to diagnosing acute AVL, and epidemiological studies have shown that the ratio of infected people, either asymptomatic or with subclinical disease, to those with classical symptoms of AVL ranges from 4 to 30:1 (BADARÓ *et al.*, 1986a; JAHN *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1992).

In endemic areas of north-east Brazil, it is estimated that 7.5% of individuals aged <15 years are infected by *Leishmania* each year, and about 20% of those infected by *L. chagasi* develop the classical form of the disease (BADARÓ *et al.*, 1986a; WHO, 1990). The highest prevalence of human AVL occurs in children aged 0–9 years, who account for 80% of cases; of these, 60% are aged <5 years (BADARÓ *et al.*, 1986a).

Various factors have been associated with a predis-

position to the development of AVL disease, such as young age, malnutrition (BADARÓ *et al.*, 1986a; CERF *et al.*, 1987), poor lymphocyte proliferation, low production of gamma interferon (CARVALHO *et al.*, 1992, 1994), and exposure to *L. chagasi*. However, little information is available about the factors that predispose to asymptomatic infection. According to EVANS *et al.* (1992), the factors that determine the development of infection after transmission of *L. chagasi* by *Lutzomyia* sandflies have not been completely clarified. The island of São Luís in Maranhão is currently experiencing an epidemic of AVL, accounting for 65% of the total cases for the state (FNS, 1996). To identify possible risk factors that may lead to asymptomatic infection by *L. chagasi* after exposure, the delayed-type hypersensitivity (DTH) and ELISA tests were used in a population of north-east Brazil.

### Subjects and Methods

A prospective study was carried out between July 1997 and June 1998 on all children aged 0–5 years in the localities of Vila Nova and Bom Viver in the municipality of Raposa, Maranhão.

#### Description of the area

The island of São Luís has an area of 905 km<sup>2</sup> and contains the municipalities of São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar and Raposa. The municipality of Raposa is situated 28 km from the city of São Luís, the state capital of Maranhão. The area of the municipality is 63.9 km<sup>2</sup> and the population consists of 15 075 inhabitants distributed among 21 districts, including Vila Nova and Bom Viver, the focus of the present study. The districts of Vila Nova and Bom Viver originated from recent land occupations, with respective populations of 2600 and 4307 inhabitants. The economic activity of the 2 localities is based on fishing and crafts. These localities were selected because they are endemic for AVL and have poor populations with little information concerning the disease (GAMA *et al.*, 1997). In the past 3 years, the incidence of AVL observed in children aged 0–5 years has varied in these districts: 22.8 cases per 1000 children in 1995,

Address for correspondence: Arlene Caldas, Nucleo de Patologia Tropical e Medicina Social do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, Praça Madre Deus, N° 2, Madre Deus, 65.025-560, São Luís-Maranhão, Brazil; fax +55 98 2225135, e-mail npatufma@elo.com.br



9.4 cases per 1000 children in 1996 and 13.3 cases per 1000 children in 1997 (unpublished data obtained from the National Health Foundation).

#### Study design

The study was started in July 1997 with a population survey and then divided into 2 phases. The first (September–October 1997) involved a cross-sectional study using a standardized questionnaire applied to mothers/guardians and examination by the study group during which children's height was measured and the DTH and ELISA tests were performed. In the second phase (April–May 1998) the DTH and ELISA tests, and height measurements, were repeated 7 months after the first phase.

The mothers/guardians gave written informed consent for the children to participate in the study. The wishes and decisions of the mothers were always respected.

In the choice of variables, associations found in other endemic areas were taken into account (BADARÓ *et al.*, 1986c; CERF *et al.*, 1987; EVANS *et al.*, 1992). The variables contained in the questionnaire were: child's age (in months) and gender, father's and mother's literacy, type of housing, bathroom (indoors/outdoors), chronic malnutrition, place where the child plays in the early evening (indoors/outdoors), presence of animals (chickens, dogs or both), insecticide spraying during the previous year, AVL in relatives and neighbours, and *Lutzomyia* sandflies in the house.

#### Description of measurements and tests

The DTH was performed with *L. amazonensis* promastigotes (MHOMBR-88-BA-125) as previously described (REED *et al.*, 1986). The test was applied intradermally to the anterior forearm, and readings were taken at 48–72 h after application (CUBA *et al.*, 1985; WHO, 1990), with the diameter of the induration being measured with a millimetre ruler. One or both diameters of  $\geq 5$  mm was considered a positive reaction. The test was carried out on 639 children aged 0–71 months in the first phase, and on 572 children aged 7–78 months in the second phase. The difference in the number of children between phases was due to migration occurring in these areas.

Antileishmanial antibodies were detected by ELISA using antigen prepared with *L. chagasi* in Bahia, Brazil. These antigens show high sensitivity (98%) and specificity (96%) for the detection of antibodies in sera from AVL patients (BADARÓ *et al.*, 1986b). The test was performed on 638 children in the first phase and on 572 in the second. Eight children with hepatosplenomegaly and unexplained fever of more than 1 week's duration were considered to be potential cases of leishmaniasis, as confirmed with bone-marrow aspirate, and were excluded from the study. Blood (2–4 mL) was collected from each child, placed in tubes without heparin and left to coagulate at room temperature. The samples were then centrifuged and serum was separated. The serological reaction was considered positive when the level of absorbance (cut-off) was  $\geq 0.045$ , this figure representing 2 SD above the average absorbance level of a sample of 20 sera from healthy, non-exposed individuals.

Child's height was measured using a portable anthropometer and recorded to the last 0.1 cm. Children younger than 2 years were measured in the supine position and the others in the upright position. Data regarding the nutritional status of the children were analysed using the National Center for Health Statistics (NCHS) standards. Z-scores for height-for-age were calculated using the EpiInfo EpiNut software. Chronic malnutrition (stunting) was assessed by height-for-age Z scores compared to the reference standards (WATERLOW, 1972; WATERLOW *et al.*, 1977; WHO, 1986).

#### Statistical analysis

Unadjusted and adjusted relative risks (RRs) for initial prevalence, final prevalence and incidence of infection detected by DTH and ELISA were calculated with 95% confidence interval. The variables were classified into 2 or more categories, always taking the first category or that with the least risk as the baseline. Initial prevalence was defined as children with positive results in the first phase and final prevalence as children with positive results in the second. Incidence was calculated from the number of children with a negative result in the first phase and a positive result in the second phase, i.e., the number of children infected during the study period divided by the total number in the exposed population.

All variables presented in the unadjusted analysis were included in the multivariate analysis. A backward stepwise procedure was used with a *P*-value of 0.10 for retaining a variable in the final model. The results were adjusted for confounders by the Cox regression (COX, 1972) technique using the STATA (1997) program, modified for sectional design (LEE, 1994), considering 7 months as the follow-up time for all children, with no removals from the study or losses to follow-up. Because the standard errors of the coefficients tend to be overestimated when Cox regression is applied to sectional designs, the robust method of calculating the variance-covariance matrix (LIN & HEI, 1989) was used instead of the conventional inverse-matrix-of-second-derivatives method. In the calculation of the standard errors of the coefficients, we also took clustering into account because on some occasions more than 1 child per household participated in the study.

#### Results

Vila Nova consisted of 361 families and Bom Viver of 574 families. Each family had on average 5.9 persons and 3.9 children. Family income was lower than 1 Brazilian minimum wage in most cases (89%) and almost all children have lived in the 2 districts since birth: 48% were males and 52% females. The incidence of *L. chagasi* infection was 10.8% when determined by DTH and 28.5% when determined by ELISA.

#### Unadjusted analysis of infection

Regarding initial prevalence measured by DTH, children aged 24–71 months, who used to bathe outside in the backyard and who had relatives with AVL were at increased risk of acquiring AVL infection. According to the ELISA test, children who lived in Vila Nova and who had relatives with AVL were at higher risk for AVL infection. The presence of chickens around the house or in the neighbourhood appeared to protect them from infection (Table 1).

Using final prevalence as the outcome, according to the DTH test, children aged 48–78 months who lived in Vila Nova district were at higher risk for infection. Reporting *Lutzomyia* sandflies in the house, AVL in relatives and the presence of chickens or dogs in or around the house were associated with increased risk of infection. As measured by the ELISA test, only 3 risk factors were detected: age, playing in the backyard, and district of residence. Presence of *Lutzomyia* sandflies and dogs in the house appeared as protective factors (Table 2).

In terms of incidence of asymptomatic infection measured by DTH, children who lived in Vila Nova district and who reported *Lutzomyia* sandflies or dogs in the house/neighbourhood or AVL in relatives were at increased risk of infection. According to ELISA, child's age, playing around the house between 18:00 and 20:00 and residence in Vila Nova district were associated with infection (Table 3).

The male sex was not found to be a risk factor of infection. The houses in Bom Viver were in better conditions than those in Vila Nova. However, living in

**Table 1. Unadjusted analysis of the initial prevalence of asymptomatic *L. chagasi* infection measured by DTH and ELISA (Raposa-Maranhão, Brazil, 1997)**

Variable	DTH ( <i>n</i> = 639)				ELISA ( <i>n</i> = 638)			
	<i>n</i>	Positive (%)	RR (95% CI)	<i>P</i>	<i>n</i>	Positive (%)	RR (95% CI)	<i>P</i>
Age (months)				0.027				0.500
0-23	231	13	1.00		227	12	1.00	
24-47	225	21	1.64 (1.08-2.49)		226	14	1.24 (0.76-2.01)	
48-71	183	22	1.73 (1.13-2.64)		185	15	1.32 (0.81-2.14)	
Gender				0.665				0.605
Female	334	18	1.00		332	14	1.00	
Male	305	19	1.08 (0.77-1.51)		306	13	0.90 (0.60-1.34)	
Chronic malnutrition				0.970				0.752
No	477	19	1.00		480	14	1.00	
Yes	162	19	0.99 (0.67-1.47)		158	13	0.92 (0.55-1.54)	
Play				0.915				0.295
Indoors	587	19	1.00		590	13	1.00	
Outdoors	52	19	1.04 (0.54-1.97)		48	19	1.44 (0.73-2.83)	
Bathing place				0.002				0.406
Indoors	111	7	1.00		111	16	1.00	
Outdoors	528	21	2.92 (1.46-5.82)		527	13	0.80 (0.46-1.36)	
Father's literacy				0.279				0.909
Can read and write	350	20	1.00		352	14	1.00	
Cannot read or write	289	17	0.82 (0.57-1.18)		286	13	0.97 (0.62-1.52)	
Mother's literacy				0.921				0.438
Can read and write	443	19	1.00		442	14	1.00	
Cannot read or write	196	18	0.98 (0.66-1.45)		196	12	0.82 (0.50-1.35)	
Districts				0.148				<0.001
Bom Viver	348	16	1.00		348	7	1.00	
Vila Nova	291	21	1.30 (0.91-1.86)		290	22	3.29 (1.94-5.56)	
Type of housing				0.141				0.427
Bricks/tiles/cement/ceramic	55	11	1.00		57	9	1.00	
Mud walls/straw/earthen	584	19	1.77 (0.83-3.80)		581	14	1.59 (0.51-4.98)	
<i>Lutzomyia</i> sandflies in house				0.603				0.413
No	219	17	1.00		220	12	1.00	
Yes	420	19	1.11 (0.75-1.66)		418	14	1.21 (0.76-1.94)	
Spraying last year				0.205				0.629
Yes	536	20	1.00		537	14	1.00	
No	103	14	0.69 (0.39-1.22)		101	12	0.86 (0.47-1.57)	
Animals in house/ neighbourhood				0.804				0.011
None	249	20	1.00		253	16	1.00	
Chickens	181	17	0.87 (0.56-1.36)		180	7	0.42 (0.21-0.83)	
Dogs	121	21	1.05 (0.65-1.69)		119	21	1.33 (0.80-2.21)	
Chickens and dogs	88	16	0.81 (0.44-1.49)		86	11	0.66 (0.31-1.40)	
AVL in relatives				0.019				0.014
No	618	18	1.00		618	13	1.00	
Yes	21	38	2.12 (1.13-3.98)		20	30	2.32 (1.18-4.54)	
AVL in neighbours				0.794				0.913
No	610	19	1.00		610	13	1.00	
Yes	29	21	1.12 (0.49-2.56)		28	14	1.06 (0.36-3.16)	

DTH, delayed type hypersensitivity skin test with *L. amazonensis* antigen; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay for serum antibodies against *L. chagasi* antigen; RR (95% CI), relative risk (95% confidence interval); AVL, American visceral leishmaniasis.

a mud house with a straw roof and an earthen floor was not a risk factor for infection.

With respect to parental literacy, 31% of mothers and 46% of fathers did not know how to read or write. Nevertheless, illiteracy was not shown to be associated with increased risk of infection. The prevalence of chronic malnutrition among the children in the 2 phases of the study was high (25.5% and 26.0%, respectively), but this was not shown to be a risk factor in either analysis.

#### Adjusted analysis of infection

Using initial prevalence as the outcome, bathing out-

side the house and reporting AVL cases in relatives were risk factors for infection as measured by DTH. In addition, children who lived in Vila Nova district had a higher risk of infection according to ELISA, whereas the presence of chickens in the house or in the neighbourhood seemed to protect them from infection (Table 4). Regarding final prevalence as measured by DTH, child's age, residence in Vila Nova district, reporting AVL in relatives, presence of chickens or dogs in the house or in the neighbourhood and reporting the presence of *Lutzomyia* sandflies in the house were associated with increased risk of infection. When ELISA tests were considered, playing outdoors was also

**Table 2. Unadjusted analysis of the final prevalence of asymptomatic *L. chagasi* infection measured by DTH and ELISA (Raposa-Maranhão, Brazil, 1998)**

Variable	DTH (n = 572)				ELISA (n = 572)			
	n	Positive (%)	RR (95% CI)	P	n	Positive (%)	RR (95% CI)	P
Age (months)				0.270				<0.001
0-23	137	13	1.00		137	21	1.00	
24-47	214	20	1.53 (0.94-2.49)		214	33	1.57 (1.10-2.24)	
48-78	221	25	1.93 (1.19-3.13)		221	44	2.07 (1.46-2.95)	
Sex				0.989				0.165
Female	293	20	1.00		293	37	1.00	
Male	279	20	1.00 (0.72-1.38)		279	32	0.85 (0.67-1.07)	
Chronic malnutrition				0.273				0.876
No	410	19	1.00		410	35	1.00	
Yes	162	24	1.22 (0.86-1.73)		162	34	0.98 (0.76-1.26)	
Play				0.718				<0.001
Indoors	523	21	1.00		523	32	1.00	
Outdoors	49	18	0.89 (0.47-1.68)		49	59	1.84 (1.41-2.40)	
Bathing place				0.502				0.170
Indoors	100	18	1.00		100	28	1.00	
Outdoors	472	21	1.17 (0.75-1.82)		472	36	1.28 (0.90-1.82)	
Father's literacy				0.342				0.411
Can read and write	307	19	1.00		307	33	1.00	
Cannot read or write	265	22	1.18 (0.84-1.65)		265	36	1.10 (0.88-1.39)	
Mother's literacy				0.832				0.147
Can read and write	391	20	1.00		391	32	1.00	
Cannot read or write	181	21	1.04 (0.73-1.48)		181	39	1.19 (0.94-1.51)	
Districts				<0.001				<0.001
Bom Viver	312	14	1.00		312	28	1.00	
Vila Nova	260	29	2.07 (1.44-2.96)		260	43	1.55 (1.23-1.96)	
Type of housing				0.052				0.784
Bricks/tiles/ cement/ceramic	52	10	1.00		52	33	1.00	
Mud walls/straw/ earthen	520	22	2.24 (0.99-5.04)		520	35	1.06 (0.70-1.59)	
<i>Lutzomyia</i> sandflies in house				0.005				0.012
No	190	13	1.00		190	42	1.00	
Yes	382	24	1.83 (1.21-2.78)		382	31	0.74 (0.59-0.94)	
Spraying last year				0.293				0.096
Yes	479	21	1.00		479	33	1.00	
No	93	16	0.76 (0.45-1.27)		93	42	1.27 (0.96-1.69)	
Animals in house/ neighbourhood				0.004				0.087
None	218	15	1.00		218	38	1.00	
Chickens	164	23	1.54 (0.99-2.39)		164	34	0.89 (0.67-1.18)	
Dogs	106	32	2.19 (1.41-3.39)		106	25	0.65 (0.45-0.95)	
Chickens and dogs	84	17	1.14 (0.62-2.08)		84	41	1.08 (0.80-1.45)	
AVL in relatives				<0.001				0.594
No	552	19	1.00		552	34	1.00	
Yes	20	60	3.15 (1.99-5.00)		20	40	1.17 (0.66-2.07)	
AVL in neighbours				0.547				0.734
No	545	20	1.00		545	34	1.00	
Yes	27	26	1.28 (0.57-2.90)		27	37	1.08 (0.69-1.68)	

For explanation of the abbreviations, see the footnote to Table 1.

identified as a risk factor for infection. In contrast to DTH results, the presence of dogs and *Lutzomyia* sandflies in the house appeared to confer protection against *L. chagasi* infection according to the ELISA test.

Using incidence as a measure of infection, according to DTH, residence in Vila Nova district, presence of dogs in the house or in the neighbourhood and reporting AVL in relatives conferred a higher risk of infection. By the ELISA test, children aged 24-48 months who played outside the house between 18:00 and 20:00 and lived in Vila Nova district were at increased risk for infection. In contrast, presence of *Lutzomyia* sandflies

in the house appeared to protect children from infection (Table 4).

### Discussion

In this study, 6 outcome measures were used. The variables that were most relevant and may thus predict the risk of asymptomatic infection by *L. chagasi* were district of residence, reporting AVL in relatives and child's age. Some variables appear to increase the risk of infection in some analyses but not in others, as was the case for playing outdoors in the early evening. Use of an outdoor bathroom predicted infection only once.

Presence of *Lutzomyia* sandflies in the house was

**Table 3. Unadjusted analysis of the incidence of asymptomatic *L. chagasi* infection measured by DTH and ELISA (Raposa-Maranhão, Brazil, 1998)**

Variable	DTH (n = 469)				ELISA (n = 485)			
	n	Positive (%)	RR (95% CI)	P	n	Positive (%)	RR (95% CI)	P
Age (months)				0.194				<0.001
0-23	123	11	1.00		118	19	1.00	
24-47	169	11	0.94 (0.50-1.74)		184	31	1.66 (1.09-2.52)	
48-78	177	17	1.49 (0.82-2.71)		183	44	2.37 (1.58-3.57)	
Sex				0.710				0.367
Female	245	13	1.00		246	35	1.00	
Male	224	14	1.09 (0.68-1.75)		239	31	0.89 (0.68-1.15)	
Chronic malnutrition				0.869				0.590
No	337	13	1.00		347	34	1.00	
Yes	132	14	1.04 (0.62-1.75)		138	31	0.92 (0.69-1.23)	
Play				0.147				0.001
Indoors	429	14	1.00		448	31	1.00	
Outdoors	40	5	0.36 (0.09-1.44)		37	54	1.73 (1.24-2.41)	
Bathing place				0.955				0.059
Indoors	92	13	1.00		82	23	1.00	
Outdoors	377	13	1.02 (0.57-1.82)		403	35	1.51 (0.98-2.32)	
Father's literacy				0.144				0.196
Can read and write	247	11	1.00		260	31	1.00	
Cannot read or write	222	16	1.44 (0.88-2.36)		225	36	1.18 (0.92-1.53)	
Mother's literacy				0.370				0.117
Can read and write	319	12	1.00		329	31	1.00	
Cannot read or write	150	15	1.25 (0.76-2.06)		156	38	1.23 (0.95-1.60)	
Districts				<0.001				0.001
Bom viver	263	7	1.00		287	27	1.00	
Vila Nova	206	21	3.12 (1.79-5.45)		198	41	1.52 (1.18-1.97)	
Type of housing				0.054				0.419
Bricks/tiles/cement/ceramic	46	2	1.00		47	28	1.00	
Mud walls/straw/earthen	423	14	6.63 (0.97-45.59)		438	34	1.21 (0.76-1.94)	
<i>Lutzomyia</i> sandflies in house				0.028				0.069
No	159	8	1.00		164	38	1.00	
Yes	310	16	1.93 (1.07-3.48)		321	30	0.79 (0.61-1.02)	
Spraying last year				0.924				0.157
Yes	388	13	1.00		407	32	1.00	
No	81	14	1.03 (0.53-2.02)		78	40	1.25 (0.92-1.72)	
Animals in house/ neighbourhood				0.032				0.636
None	180	10	1.00		181	35	1.00	
Chickens	135	14	1.41 (0.75-2.63)		150	33	0.94 (0.69-1.28)	
Dogs	84	23	2.26 (1.23-4.17)		81	27	0.78 (0.52-1.18)	
Chickens and dogs	70	9	0.86 (0.35-2.08)		73	36	1.02 (0.72-1.46)	
AVL in relatives				0.042				0.889
No	457	13	1.00		472	33	1.00	
Yes	12	33	2.63 (1.04-6.66)		13	31	0.93 (0.34-2.54)	
AVL in neighbours				0.963				0.578
No	447	13	1.00		464	33	1.00	
Yes	22	14	1.03 (0.26-4.15)		21	38	1.16 (0.68-1.98)	

For explanation of the abbreviations, see the footnote to Table 1.

found to be a risk factor for infection in one analysis (final prevalence as measured by DTH), whereas in 2 other analyses it appeared to be protective, as was the case for final prevalence and incidence according to the ELISA test. Presence of animals in the house or in the neighbourhood showed the same behaviour. In 2 analyses (final prevalence and incidence according to DTH) the presence of dogs or chickens tended to increase the risk of asymptomatic infection. However, according to ELISA, presence of chickens appeared to protect children from infection in the case of initial prevalence and the presence of dogs seemed to decrease the risk of infection in the final prevalence analysis.

What may be the reasons for these inconsistencies between the 6 analyses? At first, 3 different endpoints of infection were used: initial prevalence, final prevalence and incidence. Asymptomatic infection was identified by 2 different tests: DTH and ELISA. These 2 tests measure different types of the immune response and thus are not likely to produce the same results. In the case of presence of *Lutzomyia* sandflies and animals in the house, DTH identified these variables as risk factors, whereas ELISA identified them as protective factors. Other reasons for this might be random error or confounding by other factors not accounted for in the analysis. In addition, past insecticide spraying and

**Table 4. Adjusted analysis of the initial prevalence, final prevalence and incidence of asymptomatic *L. chagasi* infection measured by DTH and ELISA (Raposa-Maranhão, Brazil, 1998)**

Variable	DTH		ELISA	
	RR (95% CI)	P	RR (95% CI)	P
<b>Initial prevalence</b>				
Bathing place		0.002		
Indoors	1.00			
Outdoors	2.97 (1.49–5.90)			
Districts				<0.001
Bom Viver			1.00	
Vila Nova			2.98 (1.75–5.07)	
AVL in relatives		0.012		
No	1.00			
Yes	2.23 (1.19–4.27)			
Animals in house/neighbourhood				0.062
None			1.00	
Chickens			0.51 (0.26–0.99)	
Dogs			1.31 (0.80–2.16)	
Chickens and dogs			0.75 (0.37–1.53)	
<b>Final prevalence</b>				
Age (months)		0.053		<0.001
0–23	1.00		1.00	
24–47	1.55 (0.97–2.48)		1.56 (1.10–2.21)	
48–78	1.81 (1.12–2.92)		2.19 (1.56–3.05)	
Play				<0.001
Indoors			1.00	
Outdoors			1.69 (1.29–2.22)	
Districts		<0.001		<0.001
Bom Viver	1.00		1.00	
Vila Nova	2.02 (1.42–2.87)		1.58 (1.26–1.97)	
AVL in relatives		0.008		
No	1.00			
Yes	1.98 (1.19–3.29)			
Animals in house/neighbourhood		0.014		0.017
None	1.00		1.00	
Chickens	1.65 (1.07–2.54)		0.94 (0.72–1.24)	
Dogs	1.98 (1.29–3.05)		0.64 (0.44–0.91)	
Chickens and dogs	1.26 (0.71–2.22)		1.19 (0.88–1.60)	
<i>Lutzomyia</i> sandflies in house		0.019		0.009
No	1.00		1.00	
Yes	1.65 (1.08–2.51)		0.75 (0.60–0.93)	
<b>Incidence</b>				
Age (months)				<0.001
0–23			1.00	
24–47			1.66 (1.10–2.51)	
48–78			2.38 (1.60–3.56)	
Play		0.076		0.015
Indoors	1.00		1.00	
Outdoors	0.26 (0.06–1.15)		1.51 (1.08–2.10)	
Districts		<0.001		0.001
Bom Viver	1.00		1.00	
Vila Nova	3.10 (1.77–5.44)		1.52 (1.18–1.95)	
<i>Lutzomyia</i> sandflies in house				0.033
No			1.00	
Yes			0.77 (0.60–0.98)	
Animals in house/neighbourhood		0.027		
None	1.00			
Chickens	1.67 (0.88–3.16)			
Dogs	2.15 (1.21–3.82)			
Chickens and dogs	0.92 (0.40–2.14)			
AVL in relatives		0.034		
No	1.00			
Yes	2.61 (1.08–6.34)			

For explanation of the abbreviations, see the footnote to Table 1.

presence of *Lutzomyia* sandflies were determined using the questionnaire. Even though the 2 communities had been recently exposed to a comprehensive programme of health education regarding prevention of AVL, differential misclassification might have distorted some

results. Residual confounding is another possibility due to this probable misclassification in the assessment of these 2 variables. However, if differential misclassification had affected the results it would have been expected to produce distortion in only one direction. This

is not completely in agreement with what was observed, since presence of *Lutzomyia* sandflies was found to be a risk factor in some analyses but not in others. These inconsistencies are most probably linked to the type of test used to detect infection. Our results are in agreement with some reports that have revealed that DTH is more sensitive in detecting early infection whereas ELISA is more sensitive in identifying symptomatic infection (BADARÓ *et al.*, 1986b; DYE *et al.*, 1993; FNS, 1996). Underreporting of past spraying was more likely to have occurred and may have produced some degree of non-differential misclassification and a bias towards the null.

Children aged  $\geq 2$  years had a higher relative risk for infection than those aged  $< 2$  years. This finding is consistent with those obtained by BADARÓ *et al.* (1986a) in Jacobina, Bahia, Brazil, where the frequency of infection rose after 1 year of age, and with those of PAMPIGLIONE *et al.* (1975) obtained in Mediterranean regions, and is also in agreement with observations by ALI & ASHFORD (1993) in Ethiopia. It is important to note that prevalence of infection tends to increase with age since there is little or no immunological recovery from infection as measured by DTH. However, recovery from ELISA may be significant. This may explain why age was not associated with infection when the outcome measure was initial prevalence, whereas it was associated with infection when final prevalence was considered. On this basis, variation in incidence with age is more elucidative and age was also associated with increased risk of infection as measured by ELISA.

It was also noted that Vila Nova children experienced a relative risk of infection 3 times greater than Bom Viver children. This difference was probably due to a more intense migratory process or to a higher *Lutzomyia longipalpis* density in Vila Nova than in Bom Viver. With increased migration, more susceptible individuals enter the area, some taking with them their infected dogs, and are at greater risk of becoming infected and presenting as new cases of the illness (EVANS *et al.*, 1992; FNS, 1996).

The study showed that living conditions in Vila Nova and Bom Viver are precarious. Studies carried out in the state of Pará have shown that children living in areas of land occupations are at increased risk for AVL due to the large number of susceptible people settling in the area, increases in population density of *Lu. longipalpis* and living conditions that may encourage the vector's entry, especially in the more open-built houses (SILVEIRA *et al.*, 1997). In our study, however, the type of dwelling did not represent a risk factor. The *Lutzomyia* sandfly is found throughout all of São Luís city (REBÊLO *et al.*, 1996), including zones at the periphery of urban conglomerations. In Bom Viver it predominates over other species (97% of all species captured were *Lu. longipalpis*), and has as easy targets young children who tend to sleep wearing little or no clothing, leaving the body's surface exposed (ARAÚJO *et al.*, 2000).

Reporting AVL in relatives was associated with infection, in agreement with PAMPIGLIONE *et al.* (1975) who detected a higher infection rate in those who had reported cases in relatives or in neighbours in Emilia Romagna and Sicily in the Mediterranean region. ABRAMSON *et al.* (1995) showed that infection among those who had experienced contact with AVL cases can suggest the occurrence of subclinical infections in many people in endemic areas.

It is known that transmission of AVL occurs through the bite of a *Lutzomyia* sandfly, and therefore in some analyses the presence of these insects in the peri- and intradomestic areas was a risk factor for infection by *L. chagasi*, as also was the presence of dogs and chickens. The presence of chickens circulating around the house may increase the population density of *Lu. longipalpis*. The domestication of the vector *Lu. longipalpis*

can be stimulated by factors such as recent urbanization with the derangement of the ecology, by the food sources of humans and animals (dogs, chickens), by abundant tree planting in backyards and by the accumulation of waste (WHO, 1990), characteristics that were common in the study area. The role of chickens in the epidemiology of AVL is a possibility raised by one of our analyses that remains open to debate. However, the lack of consistency of this association found in the present study argues against this possibility. Moderate or severe malnutrition was not found to be linked with infection either in the adjusted or non-adjusted cases for the 2 parameters used. BADARÓ *et al.* (1986a), while studying risk factors associated with AVL in Jacobina, Bahia, verified that in areas of highest incidence of the disease a 2-year-old child had a 1 in 10 chance of being infected, and, if infected, a 1 in 4 chance of developing the disease. If a similar child suffered from malnutrition, the probability of developing the disease was 1:2. CERF *et al.* (1987) reported that children with severe or moderate malnutrition were exposed to an 8.7-fold risk of developing the disease.

Our data, compared to previous studies, illustrate that risk factors for visceral leishmaniasis may vary among different settings and populations. This observation is not unexpected in a disease with multiple risk factors. In such cases, the role of a single factor is dependent on the role played by other components. Studies in different areas will contribute to a clearer worldwide picture of the most relevant risk factors for visceral leishmaniasis. In addition, new research may contribute to the elucidation of the reasons for some unexpected associations found in this study.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by grants AI-30639 from the National Institute of Health and PRONEX, Brazilian National Research Council (CNPq). A. Barral is a Senior Researcher of CNPq. We thank Mr Benedito Silva and Mr Paulo Márcio Nunes, students from the Federal University of Maranhão, for technical assistance. We are also indebted to Dr Manoel Barral-Netto for his critical comments.

#### References

- Abramson, M. A., Dietze, R., Frucht, D. M., Schwantz, R. & Kenney, R. T. (1995). Comparison of New and Old World leishmanins in an endemic region of Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 20, 1292-1297.
- Ali, A. & Ashford, R. W. (1993). Visceral leishmaniasis in Ethiopia. I. Cross-sectional leishmanin skin test in an endemic locality. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 87, 157-161.
- Araújo, J. A. C., Rebêlo, J. M. M., Carvalho, M. L. & Barros, V. L. L. (2000). Composição dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de Raposa-MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. *Entomologia y Vectores*, 7, 33-47.
- Badaró, R., Jones, T. C., Carvalho, E. M., Pedral-Sampaio, D., Reed, S. G., Barral, A., Teixeira, R. & Johnson, W. D. Jr (1986a). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 154, 1003-1011.
- Badaró, R., Reed, S. G., Barral, A., Orge, G. & Jones, T. C. (1986b). Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection specific responses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35, 72-78.
- Badaró, R., Jones, T. C., Lourenço, R., Cerf, B. J., Sampaio, D., Carvalho, E. M., Rocha, H., Teixeira, R. & Johnson, W. D. Jr (1986c). A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, 154, 639-649.
- Carvalho, E. M., Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Barral-Netto, M., Badaró, R., Rocha, H. & Johnson, W. D. Jr (1992). Immunological markers of clinical evolution in children recently infected with *L. donovani chagasi*. *Journal of Infectious Diseases*, 165, 535-540.
- Carvalho, E. M., Bacellar, O., Brownell, C., Regis, I., Coffman, R. L. & Reed, S. G. (1994). Restoration of IFN- $\gamma$

- production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 152, 5949–5956.
- Cerf, B. J., Jones, T. C., Sampaio, D., Teixeira, R. & Johnson, W. D. Jr (1987). Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 156, 1030–1033.
- Cox, D. R. (1972). Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society B*, 34, 187–220.
- Cuba, C. A. C., Marsden, P. D., Barreto, A. C., Jones, T. C. & Richards, F. (1985). The use of different concentrations of leishmanial antigen in the skin testing to evaluate delayed hypersensitivity in American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 18, 231–236.
- Dye, C., Vidor, E. & Dereure, J. (1993). Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiology and Infection*, 103, 647–656.
- Evans, T. G., Vasconcelos, I. A. B., Lima, J. W., Teixeira, J. M., McAulliffe, I. T., Lopes, U. G., Pearson, R. D. & Vasconcelos, A. W. (1992). Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, 166, 1124–1132.
- FNS, Fundação Nacional de Saúde (1996). *Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar)*. Brasília: Ministério da Saúde, Brasil.
- Gama, M. E. A., Barbosa, J. S., Pires, B., Cunha, A. K. B., Freitas, A. L., Ribeiro, I. R. & Costa, J. M. L. (1997). Avaliação do nível de conhecimento que a população residente em áreas endêmicas periurbana e rural tem sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 14, 109–118.
- Jahn, A., Lelmatt, J. L. & Diesfeld, H. J. (1986). Seroepidemiological study on kala-azar in Baringo District, Kenya. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89, 91–104.
- Lee, J. (1994). Odds ratio or relative risk for cross-sectional data? *International Journal of Epidemiology*, 23, 201–203.
- Lin, D. Y. & Hei, L. J. (1989). The robust inference for the Cox proportional hazards model. *Journal of the American Statistical Association*, 84, 1074–1078.
- Pampiglione, S., Manson-Bahr, P. E. C., La Placa, M., Borgatti, M. A. & Musumeci, S. (1975). Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 69, 60–68.
- Rebêlo, J. M. M., Mendes, W. A., Costa, J. M. L. & Cavaleiro, N. (1996). Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do Estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 12, 545–549.
- Reed, S. G., Badaró, R., Mansur, H., Carvalho, E. M., Lourenço, R., Lisboa, A., Teixeira, R., Johnson, W. D. Jr & Jones, T. C. (1986). Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35, 79–85.
- Silveira, F., Shaw, J. J., Bichara, C. N. C. & Costa, J. M. L. (1997). Leishmaniose visceral americana. In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*, Leão, R. N. C. (coord.), Belém, Cejup: UEPA, 40, 631–644.
- Stata Corporation (1997). *Stata Reference Manual release 5*. Texas: Stata corporation.
- Waterlow, J. C. (1972). Classification and definition of protein-calorie malnutrition. *British Medical Journal*, iii, 566–569.
- Waterlow, J. C., Buzina, R., Keller, W., Lane, J. M., Nichaman, M. Z. & Tanner, J. M. (1977). The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bulletin of the World Health Organization*, 55, 489–498.
- WHO (1990). *Control of Leishmaniasis*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Technical Report Series, no. 793.
- WHO Working Group (1986). Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. *Bulletin of the World Health Organization*, 64, 924–941.

Received 30 May 2000; revised 4 June 2001; accepted for publication 7 June 2001

## Book Review

**Malaria in Sri Lanka: Current Knowledge on Transmission and Control.** F. Konradsen, F. P. Amerasinghe, W. van der Hoek & P. H. Amerasinghe. Colombo: International Water Management Institute, 2000. xiv+77pp. Price US\$20.00 (US\$10.00 in developing countries). ISBN 92-9090-406-2.

This useful volume sets out to provide a comprehensive account of malaria in Sri Lanka for students, researchers and the malaria-control community in that country. This book can also provide profitable reading for the malariologist whose geographical focus lies elsewhere, as Sri Lanka has a famous history of providing high-quality primary health care (PHC), and thus is an important model of the role that PHC can play in malaria-endemic regions. Sri Lanka is also considered perhaps the prime example of a country that achieved the virtual eradication of malaria in the 1960s, only to see its resurgence in the latter years of that decade.

The authors of *Malaria in Sri Lanka* are most comfortable approaching malaria from the vector-control perspective. There is a strong chapter on the biology of Sri Lankan anopheline vectors, and informative discussion, in the 'Malaria control' chapter, of the peculiarities of the ancient Sri Lankan irrigation systems and its 'tanks' as vector breeding sites. Some otherwise obscure work, such as that on evidence for multiple blood feeding by *Anopheles culicifacies*, is given a mostly deserved airing in stand-alone 'boxes' interspersed throughout the text. My preference would have been for more depth in the area of parasite biology. Further

discussion of the development and spread of resistance to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine as it relates to the specific epidemiology of malaria (vivax and falciparum) on the island would also have been welcome.

In contrast to many familiar African endemic settings where the acquisition of immunity is almost universal, Sri Lanka's malaria patients are very likely to be adults, and asymptomatic infections are rare. The chapter on immunity is thus of general interest to malariologists, and the important contribution of K. N. Mendis and her colleagues is heavily drawn upon. Some of the most important investigations of transmission-blocking immunity, for example, are from Sri Lanka. Whereas both *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* are discussed in the context of particular studies, there is unfortunately no consideration of interactions between these 2 species in Sri Lanka, such as those observed in endemic areas in the Western Pacific.

This slim, readable book will be particularly valuable for students specializing in malaria and disease control, providing in one volume a useful treatment of most aspects of malaria. For researchers and professionals working outside Sri Lanka its main interest lies in the contrast between the island's particular experience of malaria, and that of the other endemic regions in which we work.

Colin Sutherland

Department of Infectious and Tropical Diseases  
London School of Hygiene and Tropical Medicine  
Keppel Street  
London WC1E 7HT, UK

## Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís-MA, Brasil

*Leishmania (Leishmania) chagasi* infection on childhood from endemic area of visceral leishmaniasis in the São Luís-MA, island

Arlene J.M. Caldas<sup>1</sup>, Denise R.C. Silva<sup>1</sup>, Célia C.R. Pereira<sup>1</sup>, Paulo Márcio S. Nunes<sup>2</sup>, Benedito P. Silva<sup>2</sup>, Antonio Augusto M. Silva<sup>3</sup>, Aldina Barral<sup>4</sup> e Jackson M.L. Costa<sup>22</sup>

**Resumo** Realizou-se estudo prospectivo com 648 crianças de zero a cinco anos no município da Raposa-MA, de julho/97 a junho/98, com o objetivo de avaliar as características da infecção por *L. (L.) chagasi* e verificar se existe associação entre desnutrição e infecção assintomática. Utilizou-se questionário com dados socioeconômicos, ambientais e hábitos de vida; realizou-se Intradermorreação de Montenegro (IDRM) com antígeno de *L. amazonensis* e Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para detectar infecção, e exame antropométrico. A prevalência inicial, final e incidência da infecção foram 18,6%, 20,6% e 10,8% pelo IDRM, e 13,5%, 34,4% e 28% pelo ELISA, respectivamente. A prevalência da desnutrição crônica (altura/idade) foi 26%. Não houve associação estatisticamente significativa entre desnutrição e infecção assintomática por *L. (L.) chagasi*. A forma assintomática da doença está presente nas áreas estudadas, necessitando de medidas de controle mais efetivas.

**Palavras-chaves:** Infecção. *L. (L.) chagasi*. Prevalência. Incidência. Crianças.

**Abstract** A prospective study was undertaken in 648 children with less than 6 years of age in the municipality of Raposa, Maranhão, Brazil, from June 1997 to June 1998, to evaluate the characteristics of the infection by *L. (L.) chagasi* and verify if there is an association between malnutrition and asymptomatic infection. A standardized questionnaire was used containing socioeconomic, environmental and behavioral data. Montenegro skin reaction (IDRM) with *L. amazonensis* and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test to detect infection, and anthropometric examination were performed. Initial and final prevalence and incidence of infection were 18.6%, 20.6% and 10.8% as measured by IDRM and 13.5%, 34.4% and 28% according to ELISA. The prevalence of chronic malnutrition was 26%. No association was detected between malnutrition and asymptomatic infection by *L. (L.) chagasi*. More effective control measures are needed in these areas since asymptomatic infection seems to be on the increase.

**Key-words:** Infection *L. (L.) chagasi*. Prevalence. Incidence. Children.

Entre as formas clínicas das leishmanioses, a leishmaniose visceral (LV) ou calazar constitui-se na mais grave, pois, quando não tratada adequadamente, determina elevados índices de letalidade. Encontra-se amplamente distribuída no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África, e Américas<sup>11 15 18 25</sup>.

No continente americano é conhecida como leishmaniose visceral americana (LVA), tendo maior prevalência em crianças na faixa etária de zero a nove anos, correspondendo a 80% dos casos detectados,

ocorrendo com frequência em regiões onde a pobreza e desnutrição são comuns<sup>4 5 6 7 10 11 18 25</sup>.

Embora seja uma doença predominante na área rural<sup>9</sup>, recentemente tem-se estabelecido em áreas urbanas ou periurbanas, onde o vetor encontra condições ambientais propícias para a manutenção do seu ciclo de vida. Os estudos dos casos humanos têm revelado a ocorrência de um processo de urbanização da LVA no Brasil, principalmente em cidades de médio e grande porte do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, tais como: São Luís-MA, Teresina-PI,

1. Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Maranhão, 2. Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social da Universidade Federal do Maranhão 3. Departamento de Saúde Pública da Universidade Federal do Maranhão, São Luís MA, 4. Departamento de Imunologia da Universidade Federal da Bahia Salvador BA.

Endereço para correspondência: Prof<sup>a</sup> Arlene de Jesus Mendes Caldas. Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social/UFMA. Praça Madre Deus 2, 65025-560 São Luís, MA.

Fax: 55 98 232-3837; 222-51 35

e-mail: ajmc@elo.com.br

Recebido para publicação em 16/7/1999.



Fortaleza-CE, Natal-RN, Rio de Janeiro-RJ, e Belo Horizonte-MG<sup>6 7 9 10 11 18 19 20</sup>.

Sugere-se que tais mudanças sejam atribuídas a fatores inter-relacionados como: transformações ocorridas no ambiente devido ao processo migratório provocados por pressões socioeconômicas; pauperização em função da má distribuição de renda levando ao êxodo rural principalmente nas áreas do Nordeste que sofrem de secas periódicas, agravando a situação nessas áreas, e o aparecimento de novos focos da doença devido ao processo de urbanização crescente nas cidades<sup>6 10 11 18 20</sup>.

Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas de LVA têm demonstrado que um percentual de indivíduos apresentam evidências de infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* sem história de manifestações clínicas, pois os mesmos revelam altas taxas de

indivíduos com sorologia ou IDRMs positivos. Cerca de 20% destes podem apresentar manifestações clínicas, desenvolvendo a chamada forma aguda e os demais podem permanecer assintomáticos ou evoluir para a forma oligossintomática da doença<sup>1 4 11 18 20 25</sup>.

No Brasil, de cada seis indivíduos infectados um desenvolve LVA, embora em alguns Estados essa relação seja bem superior, como na Bahia que foi de 18:1 e no Ceará, 11:1<sup>4 5 10</sup>. Nos estudos realizados no Quênia esta relação foi de 5:1<sup>25</sup>.

Diante do exposto, realizou-se o presente estudo com a finalidade de avaliar as características da infecção por *L. (L.) chagasi* em crianças de zero a cinco anos residentes em duas áreas de ocupação recentes no município da Raposa-MA e verificar se existe associação entre desnutrição e infecção assintomática por *L. (L.) chagasi*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo epidemiológico prospectivo no período de julho/97 a junho/98, com 648 crianças de zero a cinco anos de idade nas localidades de Vila Nova e Bom Viver no município de Raposa-MA, localizado na Ilha de São Luís, distando 28km da cidade de São Luís, capital do estado do Maranhão. Apresenta área de 63,9km<sup>2</sup> e uma população de 15.075 habitantes distribuídos em 21 localidades, entre elas, Vila Nova com uma população de 2.600 habitantes e Bom Viver com 4.307 habitantes, ambas oriundas de ocupações recentes<sup>14</sup>. A escolha destas duas localidades deveu-se ao elevado número de casos de LVA detectados nos últimos anos pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), caracterizando-as como áreas endêmicas da doença.

O estudo iniciou-se em julho/97, com a realização de inquérito populacional. Em seguida foi planejado e delineado em duas fases: a primeira, de setembro a outubro/97, com a aplicação de um questionário com perguntas abertas e fechadas sobre os dados demográficos, socioeconômicos, ambientais e hábitos de vida das crianças; realização de exame antropométrico e testes de IDRMs e ELISA; e a segunda, de abril a maio/98, com a finalidade de reavaliar o estado imunológico e nutricional das crianças. Durante todo o período de estudo, as crianças com ELISA positivo eram clinicamente avaliadas uma vez por mês. No seguimento do estudo, a vontade e decisão da mãe ou responsável pela criança foram sempre respeitadas. Um termo de consentimento voluntário era assinado.

Realizou-se o teste de IDRMs em 639 crianças na primeira, e 572 na segunda fase do estudo, com antígeno preparado no laboratório de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos (HUPES),

Universidade Federal da Bahia (UFBA), com formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOMBr-88-BA-125) de acordo com a técnica descrita por Reed e cols<sup>22</sup>. Considerou-se como reação positiva quando um dos diâmetros da enduração era igual ou superior a 5mm.

A avaliação sorológica foi realizada em 638 crianças na primeira fase, e 572 na segunda fase, pela técnica ELISA<sup>22</sup>, no laboratório de Imunologia do HUPES. A reação foi considerada positiva quando o nível de absorbância era igual ou superior a 0,045.

O exame antropométrico foi realizado para avaliar a prevalência das diversas formas de desnutrição protéico-calórica e consistiu na medição do peso e altura ou comprimento de cada criança<sup>23 24</sup>.

Analisaram-se os dados no programa EPI-INFO, versão 6.04b, da Organização Mundial da Saúde (OMS). Na análise dos dados referentes à situação nutricional das crianças utilizou-se como referência o padrão do National Center of Health Statistics (NCHS)<sup>23 24</sup> no programa EPINUT. A comparação do estado nutricional foi realizada somente com as crianças que participaram das duas fases do estudo.

Considerou-se como prevalência inicial as crianças com resultados positivos na primeira fase; prevalência final as crianças com resultados positivos na segunda fase e incidência as crianças com resultados negativos na primeira e positivos na segunda fase. O teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar as diferenças entre os eventos do estudo. No caso de frequências esperadas inferiores a 5 foi utilizado o teste de Fisher. Quando o valor de "p" era menor ou igual a 0,05, considerou-se a diferença estatisticamente significativa.

## RESULTADOS

De acordo com o inquérito populacional, Vila Nova era constituída por 361 famílias e Bom Viver por 574. Cada família apresentou uma média de 5,2 pessoas e 3,9 filhos. Destes últimos, 1,6 eram crianças na faixa etária de zero a cinco anos de idade.

Das 648 crianças que participaram do estudo, 298 eram de Vila Nova e 350 de Bom Viver. A idade das crianças variou de 11 dias a 71 meses, concentrando-se o maior percentual na faixa etária de 0 a 23 meses (40%), sendo 48% do sexo masculino e 52% do feminino.

No que diz respeito à renda mensal, constatou-se que a maioria das crianças era oriundas de famílias

com renda inferior a dois salários mínimos (89%). A média da renda familiar era de 1,7 salários mínimos por mês. Com referência à escolaridade, 69% dos pais sabiam ler e escrever.

O tipo de casa predominante era coberta de palha, com paredes de taipa e o piso de chão batido. Segundo os entrevistados não havia coleta pública de lixo, o mesmo era colocado em terreno baldio(29%), enterrado ou queimado(71%). O destino final dos dejetos humanos era fossa negra, no quintal ou mato (93%) (Tabela 1).

No que diz respeito à presença de animais e flebotomíneos no domicílio e vizinhança, mais da

*Tabela 1 - Características socioeconômicas, ambientais e hábitos de vida das crianças de Vila Nova e Bom Viver, Raposa-MA, 1998.*

Características	f	%
Renda familiar mensal		
< 1 a 1,9 salários	576	89,0
≥ 2 salários	72	11,0
Escolaridade dos pais		
sabe ler e escrever	448	69,0
não sabe ler e escrever	200	31,0
Tipo de casa		
palha/taipa/chão batido	581	90,0
telha/alvenaria/cimento ou cerâmica	67	10,0
Lixo		
queimado/enterrado	461	71,0
jogado em terreno baldio	187	29,0
Dejetos		
quintal/mato	602	93,0
fossa séptica	46	7,0
Tipo de animais no Domicílio e vizinhança		
nenhum	239	37,0
cão	108	17,0
galinha	245	38,0
galinha/cão	56	8,0
Presença de flebotomíneos no peri e intradomicílio		
sim	426	66,0
não	222	34,0
Tipo de doença na família e vizinhança		
calazar	32	5,0
outras doenças (tuberculose, gripe, dengue, varicela)	90	14,0
nenhuma doença	526	81,0
Local das necessidades fisiológicas da criança		
dentro de casa	202	31,0
fora de casa	446	69,0
Local do banho da criança		
dentro de casa	112	17,0
fora de casa (quintal)	536	83,0
Local da criança brincar no final da tarde		
ao redor da casa	526	81,0
dentro de casa	122	19,0
<b>Total</b>	<b>648</b>	<b>100,0</b>

f=freqüência

metade dos entrevistados afirmaram a existência de um ou mais de um tipo de animal como cão e/ou galinha, e de *arrupiado*, como é conhecido o flebotômo nas áreas estudadas. A LVA foi citada por 5% das pessoas entrevistadas como doença predominante entre os familiares e vizinhos no último ano (Tabela 1).

As crianças na sua maioria (69%) realizavam as necessidades fisiológicas fora da casa (quintal ou mato) e mais de dois terços tomavam banho no quintal. Observou-se, também, que 81% brincavam ao redor da casa ao entardecer (Tabela 1). Quanto ao estado nutricional, detectou-se uma prevalência de 25,5% na primeira fase e 26% na segunda, de desnutrição no indicador altura/idade. No indicador peso/altura a prevalência foi de 1% nas duas fases e no indicador peso/idade foi de 8% na primeira fase e 10% na segunda. Não houve diferença estatisticamente significativa nas prevalências de desnutrição entre as duas fases do estudo em nenhum indicador (Tabela 2).

Em relação ao teste de IDRM, detectou-se prevalência inicial e final de infecção por *L. (L.) chagasi* de 18,6% e 20,6%, respectivamente, porém a diferença não foi estatisticamente significativa entre as duas fases ( $P=0,420$ ). A incidência foi de 10,8%. Quanto ao ELISA, a prevalência inicial e final foram de 13,5% e 34,4%, respectivamente, entretanto a diferença apresentou-se estatisticamente significativa entre as duas fases ( $P=0,001$ ). A incidência foi de 28% (Tabela 3).

A prevalência inicial do IDRM foi superior à detectada pelo ELISA, sendo a diferença entre ambas estatisticamente significativa ( $P=0,004$ ). Entretanto, a prevalência final e a incidência detectadas pelo ELISA foram superiores às encontradas pelo IDRM ( $P=0,001$ ).

Quando se verificou a associação entre estado nutricional e infecção assintomática por *L. (L.) chagasi* segundo os testes de IDRM e ELISA, observou-se que entre as crianças com desnutrição crônica (altura/idade) 5% e 3,7%, respectivamente, apresentaram positividade aos testes; 0,2% das crianças com desnutrição no indicador peso/idade apresentou IDRM positivo; e 1,4% e 1,2%, respectivamente, apresentaram positividade nos testes quando o indicador era peso/idade. Não houve associação estatisticamente significativa entre desnutridos e infecção assintomática por *L. (L.) chagasi* (Tabela 4).

Das crianças que participaram da primeira fase do estudo, 8 apresentaram história progressiva da doença e 6 desenvolveram LVA durante o estudo. A relação infecção/doença foi de 119:1 segundo IDRM e 28:1 de acordo com ELISA. A positividade da reação de hipersensibilidade retardada foi mais elevada nos pacientes com história progressiva de LVA do que naquelas com doença atual. Entretanto a positividade da resposta humoral não mostrou diferença estatisticamente significativa quando se comparou pacientes com história progressiva e atual de LVA ( $P=0,091$ ) (Tabela 5).

Tabela 2 - Prevalência da desnutrição nas crianças de zero a cinco anos de Vila Nova e Bom Viver, Raposa-MA, 1998.

Indicadores nutricionais	Fases (n=572)				P
	primeira fase		segunda fase		
	f	%	f	%	
Altura/idade					
desnutrido	146	25,5	149	26,0	0,892
eutrófico	426	74,5	423	74,0	
Peso/altura					
desnutrido	6	1,0	7	1,0	0,999
eutrófico	566	99,0	565	99,0	
Peso/idade					
desnutrido	44	8,0	55	10,0	0,293
eutrófico	528	92,0	517	90,0	

Tabela 3 - Prevalência inicial, prevalência final e incidência da infecção assintomática por *L. (L.) chagasi* detectada através de IDRM e ELISA, Raposa-MA, 1998.

Testes	Prevalência inicial		Prevalência final		P	Incidência (n=572)	
	nº	% pos***	nº	% pos.		nº	%
IDRM*	639	18,6	572	20,6	0,420	62	10,8
ELISA**	638	13,5	572	34,4	0,001	160	28,0

\*  $\geq 5\text{mm}$  \*\*  $\geq 0,045$

\*\*\* positivo

Tabela 4 - Indicadores nutricionais e resultados de IDRM e ELISA. Raposa-MA, 1998.

Indicadores nutricionais	IDRM (572)					ELISA (572)				
	pos	%	neg	%	P	pos	%	neg	%	P
<b>Altura/idade</b>										
desnutrido	29	5,0	117	20,0	0,581	21	3,7	125	22,0	0,812
eutrófico	74	13,0	352	61,5		56	9,8	370	64,7	
<b>Peso/altura</b>										
desnutrido	1	0,2	102	18,0	0,999	0	0,0	6	1,0	0,999
eutrófico	5	0,9	464	81,0		77	34,5	489	85,5	
<b>Peso/idade</b>										
desnutrido	8	1,4	95	16,6	0,863	7	1,2	37	6,5	0,791
eutrófico	36	6,3	433	75,7		70	12,2	458	80,0	

Tabela 5 - História pregressa e atual de leishmaniose visceral americana (LVA) e resultados de IDRM e ELISA. Raposa-MA, 1998.

História de LVA	IDRM					ELISA				
	pos*	%	neg**	%	P	pos	%	neg	%	P
Pregressa	8	100,0	0	0,0	0,003	1	12,5	7	87,5	0,091
Atual	1	16,7	5	83,3		4	66,7	2	33,3	

\*positivo

\*\*negativo

## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo sobre as condições socioeconômicas, ambientais e hábitos de vida são relevantes na epidemiologia da LVA. Estas condições podem contribuir para que a LVA seja uma das doenças de maior ocorrência nas zonas rurais e periurbanas de algumas cidades, e também para elevação do índice de infecção por *L. (L.) chagasi* em populações de regiões endêmicas como Vila Nova e Bom Viver no município da Raposa-MA, que possuem características de endemicidade da doença<sup>4 6 7 10 11 14 18 19 25</sup>.

As condições de moradia eram precárias nas duas localidades. A Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), realizada em 1991, demonstrou que existem diferenças marcantes entre os estados do Nordeste em relação ao tipo de moradia. No Maranhão, dois terços das casas são construídas de taipa ou adobe, enquanto no Rio Grande do Norte, somente uma casa em cada dez é assim construída<sup>12 16 17</sup>. Estudos realizados no Estado do Pará, demonstraram que o maior número de casos humanos de LVA envolveram crianças que residiam em áreas de ocupações. Isto se deveu ao fluxo de pessoas suscetíveis para área, aumento da densidade populacional de flebotômíneos ou o tipo de moradia, cuja construção pode favorecer a entrada do vetor, principalmente nas casas de construções mais abertas, similares às casas das duas áreas por nós estudadas, predominando a construção de taipa e cobertura de palha<sup>11 20</sup>. Também foi observado em nosso estudo um processo migratório intenso chegando a influenciar no quantitativo de crianças na segunda fase.

Analisando-se a prevalência inicial e final detectada pelo IDRM, observou-se que não houve diferença significativa nas duas fases e a incidência foi menor que a prevalência, demonstrando portanto que o índice de infecção ficou instável durante o estudo. Entretanto, a prevalência final e incidência da infecção detectadas pelo ELISA foram mais elevadas do que as detectadas pelo IDRM, pode-se explicar devido aos anticorpos serem detectáveis mais precocemente que a resposta da reação de hipersensibilidade retardada<sup>8</sup>. Estes dados confirmam o surto epidêmico vivenciado atualmente na Ilha de São Luis, onde a mesma permanece como a principal área problema de LVA no Estado do Maranhão. Dados confirmados pela FUNASA-MA, que registrou no período de janeiro a dezembro de 1998, 297 (61%) do total de casos da doença no estado, distribuídos por toda a Ilha. As localidades estudadas, de agosto de 1997 a agosto de 1998, vêm apresentando em média dois casos de LVA humano por mês e Araújo e cols<sup>2</sup>, estudando a composição dos flebotômíneos em Bom Viver, encontraram como espécie mais representativa, a *Lutzomyia longipalpis* (97%).

Quando comparou-se o índice de infecção observado em nosso estudo com outros estudos com crianças menores de 15 anos realizados no Ceará (4,5%), na Bahia (16,1%) e no Maranhão (46,7%), observou-se que o nosso índice foi superior aos encontrados nos estudos do Ceará e da Bahia, porém inferiores aos do Maranhão<sup>4 5 10 21</sup>. Talvez esta diferença seja em função da faixa etária e metodologia utilizadas nos respectivos estudos. Quanto à relação infecção/doença, observou-se que houve diferença marcante

entre os dois testes, a infecção foi detectada na proporção de 119:1 no IDRМ e 28:1 no ELISA; portanto, bem superior às proporções encontradas no Quênia, Brasil, Bahia e Ceará<sup>4 5 10 11 21 25</sup>.

Em relação ao estado nutricional das crianças estudadas, verificou-se que os déficits moderado e severo no indicador altura/idade que retratam a desnutrição crônica, foram superiores ao observado na Pesquisa Estadual de Saúde e Nutrição (PNSN) realizada em 1991 no Maranhão (24%), e mais do que o dobro em relação ao Brasil (10,5%)<sup>12 13 16 17 23</sup>. Porém, quando se correlacionou estado nutricional e índice de infecção, notou-se que entre os desnutridos o índice de infecção foi mais acentuado nas crianças com desnutrição crônica. Entretanto, somente 6,6% (IDRM) e 5% (ELISA) das crianças infectadas apresentavam algum grau de desnutrição, demonstrando que a infecção por *L. (L.) chagasi* ocorre nos indivíduos de áreas endêmicas independentemente do estado nutricional.

Os resultados sobre a história de LVA demonstraram que todas as crianças com história pregressa da doença apresentaram IDRМ positivo. Estes dados demonstram que os indivíduos após certo tempo de cura clínica voltam a apresentar resposta imunocelular específica ausente durante a fase ativa da doença. Entretanto, uma criança com IDRМ positivo desenvolveu a doença dois meses após a realização do teste discordando do esperado, pois sabe-se que a imunidade celular desempenha um papel mais relevante que os anticorpos na proteção da infecção mediada por leishmânia<sup>13 22</sup>. O que pode ter acontecido é que, como a criança tinha um ano e dois meses de idade, o sistema imunológico nesta faixa etária é

*vulnerável* e as condições socioeconômicas também favoreceram a instalação da doença.

Existem estudos mostrando que títulos significativos de anticorpos anti-leishmânia podem ser detectados por um período de tempo relativamente longo após a cura da doença<sup>3 4</sup> e isto pôde ser constatado em nosso estudo quando uma criança após um ano de cura clínica apresentou positividade ao ELISA. A persistência da positividade ao ELISA após a terapêutica específica para LVA, leva-nos a concluir que o resultado da sorologia isolada não pode ser utilizada como critério de cura da doença ou falha terapêutica sem antes realizar uma avaliação criteriosa.

Por outro lado, observou-se que dois terços das crianças que adoeceram nos sete meses de estudo apresentaram positividade ao ELISA com nível de absorvância limítrofe (0,045, 0,046, 0,047, 0,050), porém as que apresentaram níveis bem elevados como 0,200 não desenvolveram LVA. Este fato vem explicar que o teste sorológico isolado não deve ser utilizado para confirmação diagnóstica, apesar de que os anticorpos específicos para antígeno do parasito têm sido utilizados, com sucesso, no diagnóstico da LVA quando associado com a clínica, epidemiologia e o exame parasitológico<sup>11 25</sup>.

O elevado índice de infecção por *L.(L.) chagasi* observado nas localidades estudadas sugere a presença de formas assintomáticas da doença nas crianças de zero a cinco anos de idade. Medidas de controle devem ser efetivadas nas áreas de estudo e direcionadas prioritariamente a esta faixa etária onde observa-se o maior número de casos registrados da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade TM, Teixeira R, Andrade JF, Pereira C, Carvalho Filho EM. Estudo da hipersensibilidade do tipo retardado na leishmaniose visceral. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 24:2498-302, 1982.
2. Araújo ACJ, Rebêlo JMM, Carvalho ML, Barros VLL. Composição dos flebotomíneos (diptera, psychodidae) do município da Raposa-MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomologia y Vectores 7:33-47, 2000.
3. Badaró R, Carvalho EC, Orge MLGO, Teixeira RS, Rocha H. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 18:77-83, 1985.
4. Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson Jr WD. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis, Journal of Infectious Diseases 154:1003-1011, 1986.
5. Badaró R Progressos nas pesquisas de leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina-Bahia 1934-1989. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 21:159-164, 1988.
6. Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil. Revista de Saúde Pública 24:361-372, 1990.
7. Costa JML, Viana GMC, Saldanha ACR, Nascimento MDSB, Alvim, AC, Burattini MN, Silva AR Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. Cadernos de Saúde Pública 11: 321-324, 1995.
8. Davies CR, Mazloumi Gaughi AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. Parasitology 119:247-257, 1999.
9. Deane LM. Leishmaniose visceral-estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese (Livro Docência), Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 1956.
10. Evans TG, Vasconcelos IAB, Lima JW, Teixeira JM, McAullife IT, Lopes UG, Pearson RD, Vasconcelos AW. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. Journal Infectious Diseases 166:1124-1132, 1992.

11. Fundação Nacional de Saúde. Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar) - Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, 1996.
12. Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF). Crianças e adolescentes no Maranhão: saúde, educação e trabalho. Governo do Estado, São Luís MA, 1992.
13. Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF). Saúde e nutrição das crianças nordestinas: pesquisas estaduais 1987-1992, 1995.
14. Gama MEA, Barbosa JS, Pires S, Cunha AKB, Freitas AL, Ribeiro IR, Costa JML. Avaliação do nível de conhecimento que a população residente em área endêmica periurbana e rural, têm sobre leishmaniose visceral, estado do Maranhão, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 14:109-118, 1998.
15. Grimaldi Jr G, Thesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 41:687-725, 1989.
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Perfil estatístico de crianças e mães do Brasil: aspectos de saúde e nutrição de crianças no Brasil, 1989. UNICEF, Rio de Janeiro, 1992.
17. Instituto de Alimentação e Nutrição. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios-PND - Maranhão. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 1996.
18. Marzochi MCA, Marzochi KB. Segmentary and visceral leishmaniasis in Brazil: anthrozoenosis and possibilities for their control. Cadernos de Saúde Pública 10:359-75, 1994.
19. Marzochi MCA, Sabroza PC, Toledo LM, Marzochi KB, Tramontano NC, Rangel-Filho, FB. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 1:5-17, 1985.
20. Monteiro FS, Lacerda MN, Arias RR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 27(sup III):67-72, 1994.
21. Nascimento MDSB. Epidemiologia da leishmaniose visceral na Ilha de São Luís, Maranhão- Brasil: análise da dinâmica de transmissão e fatores de riscos relacionados ao desenvolvimento da doença. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1996.
22. Reed SG, Padaró R, Mansur H, Carvalho EM, Lorenço R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson Jr WD, Jones TC. Selection of a skin test antigen for american visceral leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 35:79-85, 1986.
23. Toniai S. Políticas públicas de assistência alimentar e avaliação das ações de saúde e nutrição: estudo em crianças menores de 5 anos em São Luís, Maranhão. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 1996.
24. Victora CG, Huttly SRA, Lombardi C, Voughan JP. Maternal education in relation to early/late child health outcomes: findings from a Brazilian cohort study. Society Science Medicine 34: 899-905, 1992.
25. World Health Organization. Control of leishmaniasis. Word Health Organization, Geneva, 1990.

## Aspectos Epidemiológicos da Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em Crianças de 0 a 5 Anos do Município de Raposa-MA

Realizou-se estudo transversal com 648 crianças de 0 a 5 anos no município de Raposa-MA, de julho a dezembro de 1997, com objetivo de descrever os aspectos epidemiológicos da infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e determinar a prevalência da infecção assintomática da leishmaniose visceral americana (LVA). Utilizou-se um questionário com dados socioeconômicos, ambientais e hábitos de vida e realizou-se Intradermorreação de Montenegro (IDRM) com antígeno de *L. amazonensis* para detecção da infecção. A prevalência da desnutrição crônica (altura/idade) foi de 26% e da infecção por *L. (L.) chagasi* foi 19%. Houve diferença entre as prevalências da infecção de Vila Nova e Bom Vivier. As condições socioeconômicas e ambientais devem estar influenciando no alto índice da forma assintomática da doença nas crianças menores de 5 anos, pois há predominância dos casos de doença nessa faixa etária, necessitando portanto de medidas de controle mais efetivas nas áreas estudadas.

**Unitermos:** Epidemiologia, Infecção por *L. (L.) chagasi*, Prevalência, Intradermorreação de Montenegro

A cross-study was carried out with 648 0-5 children in the city of Raposa-MA, from July to December in 1997, with an aim at describing the epidemiological aspects of the infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and at determining the prevalence of asymptomatic infection by American visceral leishmaniasis (AVL). A questionnaire was used including socioeconomic, environmental and life habit data, and Montenegro intra-dermal reaction (MIDR) was effected with an *L. amazonensis* antigen to detect the infection. The prevalence of chronic malnutrition (height/age) was 26% and of infection by *L. (L.) chagasi* was 19%. There were differences between the prevalence in Vila Nova and Bom Vivier. The socioeconomic and environmental conditions should have influenced the high rate of an asymptomatic form of the disease in children under 5 years old where there is a predominance of disease cases in this age range, showing the need of more effective control measurements in this areas.

**Uniterms:** Epidemiology, Infection by *L. (L.) chagasi*, Prevalence, Montenegro Intra-dermal Reaction



Arlene de Jesus Mendes Caldas  
Professora Assistente da  
Disciplina Enfermagem em  
Doenças Transmissíveis do  
Departamento de Enfermagem da  
UFMA, Mestra em Saúde e  
Ambiente/UFMA e Doutoranda  
em Patologia Experimental/  
FIOCRUZ/UFBA



Jackson Mauricio Lopes Costa  
Professor Titular da Disciplina de  
Doenças Infecciosas e  
Parasitárias do Departamento de  
Patologia da UFMA, Doutor em  
Medicina pela Universidade  
Federal de São Paulo/Escola  
Paulista de Medicina-EPM/SP

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar é uma doença infecciosa de evolução crônica causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, amplamente distribuída no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África e Américas (WHO, 1990; BRASIL, 1996).

Trata-se de uma protozoose de canídeos silvestres (WHO, 1990; BRASIL, 1996), cuja transmissão se faz por meio da inoculação de formas promastigotas infectantes pela picada

da fêmea do *Lutzomyia longipalpis* (REBÊLO et al, 1999). No âmbito doméstico, o cão representa o principal reservatório do agente, sendo responsável pelo caráter endemo-epidêmico da doença. Portanto, a principal transmissão se faz a partir dos reservatórios animais enquanto persistirem o parasitismo na pele ou no sangue circulante.

No homem, o período de incubação da LVA é muito difícil de ser determinado, tendo em vista a impossibilidade de se precisar a data da inoculação, porém, na maioria dos casos, varia de dois a quatro meses. A suscetibilidade é universal,

atingindo pessoas de todas as idades e sexos, entretanto a maior prevalência é em crianças na faixa etária de 0 a 9 anos, correspondendo a 80% dos casos notificados, ocorrendo com frequência em regiões onde a pobreza e a desnutrição são comuns (BRASIL, 1986).

O indivíduo infectado pode permanecer assintomático ou desenvolver sinais e sintomas da doença como febre irregular de longa duração, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, pancitopenia, hipergama-globulinemia e hipo-albuminemia (BRASIL, 1986; WHO, 1990).

Na doença, tanto a imunidade celular como a humoral estão comprometidas. Os níveis séricos de imonoglobulinas (Ig) e frações estão elevados, sobretudo IgG1 e ocasionalmente IgM, levando com frequência a hipergamaglobulinemia (CARVALHO et al, 1995). Observa-se que, mesmo com o estabelecimento da resposta humoral, a doença progride sem sinais de regressão. Com o início do tratamento nota-se redução dos níveis de anticorpos no soro, que caem após a terapêutica.

Os testes de imunidade celular são bastante característicos. A Intradermoreação de Montenegro (IDRM) ou outros antígenos específicos apresentam sempre resposta negativa durante a doença. Trata-se, porém, de imunossupressão específica, o que difere de outras doenças como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), em que a imunossupressão é observada contra diversos antígenos e mitógenos (CARVALHO et al, 1995). No Brasil, existem poucos relatos de co-infecção *Leishmania*/HIV, alguns casos foram apresentados em congressos científicos e poucos publicados em revistas científicas. Destes, podemos citar 17 casos de LVA/HIV ocorridos no período de 1987 a 1998 (RABELLO & ANDRADE, 1998).

Em áreas endêmicas, as infecções assintomáticas e oligossintomáticas da LVA são as mais frequentemente encontradas. No Brasil, estima-se que em áreas endêmicas 7,5% dos indivíduos menores de 15 anos apresentam infecção por *L. (L.) chagasi*. Geralmente essas infecções são detectadas por busca ativa ou por inquérito soro-epidemiológico da população (BADARÓ, 1986; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). Na Ilha de São Luís-MA, observou-se por meio de estudos

preliminares sobre infecção que 46,3% dos indivíduos estavam infectados por *L. (L.) chagasi* (NASCIMENTO, 1996).

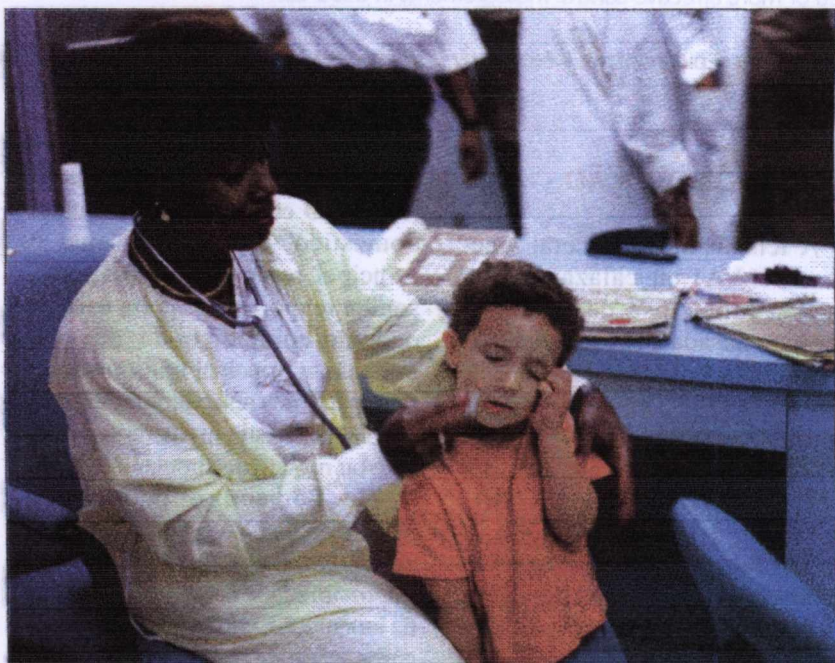
Os casos subclínicos humanos no país têm sido detectados numa proporção de 6:1 em relação à infecção/doença e em alguns estados essa relação tem apresentado taxas superiores, como aconteceu em Jacobina-BA, numa proporção de 18:1, e no Ceará, 11:1 (BADARÓ, 1986; EVANS et al, 1992; CARVALHO et al, 1995).

No estado do Maranhão, a doença é endêmica em 97 (44%) dos municípios, sendo que os da Ilha de São Luís (São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa) detêm 75% dos casos notificados. Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivos descrever os aspectos epidemiológicos da infecção por *L. (L.) chagasi* em crianças de 0 a 5 anos e determinar a prevalência da infecção assintomática de LVA em Vila Nova e Bom Viver no município de Raposa-MA.

## MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se estudo transversal com 648 crianças de 0 a 5 anos de Vila Nova e Bom Viver/Raposa-MA, no período de julho a dezembro de 1997. O município de Raposa-MA, localizado na Ilha de São Luís, distando 28 km da cidade de São Luís, capital do estado do Maranhão, apresenta área de 63,9 km<sup>2</sup>, população de 15.075 habitantes, distribuídos em 21 localidades, entre elas, Vila Nova com população de 2.600 habitantes e Bom Viver com 4.307 habitantes, ambas oriundas de ocupações recentes. A escolha das localidades deu-se por serem consideradas áreas endêmicas de LVA, apresentando incidência anual de 3,3 casos/1.000 habitantes (CALDAS et al, 2001).

O estudo iniciou-se em julho/97, com a realização do censo populacional. Em seguida, procedeu-se à coleta de dados com a aplicação de questionário com perguntas abertas e fechadas sobre



Observa-se a prevalência da infecção assintomática de LVA em crianças de 0 a 5 anos



os dados socioeconômicos, ambientais e hábitos de vida das crianças. O instrumento era preenchido por meio de entrevista com as mães ou responsáveis no posto de saúde antes do atendimento da criança. Realizou-se exame antropométrico (medição do peso/altura ou comprimento) e teste de IDRM para avaliar a prevalência das diversas formas de desnutrição protéico-calórica e nível de infecção por *L. (L.) chagasi*, respectivamente. Um termo de consentimento voluntário era assinado pela mãe ou responsável.

O teste de IDRM foi realizado em 639 crianças com antígeno preparado no laboratório de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos - HUPES, Universidade Federal da Bahia-UFBA, com formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOMBr-88-BA-125) de acordo com a técnica descrita por REED et al (1986). A escolha desse teste foi devido à sua conhecida alta sensibilidade e especificidade, variando na literatura de 82,4% a 100% (FURTADO, 1980; GUEDES et al, 1990) e por apresentar-se sempre negativo durante a doença.

Na realização do IDRM, inoculou-se 0,1ml de suspensão solúvel de promastigotas (25ug/ml) de *L. amazonensis* por via intradérmica na face anterior do antebraço direito. A resposta foi detectada deslizando-se a ponta de uma caneta no antebraço em direção ao ponto de inoculação nas quatro direções em cruz. Mediu-se o diâmetro da enduração com régua milimetrada, considerando-se a reação positiva quando um dos diâmetros era igual ou maior que 5 mm.

Analisaram-se os dados no programa EPI-INFO, versão 6.04b (DEAN et al, 1994). Na análise dos

dados referentes à situação nutricional das crianças, utilizou-se como referência o padrão do National Center of Health Statistics/NCHS no programa EPINUT (VICTORA et al, 1992). Considerou-se como criança infectada por *L. (L.) chagasi* todas aquelas que apresentaram IDRM positivo e como desnutrição crônica o déficit ocorrido no indicador altura/idade e desnutrição aguda no indicador peso/altura.

O teste do Qui-quadrado foi utilizado para verificar as diferenças entre os eventos do estudo. No caso de frequências esperadas inferiores a 5, foi utilizado o teste de Fischer. Quando o valor de "p" era menor ou igual a 0,05, considerou-se a diferença estatisticamente significante.

## RESULTADOS

De acordo com o inquérito populacional, Vila Nova era constituída por 361 famílias e Bom Viver por 574. Cada família

apresentou uma média de 5,2 pessoas. Nas duas localidades, existiam 800 crianças na faixa etária de 0 a 5 anos; destas, somente 648 crianças participaram do estudo devido ao processo migratório que ocorreu entre a realização do censo e o início da coleta dos dados.

A idade das crianças variou de 11 dias a 71 meses, concentrando o maior percentual na faixa etária de 0 a 23 meses (40%). Quanto ao sexo, 52% era do sexo feminino e 48% do masculino, havendo predomínio da cor parda entre as crianças. Com referência ao local de nascimento e à última procedência, constatou-se que a maioria das crianças nasceu em São Luís, mas morava em Vila Nova/Bom Viver. Quanto ao estado nutricional, não houve diferença estatisticamente significante entre as duas localidades em relação ao tipo de desnutrição, porém a desnutrição crônica apresentou maior percentual, 22% em Vila Nova e 24% em Bom Viver (Tabela 1).

**Tabela 1** – Características das crianças de Vila Nova e Bom Viver quanto a cor, local de nascimento, última procedência e estado nutricional, Raposa-MA, 1998

Características	Localidades				P
	Vila Nova (N=298)		Bom Viver (N=350)		
	f	%	f	%	
<b>Cor</b>					<0,001
Parda	224	75	242	69	
Branca	59	20	103	29	
Preta	15	5	5	2	
<b>Local do nascimento</b>					0,011
São Luís	167	56	236	67	
Raposa	58	19	51	14	
Outros estados	73	25	63	18	
<b>Última procedência</b>					<0,001
Raposa	256	86	318	91,0	
São Luís	13	4	24	7,0	
Outros estados	29	10	8	2,0	
<b>Estado nutricional</b>					0,318
Desnutrição crônica	65	22	85	24	
Desnutrição aguda	5	2	2	1	
Eutrófico	228	76	263	75	

“No homem, o período de incubação da LVA é muito difícil de ser determinado, pela impossibilidade de se precisar a data da inoculação”

Em relação aos hábitos de vida, observou-se que a maioria das crianças das duas localidades não usava mosquiteiro, tomava banho fora de casa (quintal) e frequentemente no final da tarde. Quanto à realização das necessidades fisiológicas, 69% realizavam fora de casa (quintal ou mato), e mais de dois terços brincavam no ambiente peridomiciliar ao anoitecer (Tabela 2).

Quanto à distribuição das crianças de Vila Nova e Bom Viver por tipo de moradia, constatou-se que 100% moravam em casa. Destas, a maioria era própria, mais de três terços das casas eram cobertas de palha, com paredes de taipa e o piso tipo chão batido (Tabela 3).

Em relação ao tipo de animal existente no domicílio e na vizinhança, observou-se que em mais da metade dos domicílios existiam animais, como cão ou galinha, porém, na vizinhança o número de animais foi bem maior, 89% em Vila Nova e 93% em Bom Viver. Quanto ao tipo de doença, 18% de Vila Nova e 2% de Bom Viver responderam ter tido alguém doente de LVA no domicílio no último ano, e vizinhança (Tabela 3).

**Tabela 2** – Hábitos de vida das crianças de Vila Nova e Bom Viver/Raposa-MA, 1998

Hábitos	Localidades				P
	Vila Nova (N=298)		Bom Viver (N=350)		
	f	%	f	%	
<b>Uso de mosquiteiro</b>					<0,001
Sim	75	25	141	40	
Não	223	75	209	60	
<b>Local do banho</b>					0,252
Dentro de casa	57	19	55	16	
Fora de casa	241	81	295	84	
<b>Horário do banho</b>					0,460
Manhã	120	40	151	43	
Tarde	178	60	199	57	
<b>Local das necessidades fisiológicas</b>					0,879
Dentro de casa	92	31	110	31	
Fora de casa	206	69	240	69	
<b>Brinca (18 h às 20 h)</b>					0,073
Dentro de casa	65	21	57	16	
Fora de casa	233	79	293	84	

**Tabela 3** – Características epidemiológicas/Raposa-MA, 1998

Características	Localidades				P
	Vila Nova (N=298)		Bom Viver (N=350)		
	f	%	f	%	
<b>Tipo das habitações</b>					<0,001
Palha/taipa/chão batido	285	96	296	85	
Telha/alvenaria/cimento	13	4	15	15	
<b>Tipo de animal na casa</b>					<0,001
Cão	66	22	54	15	
Galinha	85	29	161	46	
Nenhum	147	49	135	39	
<b>Tipo de animal na vizinhança</b>					0,144
Cão	87	29	100	29	
Galinha	178	60	226	64	
Nenhum	33	11	24	7	
<b>Tipo de doença na casa</b>					<0,001
LVA	20	7	5	2	
Outras doenças	80	27	169	48	
Nenhuma	198	66	176	50	
<b>Tipo de doença na vizinhança</b>					<0,001
LVA	21	7	11	3	
Outras doenças	19	6	70	20	
Nenhuma	258	87	269	77	

Das 639 crianças que realizaram IDR, 19% apresentaram reação positiva.

A faixa etária de 24 a 59 meses foi a que apresentou maior positividade ao teste. Quanto ao sexo, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 1).

## DISCUSSÃO

A LVA é conhecida como doença própria do clima semi-árido, mas, devido ao fenômeno da seca no Nordeste brasileiro, esse panorama tem mudado. As famílias migram para a periferia da cidade onde vivem em precárias condições propiciando a eclosão de surtos epidêmicos, tanto pela proliferação do vetor devido à abundância das fontes alimentares e à proximidade de criadouros como pela circulação do agente etiológico a partir de cães infectados (COSTA et al, 1990; COSTA et al, 1995). Fato este ocorrido em Vila Nova e Bom Viver, que são oriundas de ocupações recentes, apresentam condições socioeconômicas e ambientais propícias ao ciclo de transmissão do parasita, contribuindo dessa forma para a elevação do índice de infecção por *L. (L.) chagasi* assim como da doença. Em 1997, foram notificados 12 casos de LVA humana nessas localidades, sendo 10 em Vila Nova e dois de Bom Viver (CALDAS et al, 2001).

Estudos realizados no estado do Pará demonstraram que o maior número de casos humanos de LVA envolveu crianças que residiam em áreas de ocupações. Isso ocorreu devido ao fluxo de indivíduos suscetíveis para a área, aumento da densidade populacional de flebotomos ou o tipo de moradia, cuja construção pode favorecer a entrada do vetor, principalmente nas casas de construções mais abertas, similares às casas das áreas por nós estudadas, predominando a cons-

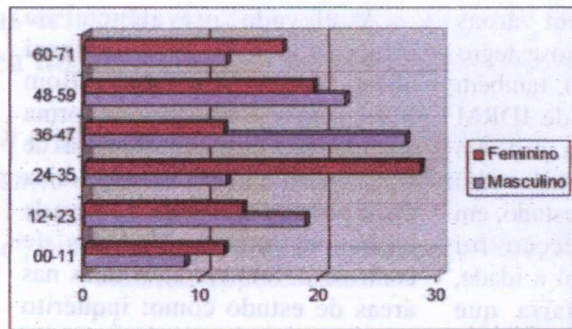


Figura 1 – Resultado do teste de IDR realizado nas crianças de Vila Nova/Bom Viver – município de Raposa-MA

trução de taipa e cobertura de palha (MONTEIRO et al, 1994; BRASIL, 1996).

A presença de animais domésticos, como cães, no domicílio e peridomicílio permanece como importante elo de transmissão da LVA, uma vez que a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos (WHO, 1990; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; BRASIL, 1996). Observou-se a presença de animais domésticos tanto em Bom Viver como em Vila Nova, principalmente o cão e a galinha. Os abrigos naturais dos flebotomos são os mais diversos possíveis, como oco das árvores, folhagem de arbustos, onde os mesmos passam parte do dia, além de abrigos de animais (galinheiro, chiqueiro, curral) e habitações humanas em que os flebotomos são encontrados com maior frequência à noite (BRASIL, 1996; RABELO, 1999).

Quanto ao estado nutricional, verificou-se que o déficit referente ao indicador altura/idade que retrata a desnutrição crônica foi superior ao observado na Pesquisa Estadual de Saúde e Nutrição (PNSN) realizada em 1991 no Maranhão e maior também em relação ao Brasil (10,5%) (UNICEF, 1992, 1995; TONIAL, 1996). No que diz respeito à associação entre estado nutricional e infecção assintomática por *L. (L.) chagasi*, observou-se que somente 5% das crianças com desnutrição crônica e 0,2% com desnutrição aguda apresentaram

positividade ao IDR, demonstrando, portanto, que a infecção por *L. (L.) chagasi* ocorre em indivíduos de áreas endêmicas independente do estado nutricional.


Quando comparou-se a prevalência de infecção por *L. (L.) chagasi* encontrada em nosso estudo (19%) com outros realizados com crianças menores de 15 anos, observou-se que a nossa prevalência foi superior à do Ceará (4,5%) e da Bahia (16%) (BADARÓ et al, 1986; EVANS et al, 1992). Houve também diferença entre os índices de infecção das duas localidades, Bom Viver foi 17% e Vila Nova 21%. Essa diferença pode ser devido ao tempo de colonização, pois Bom Viver tem 10 anos de existência e Vila Nova, 5 anos. Observa-se, também, que na localidade de Vila Nova as transformações ambientais são mais intensas que em Bom Viver, onde a destruição da vegetação é constante devido às instalações de novas residências e às condições de moradia serem precárias, fatores estes que podem influenciar no índice de infecção por *L. (L.) chagasi* na área.

A faixa etária que apresentou maior positividade à IDR em ambos os sexos foi de 24 a 47 meses. Estudo realizado na Bahia demonstrou que o índice de infecção foi diretamente proporcional com a idade, ou seja, quanto maior a faixa etária do indivíduo, maior foi o índice de infecção assintomática (BADARÓ et al, 1986).

MARZOCHI & MARZOCHI

(1994), estudando em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana (LTA), também observou que o índice de IDRMs positiva aumentava com a idade em média 20% a 30%. Esses dados vêm ao encontro do presente estudo, em que o índice de infecção foi diretamente proporcional à idade, tanto que a faixa etária que apresentou menor índice de infecção foi a dos menores de 2 anos.

A elevada prevalência da infecção por *L. (L.) chagasi* observada em Vila Nova e Bom Viver sugere a presença da forma assintomática da LVA em crianças de 0 a 5 anos de idade, em cuja faixa etária observa-se o maior número de casos da doença. Medidas de controle devem ser efetivadas nas áreas de estudo como: inquérito sorológico canino; redução da população de flebótomos por meio

de borrrifação periódica; diagnóstico e tratamento precoce dos casos objetivando diminuir a letalidade da doença; e educação em saúde de acordo com o conhecimento dos aspectos culturais, sociais, educacionais, das condições econômicas e da percepção de saúde de cada comunidade, visando a uma redução da prevalência de infecção e de casos da doença. 

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BADARÓ, R., JONES, T. C., LORENCO, R., CERF, B. J., PEDRAL-SAMPAIO, D., CARVALHO, E. M., ROCHA, H., TEIXEIRA, H., JOHSON JR., W. D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Controle, Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose visceral (calazar) - Normas Técnicas*. Brasília, 1996.
- CALDAS, A. J. M., SILVA, D. R. C., PEREIRA, C. C. R., NUNES, P. M. S., SILVA, B. S., SILVA, A. A. M., BARRAL, A., COSTA, J. M. Infecção por *L. (L.) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na ilha de São Luís, MA, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, 2001 (in prelo).
- CARVALHO, E. M., ALMEIDA, R. P., JESUS, A. R. Imunidade e infecção. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 28, n. 3, p. 253-283, jul./set. 1995.
- COSTA, C. H. N., PEREIRA, H. F., ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.
- COSTA, J. M. L., VIANA, G. M. C., SALDANHA, A. C. R., NASCIMENTO, M. D. S. B., AMVIM, A. C., BURATTINI, M. N., SILVA, A. R. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. *Caderno de Saúde Pública*, v. 11, n. 2, p. 321-324, 1995.
- DEAN, A. G., DEAN, J. A., BURTON, A. H., DICKER, R. C. *Epi Info, Versão 6: um sistema de processamento de texto, banco de dados e estatística para computadores*. Atlanta-EUA/São Paulo. Centers of Diseases Control and Prevention/Santa Casa de São Paulo, 1994.
- EVANS, T. G., VASCONCELOS, I. A. B., LIMA, J. W., TEIXEIRA, J. M., MCAULLIFE, I. T., LOPES, U. G., PEARSON, R. D., VASCONCELOS, A. W. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, n. 166, p. 1124-1132, 1992.
- FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (UNICEF). *Crianças e adolescentes no Maranhão: saúde, educação e trabalho*. São Luís - Maranhão, 1992.
- FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (UNICEF). *Saúde e nutrição das crianças nordestinas: pesquisas estaduais 1987-1992*. 1995.
- FURTADO, T. Critério para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 65, p. 51-86, 1980.
- GUEDES, A. C. M., CUCÉ, L. C., FURTADO, T. Avaliação imunológica e histopatológica de reação de Montenegro. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 65 n. 5, p. 34-35, 1990.
- MARZOCHI, M. C. A. & MARZOCHI K. B. F., Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: mathorozoonosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 259-75, 1994.
- MONTEIRO, P. S., LACERDA, M. N., ARIAS, R. R. Controle das leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, p. 67-72, 1994.
- NASCIMENTO, M. D. S. *Epidemiologia da leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís, Maranhão - Brasil: análise da dinâmica de transmissão e fatores de riscos relacionados ao desenvolvimento da doença*. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, 1996.
- REBÉLO, J. M. M. *Flebótomos vetores das leishmanioses: manual para técnicos e profissionais da área de saúde*. Universidade Federal do Maranhão/Ministério da Saúde, 1999.
- RABELLO, A., ANDRADE, M.O., DISCH, J. Co-infecção *Leishmania/HIV*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, p. 81-91, 1998.
- REED, S. G., BADARÓ, R., MANSUR, H., CARVALHO, E. M., LORENÇA, R., LISBOA, A., TEIXEIRA, R., JOHSON JR., W. D., JONES, T. C. Selection of a skin test antigen for american visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, p. 79-85, 1986.
- TONIAL, S. *Políticas públicas de assistência alimentar e avaliação das ações de saúde e nutrição: estudo em crianças menores de 5 anos em São Luís, Maranhão*. Universidade Federal do Maranhão, 1996.
- VICTORA, G. G., HUTTLY, S. R. R. A., LOMBARDI, C., VOUGHAN, J. P. Maternal education in relation to early late child health outcomes: findings from a brazilian cohort study. *Society Science Medicine*, v. 34, p. 899-905, 1992.
- WORD HEALTH ORGANIZATION. *Control of leishmaniasis*. Geneva WHO, 1990. 159p. (Technical Report Series 793)

## Avaliação nutricional das crianças de zero a cinco anos de idade de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana (LVA).

*Nutritional avaliation on child hood aged between zero and five years old from endemic area of visceral leishmaniosis.*

Arlene de Jesus Mendes Caldas<sup>1</sup>, Doralene Maria Cardoso de Aquino<sup>1</sup>, Aldina Prado Barral<sup>2</sup>, Jackson Mauricio Lopes Costa<sup>3</sup>

**RESUMO:** Realizou-se estudo de coorte com crianças de zero a cinco anos de idade de Vila Nova e Bom Viver no município de Raposa-MA, no período de julho/1997 a junho/1998, com o objetivo de determinar a prevalência da desnutrição protéico-calórica e verificar se existe associação entre desnutrição e infecção por *L. chagasi*. Utilizou-se questionário com dados socioeconômicos, demográficos e epidemiológicos; realizou-se Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para detectar infecção e aferição dos dados antropométricos. Observou-se uma prevalência do déficit nutricional (severo, moderado) no indicador altura/idade de 26% e peso/idade de 9,6%. Quando a relação entre desnutrição e fatores socioeconômicos, demográficos e epidemiológicos a desnutrição severa variou de 0,2 a 0,5%, e a moderada, quanto melhores condições socioeconômicas menor índice de desnutrição. A infecção por *L. chagasi* ocorreu entre as crianças independente do estado nutricional.

**Descritores:** Desnutrição protéico-calórica; Infecção por *L. chagasi*.

**ABSTRACT:** It was carried out a cohort study with children aged between zero and five years old from the Vila Nova and Bom Viver communities of the Rapoza county, Maranhão state, from July 1997 to June 1998, aiming at assessing the protein-caloric malnutrition prevalence as well as the association between malnutrition and *L. chagasi* infection. A questionnaire based on socioeconomic, demographic and epidemiological data was applied; IDRM (Montenegro's Intradermic Reaction) and ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) were the tests utilized for detecting infection and measurement of the anthropometric data. It was observed a prevalence of nutritional deficit (severe, moderate) in the height/age (26%) and weight/age (9,6%) indicators. Regarding the relationship between malnutrition and socioeconomic, demographic and epidemiological factors, the severe malnutrition ranged from 0.2% to 0.5% and the moderate. When the socioeconomic conditions are thought to be better, the desnutrition rate is low. The *L. chagasi* infection took over among children independent on the nutritional state.

**Key-words:** Protein-caloric malnutrition; *L. chagasi* infection.

### INTRODUÇÃO

A situação nutricional das crianças indica as condições de saúde e a probabilidade de sobrevivência dos indivíduos de uma comunidade, tendo em vista a estrita relação entre indicadores nutricionais, socioeconômicos e a saúde da população. É sabido que as doenças representam uma ameaça ao estado nutricional dos indivíduos precipitando a desnutrição<sup>1</sup>.

No Brasil, a desnutrição energético-protéica (DEP) encontra-se entre as principais carências nutricionais do País, a qual está relacionada com a ingestão e utilização biológica de alimentos, doenças infecto-parasitárias, bem como, com as condições socioeconômicas e políticas do País<sup>2</sup>.

De acordo com os dados da UNICEF<sup>3</sup> sobre saúde e desnutrição das crianças nordestinas, estima-se que os maiores índices de desnutrição no país

encontram-se nos estados do Maranhão (30,6%), Piauí (22,9%), Ceará (21,1%), e menores índices no Rio Grande do Norte (14,5%) e Sergipe (16%).

Segundo Tonial<sup>4</sup>, são os fatores socioeconômicos, os principais determinantes da ingestão insuficiente de alimentos e da maior exposição às doenças infecciosas, contribuindo dessa forma, para a desnutrição infantil. Entre as doenças infecciosas, a leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar encontra-se fortemente associado ao estado nutricional como foi observado por Badaró et al.<sup>5</sup> na Bahia, por Cerf et al.<sup>6</sup> e Evans et al.<sup>7</sup> (1992) no Ceará.

A LVA ocorre principalmente em crianças entre zero a nove anos de idade, correspondendo a 80% dos casos registrados. Destes, 60% são crianças menores de cinco anos<sup>8</sup>. A preferência pela criança é a principal

<sup>1</sup> Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Maranhão

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-Bahia

<sup>3</sup> Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão

característica da chamada forma neotropical da LVA e se correlaciona, provavelmente, com a perturbação da resposta imune, própria dos estados de desnutrição, que frequentemente acometem as crianças nessa faixa etária, funcionando como fator de predisposição para a doença<sup>9</sup>.

Além da desnutrição comum em crianças pobres da zona rural e das periferias das metrópoles, a LVA

contribui certamente para o agravamento da deficiência nutricional. O presente estudo tem como objetivos determinar a prevalência da desnutrição protéico-calórica em crianças de zero a cinco anos de uma área endêmica de LVA e verificar se existe associação entre desnutrição e infecção por *Leishmania chagasi*.

## MÉTODOS

Realizou-se um estudo de coorte no período de julho/97 a junho/98, com 648 crianças de zero a cinco anos de idade nas localidades de Vila Nova e Bom Viver no município de Raposa-MA, localizado na Ilha de São Luís, distando 28km da cidade de São Luís, capital do estado do Maranhão. Apresenta área de 63,9km<sup>2</sup> e uma população de 15.075 habitantes distribuídos em 21 localidades, entre elas, Vila Nova com uma população de 2.600 habitantes e Bom Viver com 4.307 habitantes, ambas oriundas de ocupações por invasões recentes. A escolha destas duas localidades, deveu-se ao elevado número de casos de LVA detectados nos últimos anos pela Fundação Nacional de Saúde-FUNASA, caracterizando-as como área endêmica da doença.

O estudo iniciou-se em julho/97, com a realização de inquérito populacional. Em seguida foi planejado e delineado em duas fases: a primeira, de setembro a outubro/97, com a realização de inquérito epidemiológico, nutricional e imunológico {intradermoreação de Montenegro (IDRM) e Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)}; e a segunda, de abril a maio/98, com a finalidade de reavaliar o estado imunológico e nutricional das crianças. No seguimento do estudo, a vontade e decisão da mãe ou responsável pela criança foi sempre respeitada. Um termo de consentimento voluntário era assinado.

Na aferição do peso utilizou-se balanças de mola do tipo Salter. A tomada do peso da criança (sem roupa ou com calcinha ou cueca) era realizada por duas pessoas previamente treinadas.

A medição do tamanho da criança era realizada em posição ereta (altura) ou deitada (comprimento). Nas crianças com idade inferior a dois anos era medido

o comprimento, utilizando antropômetro de madeira tipo AHRTAG. Para as crianças com idade igual ou superior a dois anos, utilizou-se infantômetro de madeira para medir a altura de acordo com técnica descrita por Barros & Victora<sup>10</sup>.

O teste de IDRM foi realizado em 639 crianças na primeira e 572, na segunda fase do estudo, com antígeno preparado no laboratório de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia-UFFBA, com formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOMBr-88-BA-125) de acordo com a técnica descrita por Reed et al<sup>11</sup>. Considerou-se como reação positiva quando um dos diâmetros da endureção era igual ou superior a 5mm.

A avaliação sorológica foi realizada em 638 crianças na primeira fase e 572, na segunda fase, pela técnica ELISA no laboratório de Imunologia do HUPES. A reação foi considerada positiva quando o nível de absorbância era igual ou superior a .045.

O exame antropométrico foi realizado para avaliar a prevalência das diversas formas de desnutrição protéico-calórica e consistiu na medição do peso e altura ou comprimento de cada criança<sup>12,13</sup>.

Para análise dos dados referentes à situação nutricional das crianças utilizou-se como referência o padrão do National Center of Health Statistics (NCHS)<sup>14</sup>.

A comparação do estado nutricional foi realizada somente com as crianças que participaram das duas fases do estudo. O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar as diferenças entre os eventos do estudo. No caso de frequências esperadas inferiores a 5 foi utilizado o teste de Fisher. Quando o valor de "p" era menor ou igual a 0,05, considerou-se a diferença estatisticamente significativa.

## RESULTADOS

No inquérito populacional realizado em julho de 1997 em Vila Nova e Bom Viver no município de Raposa-MA, constatou-se uma população de 4901 habitantes, sendo 1882 habitantes em Vila Nova e 3019 em Bom Viver. Destes, 800 eram crianças de zero a cinco anos. Cada família apresentou uma média de 5,2 pessoas.

Das 800 crianças, somente 648 participaram do estudo na primeira fase, e 572 na segunda, devido a migração intensa observada nas localidades. A idade

das crianças variou de 11 dias a 71 meses, concentrando o maior percentual na faixa etária de zero a 23 meses (19,3%). Quanto à distribuição por gênero, 48% era do sexo masculino e 52% feminino, portanto, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

Analisando o estado nutricional das 572 crianças que participaram das duas fases, observou-se uma ligeira diminuição na prevalência da desnutrição severa, enquanto que na desnutrição moderada houve

um pequeno aumento, porém, estas diferenças não foram estatisticamente significantes ( $p=0,772$   $p=0,940$ ), o mesmo aconteceu em relação à desnutrição leve e estado nutricional eutrófico (Tabela 1).

Observou-se que a prevalência da infecção por *L.(L.)chagasi* detectada pelo IDR (18,6) foi superior a detectada pelo ELISA (13,5), porém a incidência pelo ELISA (28%) foi quase três vezes maior que pelo IDR (10,8%) (Tabela 2). Quando se verificou a associação entre estado nutricional e infecção por *L.(L.)chagasi* segundo os testes de IDR e ELISA, observou-se que entre as crianças com desnutrição crônica (altura/idade) 5 e 3,7%, respectivamente, apresentaram positividade aos testes; 0,2% das crianças com desnutrição no indicador peso/idade apresentou IDR positivo; e 1,4% e 1,2%, respectivamente, apresentaram positividade nos testes quando o indicador era peso/idade. Não houve associação estatisticamente significante entre desnutridos e infecção por *L.(L.)chagasi* (Tabela 3).

Com referência a renda familiar, número de pessoas que trabalham, situação conjugal e atividade da mãe, observou-se que as crianças oriundas de famílias com renda inferior a dois salários mínimos apresentaram 21,9% e 0,5% respectivamente, desnutrição moderada e severa; quanto a situação conjugal e atividade da mãe, 20,4% e 0,5% das crianças de mães com companheiro apresentaram desnutrição moderada e severa, respectivamente. Entretanto, as crianças de mães sem companheiro não apresentaram desnutrição severa, somente 3,5% apresentaram desnutrição moderada. Das mães que contribuem com a renda familiar, 1,9% das crianças apresentaram desnutrição moderada e das que não contribuem, 22%

e 0,5% apresentaram desnutrição moderada ou severa, respectivamente (Tabela 4).

Analisando a escolaridade materna e paterna, observou-se que 15% das crianças com desnutrição moderada eram de mães que sabiam ler e escrever e 8,7% das mães analfabetas, porém, não teve nenhuma criança com desnutrição severa nas duas situações.

Em relação ao saneamento básico os entrevistados foram interrogados quanto ao destino do lixo e dos dejetos humanos, informando-nos que não havia coleta pública do lixo e nem rede de esgoto. O lixo era queimado ou enterrado em 55,7% das casas de Vila Nova e 84,4% de Bom Viver e, jogado em terreno baldio, 44,3% e 15,6% respectivamente. Quanto ao destino dos dejetos, observou-se que a maioria da população (95,0% em Vila Nova e 91,0% em Bom Viver) realizava suas necessidades fisiológicas no quintal ou fossa negra. Analisando estes dados com o estado nutricional, verificou-se que mais da metade das crianças eutróficas eram de famílias que queimavam o lixo (54,1%) e o destino dos dejetos era a fossa negra (64,8%) e uma minoria (16,8% e 19,8%, respectivamente) apresentaram algum grau de desnutrição moderada ou severa (Tabela 4).

Ao investigar a origem da água, observou-se que mais da metade da população usufruía de água da rede pública (73,9% de Vila Nova e 88,3% de Bom Viver). A utilização de água da rede pública contribuiu em 20,5% e 0,3% para a desnutrição moderada ou severa das crianças, respectivamente, outras origens contribuiu em 3,3% e 0,2%.

Tabela 1 Prevalência da desnutrição das crianças de zero a cinco anos das localidades de Vila Nova e Bom Viver. Raposa-MA, 1998.

Indicadores nutricionais	Fases (n=572)			
	primeira fase		segunda fase	
	f	%	f	%
Altura/Idade				
Desnutrido	146	25,5	149	26
Eutrófico	426	74,5	423	74
Peso/Altura				
Desnutrido	6	1	7	1,2
Eutrófico	566	99	565	98,8
Peso/Altura				
Desnutrido	44	7,7	55	9,6
Eutrófico	528	92,7	517	90,4

Tabela 2 Prevalência e incidência da infecção por *L.(L.)chagasi* detectadas através de IDR e ELISA, Raposa-MA, 1998.

Testes	Prevalência		Incidência (n=572)	
	f	% pos	f	%
IDR*	639	18,6	62	10,8
ELISA**	638	13,5	160	28,0

\*  $\geq 5$ mm \*\*  $\geq 0.045$

Tabela 3 Indicadores nutricionais e resultados de IDRM e ELISA. Raposa-MA, 1998.

Indicadores nutricionais	IDRM (572)				ELISA (572)					
	pos*	%	Neg	%	P	pos*	%	neg	%	P
Altura/idade					0,581					0,812
Desnutrido	29	5	117	20		21	3,7	125	22	
Eutrófico	74	13	352	61,5		56	9,8	370	64,7	
Peso/altura					0,999					0,999
Desnutrido	1	0,2	102	18		0	0,0	6	1,0	
Eutrófico	5	0,9	464	81		77	34,5	489	85,5	
Peso/idade					0,863					0,791
Desnutrido	8	1,4	95	16,6		7	1,2	37	6,5	
Eutrófico	36	6,3	433	75,7		70	12,2	458	80	

\*positivo

Tabela 4 Estado nutricional segundo condições socioeconômicas. Raposa-MA, 1998.

Características	Estado nutricional							
	Eutrófico		Leve		Moderada		Severa	
	f	%	f	%	F	%	f	%
Renda familiar								
≤ 2 salários mínimos	424	65,4	6	0,9	142	21,9	3	0,5
> 2 salários mínimos	61	9,4	0	0,0	12	1,9	0	0,0
Pessoas/trabalha								
1-3 pessoas	462	71,3	5	0,7	143	22,1	3	0,5
4-6 pessoas	23	3,5	1	0,2	11	1,7	0	0,0
Situação conjugal mãe								
Com companheiro	421	65	5	0,7	132	20,4	3	0,5
Sem companheiro	64	9,9	0	0,0	23	3,5	0	0,0
Atividade da mãe								
Trabalha em casa	439	67,8	5	0,7	143	22	3	0,5
Trabalha fora de casa	46	7,1	0	0,0	12	1,9	0	0,0
Escolaridade mãe								
Sabe ler e escrever	348	53,7	3	0,5	97	15	2	0,3
Não sabe ler e escrever	136	21,1	3	0,5	56	8,7	2	0,3
Escolaridade do pai								
Sabe ler e escrever	280	43,3	3	0,5	72	11,1	0	0,0
Não sabe ler e escrever	204	31,5	3	0,5	82	12,6	3	0,3
Lixo								
Queimado	351	54,1	4	0,6	107	16,5	2	0,3
Terreno baldio/mato	134	20,7	2	0,3	47	7,3	1	0,2
Dejetos								
Fossa negra	420	64,8	5	0,7	125	19,3	3	0,5
Quintal/vala/mato	65	10	1	0,2	29	4,5	0	0,0
Água								
Rede pública	390	60,2	4	0,6	133	20,5	2	0,3
Poço/cacimba	95	14,6	2	0,3	21	3,3	1	0,2



## DISCUSSÃO

No Maranhão existem desigualdades significativas no que se refere aos níveis de desnutrição das crianças, refletindo não apenas as diferenças econômicas entre as famílias, mas também o acesso aos serviços de saúde e de saneamento básico e, aos conhecimentos necessários para ajudar no desenvolvimento adequado da criança.

Fatores estruturais condicionam determinantes imediatos da desnutrição, como a ingestão inadequada de alimentos e as doenças infecciosas. Da sinergia entre a baixa ingestão, infecções e desnutrição resulta o maior número de óbitos entre crianças menores de cinco anos de idade nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos<sup>3</sup>.

Observou-se que a prevalência do déficit nutricional (severo, moderado) das crianças em estudo no indicador altura/idade (26%) foi superior ao índice do estado do Maranhão em 1996 (24%), e mais do dobro em relação ao país no mesmo ano (10,5%)<sup>4,14</sup>.

Este elevado índice indica a presença de déficits nutricionais de longa duração que pode estar contribuindo para manutenção da leishmaniose visceral americana (LVA) em Vila Nova e Bom Viver do qual apresentou incidência elevada da doença em 1997 (13,3 casos/1000, dados da FUNASA-MA), assim como a incidência da infecção por *L. chagasi*, 28,5%<sup>14</sup>. Sabe-se que 94% dos casos de LVA notificados na década passada são procedentes dos estados do Nordeste, uma das regiões que apresenta a mais baixa qualidade de vida do país e conseqüentemente ambiente propício à ocorrência da doença, comum no meio rural e na periferia das grandes cidades como São Luís-MA, Teresina-PI, Natal-RN e Belo Horizonte-MG<sup>8</sup>.

São os fatores sociais e ambientais denominador comum de todas as doenças que prevalecem em países pobres, entre as quais está a desnutrição, o que a faz um problema de origem mais sócioeconômica do que médica. Dentre estes fatores, pode-se destacar as condições sociais da família, traduzidos pelo nível de escolaridade dos pais, e em

especial importância, dos casos das crianças, a escolaridade materna<sup>2</sup>.

O reduzido poder aquisitivo, o baixo nível educacional, as más condições de habitação e saneamento são seguramente os principais determinantes do padrão da desnutrição das crianças de Vila Nova e Bom Viver. Em decorrência da desnutrição, existe maior risco de desenvolver infecções e conseqüentemente, a mortalidade infantil, constituindo um importante problema de saúde pública. Seu controle depende, além da melhoria das condições sócioeconômicas, também da prevenção e do tratamento das doenças infecto-parasitárias, da promoção da amamentação e do acompanhamento do crescimento, particularmente em menores de um ano.

Segundo BADARÓ<sup>5</sup>, a relação doença/sorologia positiva indica uma associação entre idade inferior a cinco anos e maior incidência de LVA versus idade superior a cinco anos com maior prevalência da infecção por *L. chagasi*. Entretanto, observou-se em nosso estudo que apesar da faixa etária das crianças ser inferior a seis anos, tanto a prevalência (8,4%) como a incidência da infecção *L. chagasi* (28%) foram elevadas, o que não é esperado nesta faixa etária pois, a predominância é de LVA doença e não infecção.

Analisando o estado nutricional e o índice de infecção por *L. chagasi* nas crianças, observou-se que a infecção aconteceu independente do estado nutricional pois, a infecção ocorreu tanto em crianças nutridas como desnutridas. O que vem de encontro com os dados de BADARÓ<sup>5</sup>, que as chances de uma criança nutrida se infectar é grande, entretanto, se a mesma for desnutrida, a probabilidade de desenvolver a doença é de 1:2.

Observou-se que a alta prevalência da desnutrição crônica apresentada pelas crianças de Vila Nova e Bom Viver não apresentou associação com a prevalência de infecção por *L. (L.) chagasi*, portanto, para o indivíduo se infectar basta somente residir em área endêmica de LVA.

## REFERÊNCIAS

1. Monteiro AC. Velho e novo males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças. São Paulo: Nupes-USP; *Hucitec*. 1995, 93-114.
2. Campino A. Aspecto sócioeconômico da desnutrição no Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 1986, 20: 83-101.
3. UNICEF. *Saúde e nutrição das crianças nordestinas: pesquisas estaduais 1987-1992*. Brasília, 1995.
4. Tonial SR, Silva AAM (Org.). *Saúde, nutrição e mortalidade infantil no Maranhão*. São Luís:UFMA: Secretaria de Estado da Saúde:UNICEF,1997.
5. Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ et al. 1986. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 1986, 154: 1003-1011.
6. Cerf BJ, Jones TC, Sampaio D et al. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 1987 156:1030-1033.
7. Evans TG, Vasconcelos IAB, Lima JW et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 1992, 166:1124-1132.

8. BRASIL. Ministério da saúde. Fundação Nacional de Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento de leishmaniose visceral (calazar)-Normas Técnicas. Brasília. 1996.
9. Campo Jr. D. Características clínico-epidemiológicas do calazar na criança. *Jornal de Pediatria*. 1995, 71: 261-265.
10. Barros FC, Victora C. *Epidemiologia da saúde infantil; um manual para diagnósticos comunitários*. São Paulo: HUCITEC/UNICEF.
11. Reed SG, Badaró R, Mansur H et al.. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986, 35: 79-85.
12. Waterlow JC. Classification and definition of protein-calorie malnutrition. *British Medical Journal*. 1972, 3: 566-9.
13. Waterlow JC, Buzina R, Keller W et al. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of ten years. *Bulletin of World Health Organization*. 1977, 55: 489-98.
14. BEMFAM. *Pesquisa nacional sobre demografia e saúde*. Relatório preliminar. Rio de Janeiro, 1996.
15. Caldas AJM *Infeção por L.(L.)chagasi em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís-Maranhão-Brasil*. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). São Luís. Universidade Federal do Maranhão, 1998, 151p.

#### ENDEREÇO PARA CORRESPONDENCIA

Arlene de Jesus Mendes Caldas

Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão

Praça Madre Deus, nº 02, Madre Deus, São Luís-Maranhão-Brasil CEP: 65025-560

Email: ajmc@elo.com.br

## HUMAN IMMUNE RESPONSE TO SAND FLY SALIVARY GLAND ANTIGENS: A USEFUL EPIDEMIOLOGICAL MARKER?

ALDINA BARRAL, EDUARDO HONDA, ARLENE CALDAS, JACKSON COSTA, VERA VINHAS, EDGAR D. ROWTON, JESUS G. VALENZUELA, ROSANE CHARLAB, MANOEL BARRAL-NETTO, AND JOSÉ M.C. RIBEIRO

*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil; Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, Maranhão, Brazil; Department of Entomology, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, District of Columbia; Section of Medical Entomology, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland*

**Abstract.** Antibody (IgG) responses to salivary gland homogenate and to a recombinant salivary protein from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* were investigated using sera from children living in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. We classified children into four groups according to their responses to *Leishmania* antigen: (Group I) positive serology and positive delayed type hypersensitivity (DTH), (Group II) positive serology and negative DTH, (Group III) negative serology and positive DTH, and (Group IV) negative serology and negative DTH. A highly significant correlation was found between anti-salivary gland IgG levels and DTH responses. An *L. longipalpis* salivary recombinant protein used as an antigen in an enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) gave a significant but different result. A positive correlation was found between anti-*Leishmania* IgG and anti-recombinant protein IgG titers. The results indicate that sand fly salivary proteins may be of relevance to the study the epidemiology of leishmaniasis.

### INTRODUCTION

The leishmaniasis are a group of mostly zoonotic diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* which are transmitted by phlebotomine sand fly vectors. Sand flies acquire the parasite, which lives as intracellular amastigotes in their vertebrate hosts, while taking a blood meal. The parasites develop from amastigotes to extracellular promastigotes in the sand fly gut, multiply, and transform to infective metacyclics that accumulate in the anterior portion of the fly's digestive canal. Once infective protozoa invade their vector's mouthparts, they can be transmitted to another vertebrate when the fly attempts to take another blood meal.<sup>1</sup>

Visceral American leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania chagasi* is endemic in several areas in Brazil. Within these regions, most of the infections are subclinical with leishmanin-positive patients normal upon physical examination.<sup>2</sup> Full-blown VL is characterized by unimpeded parasite multiplication in bone marrow, liver, and spleen, leading to severe weight loss, hepatosplenomegaly, anemia, leukopenia, and thrombocytopenia. Development of clinical disease is possibly related to nutrition status<sup>3</sup> and young age<sup>4</sup> among other factors. A strong delayed type hypersensitivity (DTH) to leishmanial antigen (leishmanin) is normally associated with resistance to manifestations of the disease.<sup>5</sup> Additionally, laboratory experiments indicate that immunity to sand fly vector salivary antigens may also confer protection.<sup>6-9</sup>

While taking a blood meal, sand flies salivate on their hosts. The saliva of blood-sucking animals contains a repertoire of molecules that modulate their host's hemostatic, inflammatory, and immune responses. The New World sand fly *Lutzomyia longipalpis* has the peptide maxadilan as its salivary vasodilator.<sup>10,11</sup> Maxadilan also has immunosuppressive properties<sup>12</sup> and the anti-clotting molecule of *Lutzomyia* has been purified and cloned.<sup>13</sup> Additionally, several salivary gland cDNAs from *Lutzomyia longipalpis* have been recently cloned, including the salivary apyrase and hyaluron-

idase.<sup>13</sup> Salivary components may also play a role in helping the establishment of pathogens in their vertebrate hosts.<sup>6</sup> Tick saliva has been implicated in the successful transmission of several tick-borne viruses<sup>14,15</sup> and saliva of both *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* has been implicated in enhancing transmission of *Leishmania major* parasites in mouse models of this disease.<sup>7,8</sup> Conversely, host immunity to vector saliva may decrease infectivity of the transmitted pathogens.<sup>9,16</sup>

A large body of work demonstrates the production by humans and other vertebrates of antibodies against the salivary gland components of blood-sucking insects and ticks.<sup>17-19</sup> Although most of this work is aimed at preventing and treating undesirable allergic responses, or developing anti-arthropod vaccines, these responses may also be used as epidemiological markers of vector exposure, such as to *Ixodes scapularis*, a vector of Lyme disease.<sup>20,21</sup> In the case of leishmaniasis, there is a dual interest in understanding the nature of the human response to sand fly salivary antigens. 1) Sand fly populations tend to be clustered (Miranda and others, unpublished data). Screening of human antibodies to sand fly saliva could be a useful indicator the spatial distribution of sand flies in a particular region, thus helping to direct vector and disease control efforts. 2) Immunity to sand fly salivary antigens may decrease expression of leishmaniasis or disease severity.<sup>6,9</sup> Accordingly, the purpose of this work was to investigate whether sera from children living in an area endemic for visceral leishmaniasis were able to differentially recognize salivary gland antigens of the vector sand fly depending on the children's exposure to *Leishmania* as determined by their cellular (measured by cutaneous DTH) and humoral IgG responses to *Leishmania* antigens. The results indicate that anti-sand fly antibody studies can be used within the context of the epidemiology of leishmaniasis.

### MATERIALS AND METHODS

**Sand flies.** Sand flies were reared at the Walter Reed Army Medical Research Institute on a fermented mixture of

rabbit chow and rabbit feces as described previously.<sup>22</sup> Adult sand flies had with free access to a 10% solution of sucrose unless otherwise specified. Salivary glands from 3-to 10-day-old adult female flies were dissected and transferred to 10 or 20  $\mu$ L Hepes 10 mM pH 7.0, NaCl 0.15 M in 1.5 mL polypropylene vials, usually in groups of 20 pairs of glands in 20  $\mu$ L of Hepes saline, or individually in 10  $\mu$ L of Hepes saline. Salivary glands were kept at  $-75^{\circ}\text{C}$  until needed, when they were disrupted by sonication using a Branson Sonifier 450 homogenizer (Branson, Danbury, CT).<sup>23</sup> Salivary homogenates were centrifuged at  $10,000\text{ g} \times 2\text{ min}$ ; the supernatants were used for the experiments.

**Preparation of recombinant antigen.** The recombinant antigen used in this work refers to the salivary anti-clotting protein characterized in a previous publication.<sup>13</sup> The GenBank accession number for the cDNA sequence is AF131932. A plasmid containing the *Lutzomyia longipalpis* anticoagulant sequence was used as a template to amplify only the sequence coding for the processed protein. Accordingly, we used CTA CAA GTT ACT GAG AAG GAA CTT as a sense primer and CTT TTC TTG ACA TAC AAA ATG ATG as an antisense primer. Polymerase chain reaction (PCR) conditions were as follows: 1 cycle of 3 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , 25 cycles of 1 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 sec at  $45^{\circ}\text{C}$ , 30 sec at  $72^{\circ}\text{C}$ , and a final cycle of 10 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . Amplification of a single product was confirmed in a 1.5% agarose gel. The obtained PCR product was immediately ligated to pTrcHis2-TOPO TA expression vector (Invitrogen, San Diego, CA) following the manufacturer's protocol.

**Cell transformation.** Cells were transformed with the ligation mixture, plated in LB-agar-ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) plates and incubated overnight at  $37^{\circ}\text{C}$ . Isolated colonies were picked and transferred to 5 mL of LB-ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The cultures were grown at  $37^{\circ}\text{C}$  for 6 hours and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until PCR analysis. Five  $\mu\text{L}$  of the cultures were used as a template for a PCR reaction used to determine the presence of the anti-coagulant insert. We utilized the same sense and antisense primers described above and the following PCR conditions: 1 cycle of 5 min at  $75^{\circ}\text{C}$ , 1 cycle of 4 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , 35 cycles of 30 sec at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 sec at  $40^{\circ}\text{C}$ , and 45 sec at  $72^{\circ}\text{C}$ . Amplification of a PCR product of about 420 base pairs (bp) suggested the presence of the insert. Colonies containing the insert were regrown and their plasmids extracted and sequenced in both directions to confirm the presence of the anti-coagulant and the orientation of the sequence.

**Expression of recombinant anticoagulant.** A 500 mL cell culture containing the anticoagulant expression vector was grown in LB-ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at  $37^{\circ}\text{C}$ , shaking at 300 rpm, until it reached 1 unit O.D. (600 nm). Isopropyl thiogalactoside (1 mM) was added to the culture and incubated for 6 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ . Expression of the recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE (4–20% gel). The control sample was a cell culture with the pTrcHis2-TOPO vector alone. Cells were harvested by spinning for 20 min at  $1,500 \times \text{g}$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ). The pellet was resuspended in Tris-HCl pH 7.4, 20 mM EDTA, and lysozyme (8 mg/mL) was added to the culture. The culture was left at room temperature for one hour with intermittent shaking. Sodium chloride (0.5 M final concentration) and triton X-100 (2.5% final) were added and the sample was incubated at room temperature for 30 min

with shaking. The culture was then spun at  $10,000 \times \text{g}$  for 50 min ( $4^{\circ}\text{C}$ ). The pellet was resuspended with Tris-EDTA-1% triton solution and the mixture sonicated three times for 30 sec then cooled for 1 min on ice. The cells were centrifuged again and the entire procedure repeated five times with washes of the pellet using Tris-EDTA buffer. The pellet was then stored at  $-75^{\circ}\text{C}$  until use. The pellet was solubilized in GuHCl 6 M, Tris-HCl pH 8.0, EDTA 2 mM and sonicated three times for 30 sec with 1 minute cooling on ice. After sonication, the solution was incubated for two hours at room temperature and then centrifuged at  $25,000 \times \text{g}$  for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was recovered, DTE was added for a final concentration of 65 mM, and it was incubated at room temperature for 2 hours. The solution was then added to a refolding buffer (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, L-arginine-HCl 0.5 M, GSSG 0.9 mM, and EDTA 2 mM), and the mixture was incubated for 36 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ , then dialyzed against Tris-HCl 20 mM pH 7.4. After dialysis, the recombinant protein was purified by reverse phase HPLC using a 60 min gradient of 10–60% acetonitrile with trifluoroacetic acid 0.1%, at 2 mL/min using a 1 cm  $\times$  25 cm octadecyl-silica column model 218TP510 (Vydac, Hesperia, CA). Absorbance at 280 nm was monitored. Fractions of the main peak were pooled, and analyzed by reducing SDS-PAGE, mass spectrometry, and Edman degradation. The pooled fractions were homogeneous and yielded the expected amino-terminal sequence ALLQVTVKELSDGKKIFISK, with the two first amino acids being from the vector.

**Anti-insect antigen serology by ELISA.** ELISA plate were coated with 5 pairs of salivary glands/mL (approximately 5  $\mu\text{g}$  protein/mL), or with 1  $\mu\text{g}$  recombinant protein/mL in carbonate buffer ( $\text{NaHCO}_3$  0.45 M,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02 M pH 9.6) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . After three washes with PBS 0.05% Tween, the plates were blocked for 1 hour at  $37^{\circ}\text{C}$  with PBS-0.1% Tween plus 0.05% BSA. Sera were diluted 1:100 with PBS-0.05% Tween and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . After further washings, the wells were incubated with alkaline-phosphatase-conjugated anti-human IgG (Sigma, St Louis, MO) at a 1:1,000 dilution for 45 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$ . Following another washing cycle, the color was developed for 30 minutes with a chromogenic solution of p-nitrophenyl phosphate in sodium carbonate buffer pH 9.6 with 1 mg/mL of  $\text{MgCl}_2$ .

**Preparation of Western blots.** For Western blots, we used 16% Tris-Glycine, 1.0 mm thick gels, running with sodium dodecyl sulfate (Novex, San Diego, CA). The gel type recommended for 2D gels, has one small side well for pre-stained molecular weight markers (myosin, bovine serum albumin, glutamic dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, carbonic anhydrase, myoglobin, lysozyme, aprotinin, and insulin, chain B, obtained from Novex) and a large single well to which were added the contents of 40 pairs of salivary glands (approximately 40  $\mu\text{g}$  of protein) treated with 8% SDS and 4% 2-mercaptoethanol in Tris-HCl buffer 0.5 M pH 6.8, 10% glycerol, and 1% bromophenol blue dye, and heated for 5 min at  $100^{\circ}\text{C}$ . The gel was developed with Tris-Glycine buffer according to the manufacturer's instruction and transferred to nitrocellulose using a Blot-Module for the XCell II Mini-Cell (Novex). After transfer, free sites were blocked with PBS-0.05% Tween plus 0.5% non-fat dried milk for two hours at  $37^{\circ}\text{C}$ . The strips were washed with

PBS-0.05% Tween and incubated with sera (diluted 1:100 in PBS-0.05% Tween and 0.5% nonfat dried milk) overnight at 4°C. Following further washings, strips were incubated with rabbit alkaline-phosphatase-conjugated anti-human IgG for 1 hour at 37°C. Blots were then washed and developed with nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate.

**Anti-*Leishmania* serology by ELISA.** *Leishmania* were cultivated in Schneider's medium, and the organisms disrupted by freeze-thaw cycles and then centrifuged at 40,000 g for 20 minutes. Protein content of the supernatant was determined by Lowry's method. Samples were stored at -20°C until used. The test was performed as previously described,<sup>24</sup> and has been documented to yield specific (98%) and sensitive (99%) responses in serological tests. The spectrophotometric absorbance values (OD) of 1/100 dilution of normal sera samples (mean + 3 SD) were used as the cutoff for a positive response.

**Delayed-type hypersensitivity test.** Delayed-type hypersensitivity (DTH) tests were performed as previously described.<sup>25</sup> Briefly, cutaneous DTH was assessed by intradermally inoculating patients with *L. chagasi* protein. Induration was measured after 48 hours. A positive test was defined as induration greater than 5 mm at maximum width.

**Study population.** Sera used in the present study were obtained from an epidemiological survey of visceral leishmaniasis in an endemic region of São Luiz, capital of Maranhão State. During the prospective study, anti-*Leishmania* DTH and serology were performed twice a year in children whose age was less than 7 years during 1996-1997. Sera from individuals with visceral leishmaniasis or those who were positive either by serology or DTH in the first survey were not used in the present report. A visceral leishmaniasis case was defined by the following criteria: fever, weight loss, hepatosplenomegaly, and anemia. Positivity in the anti-leishmanial tests reported here indicates a recent conversion determined by a sensitive and specific ELISA and/or by DTH. Thus, none of the individuals in the data set had disease, and all had had negative responses to leishmanial antigen during the preceding six-month period. Accordingly, anti-*Leishmania*-reacting children were presumably exposed recently to the pathogen. Assuming that recent seroconversion represents infection and a positive DTH is a marker of protection against leishmaniasis in subclinical cases,<sup>5</sup> we classified children into four groups: (Group I) positive serology and positive DTH, (Group II) positive serology and negative DTH, (Group III) negative serology and positive DTH, and (Group IV) negative serology and negative DTH. Informed consent was obtained from parents or legal guardians of minors. The project was approved by an appropriate institutional review board from the Oswaldo Cruz Foundation.

**Statistical analysis.** The data obtained in this work was not normally distributed, even after several attempts at transformation. Accordingly, the Kruskal-Wallis Analysis of Variance on Ranks (KW-ANOVA) was used to evaluate significance among group medians. The Kolgorovov-Smirnov test was used to test for a normally distributed population. Dunn's procedure was used to perform pairwise multiple comparisons. Correlation tests were done with the Spearman rank order test. A  $P$ -value < 0.05 was used to establish the significance level. A  $P$  < 0.01 is indicated in the text to be

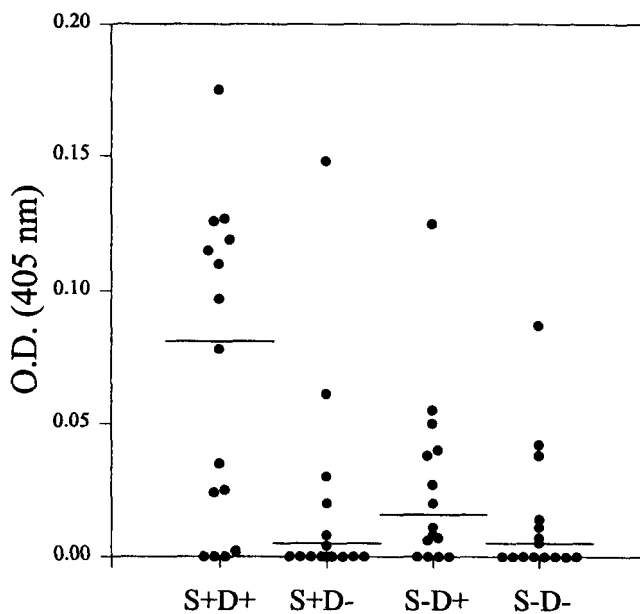


FIGURE 1. Human serum IgG response against salivary gland homogenate of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Human sera were from individuals either positive (D+) or not (D-) to a leishmanin skin test, or having (S+) or not (S-) high IgG serum titer against *Leishmania* as detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ordinate represents the absorbance of the ELISA reaction of these sera against sand fly salivary homogenate. The symbols indicate results from 15 sera from each of the 4 groups used, and the lines represent their median values.

highly significant. Sigastat version 2.0 (Jandel Scientific, San Raphael, CA) was used to perform the statistical tests.

## RESULTS

To investigate whether a human population from an endemic area of visceral leishmaniasis had IgG antibodies against salivary gland antigens of the vector sand fly *Lutzomyia longipalpis*, we measured by ELISA the antibody level in sera of 60 children, which were stratified into four groups according to their reaction to both the DTH reaction (D+ or D-) and antibody level (S+ or S-) (Figure 1). The KW-ANOVA test indicated that the group medians were significantly different ( $P = 0.001$ ). Dunn's pairwise multiple comparison procedure indicated that the significant ( $P < 0.05$ ) comparisons were between the groups S+D+ and S+D- and between S+D+ and S-D-.

Because the positive reaction described above could derive from nonspecific antibody responses, we measured the reactivity of the sera against salivary homogenates of the Old World sand fly, *Phlebotomus papatasi* (Figure 2). Although the optical densities of the ELISA tests were greater than when using *L. longipalpis* salivary homogenates, no significant differences were found among the medians of the four groups as tested by KW-ANOVA ( $P = 0.233$ ).

Because large epidemiological investigations using salivary gland antigens are prohibitive due to the need for dissection of thousands of pairs of salivary glands, we tested the use of a recombinant salivary protein as an antigen for ELISA studies with 15 of the same sera in each group described above (Figure 3). The KW-ANOVA test indicated

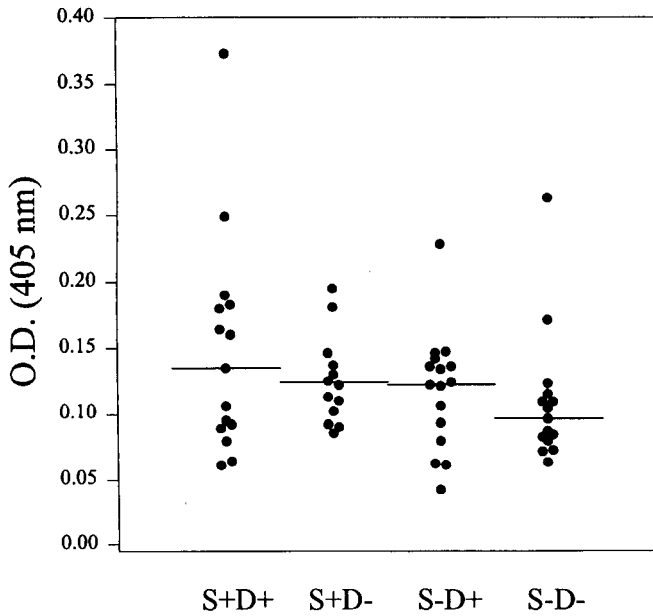


FIGURE 2. Human serum IgG response against salivary gland homogenate of the sand fly *Phlebotomus papatasi*. Fifteen sera in each class were used, except for the S+D- group, where 14 sera were used. Other conditions as in Figure 1.

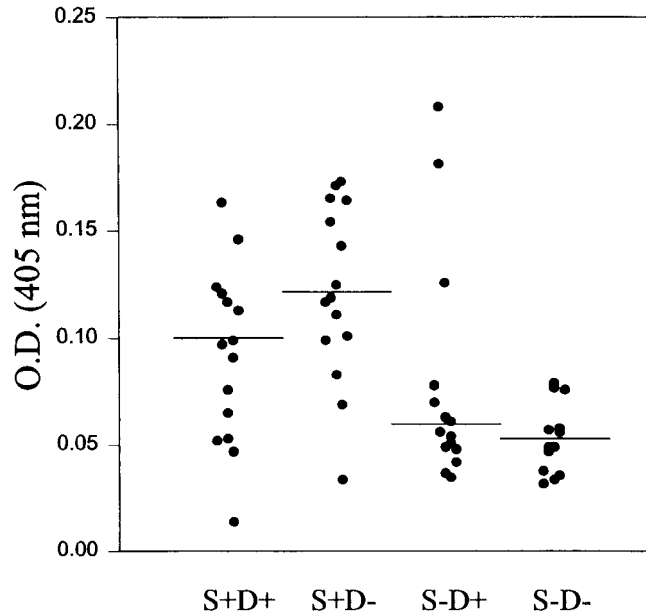


FIGURE 3. Human serum IgG response against recombinant salivary anti-clotting protein from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Fifteen sera in each class are represented, except for the S-D- group where 13 sera were used. Other conditions as in Figure 1.

the differences among the medians to be highly significant ( $P < 0.001$ ). A pairwise multiple comparison test indicated that there were significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups S+D- and S-D- and groups S+D- and S-D+.

To test whether the serologic response to the recombinant antigen correlated with that measured against whole salivary antigen as well as with the other two variables tested, namely, DTH induration and antibody to leishmanial antigen, we performed a Spearman rank order correlation test on these four variables by pooling the results reported in Figures 1 and 3. The results (Table 1) indicate that the response to the recombinant antigen correlates significantly with serological antibody response to leishmanial antigen ( $P < 0.001$ ), and that anti-saliva antibody response correlates ( $P = 0.002$ ) with DTH response to *Leishmania*. Unexpectedly, no correlation was found between responses to the recombinant antigen and whole salivary homogenate.

We evaluated by Western blots the complexity of the antigenic mixture in salivary gland homogenates of *L. longipalpis* using a selected sample of sera that tested either positive or negative by ELISA against *L. longipalpis* salivary homogenates. Sera with the 4 highest (thus designated positive) and 4 lowest (designated negative) OD readings in ELISA were tested in the blots. Results indicate that there are 6 main antigens, of which 3 are commonly recognized by sera from individuals with low response to *Lutzomyia* antigen. Antigens with molecular weights of approximately 6, 12, 36, and 96 kDa were recognized only by sera from individuals with serum IgG antibodies to *Lutzomyia* antigen (Figure 4).

DISCUSSION

Results presented in this paper indicate that children positive to leishmanin as assayed by a skin test react positively

to salivary gland antigen of the sand fly *L. longipalpis* (Figure 1, Table 1). This serum IgG antisalivary homogenate response correlated positively with DTH intensity (Table 1). The complexity of the antigenic mixture comprised in the salivary gland homogenate is indicated by Western blot

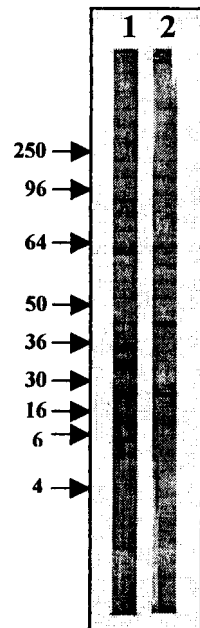


FIGURE 4. Western blots indicating human IgG serum reactivity against *Lutzomyia longipalpis* salivary gland antigens separated SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. 1 = positive serum 2 = negative serum. The results are representative of 4 positive and 4 negative sera, with the positive sera being the four most-reactive sera by enzyme-linked immuno sorbent assay against *L. longipalpis* salivary homogenate, and the negative sera being the four least-reactive sera.

TABLE 1

Spearman rank order correlation test results for associations between antibody titers against recombinant salivary anti-clotting protein ( $\alpha$ -rAC IgG), against sand fly salivary homogenate ( $\alpha$ -saliva IgG), against *Leishmania* antigen ( $\alpha$ -*Leishmania* IgG), and by skin reaction to the leishmanin antigen (DTH)

	Delayed type hypersensitivity	$\alpha$ -saliva IgG	$\alpha$ - <i>Leishmania</i> IgG
$\alpha$ -rAC IgG (n = 59)	r = -0.0064	r = 0.0512	r = 0.450
DTH (n = 60)	P = 0.616	P = 0.699 r = 0.394 P = 0.00197	P < 0.001 r = 0.0635 P = 0.629

r = correlation coefficient.  
P = probability.

where up to 6 bands were observed in some positive sera. These results have a two-fold implication: 1) individuals exposed to *Leishmania* recognize salivary gland antigens of the vector sand fly, a finding reported here for the first time and 2) to the extent that response to the vector salivary gland antigen is protective in the development of disease (a possibility substantiated in laboratory models of leishmaniasis),<sup>7-9,16</sup> the possibility exists to track this cohort of children to investigate their disease outcome according to their anti-salivary gland titer. This last implication, if proven negative (high anti-saliva titer negatively correlated with disease outcome), can give support for development of an anti-vector-based vaccine for leishmaniasis.

Results indicate that individuals with low ELISA reactivity to *Lutzomyia* salivary antigens recognize 3 antigen bands by Western blots, but that up to 6 bands are recognized by sera from individuals having high antibody titers in the same ELISA test. The positive bands found in ELISA-negative individuals could be either the result of low exposure to the sand fly or due to cross-reactivity of some *Lutzomyia* antigens with other arthropod antigens. Indeed, antibody responses to the tick vector of Lyme's disease correlated with *Borrelia burgdorferi* antibody titer and also with ELISA titer against salivary gland homogenates of the non-vector tick *Dermacentor variabilis*, or even the mosquito *Aedes aegypti*.<sup>20</sup> Use of a recombinant salivary protein from the tick *Ixodes scapularis* is now being used as a marker of exposure to the vector of Lyme disease, where antibody responses to the recombinant salivary calreticulin homologue correlate with the degree of engorgement of the tick on human.<sup>26, 27</sup>

Serum IgG responses against *Phlebotomus papatasi* did not differ among the 4 groups tested (Figure 2). Although this result supports the conclusion that the response to *L. longipalpis* antigens is not an artifact due to nonspecific polyclonal IgG activation, it does not exclude the possibility of cross reactivity between antigens of *L. longipalpis* and *P. papatasi*, or, for that matter, any other arthropod antigen. Indeed, the greater optical densities shown in the *P. papatasi* ELISA could represent cross-reactivity of *P. papatasi* salivary antigens with some widespread antigen recognized by all four groups of sera.

Thorough evaluation of sand fly salivary components to aid epidemiology or control of leishmaniasis will require large amounts of antigen, which is not feasible due to technical difficulties in rearing and dissecting sand flies. Until recently, only one salivary gland cDNA was cloned from *L.*

*longipalpis* salivary glands, coding for the relatively small (6.5 kDa) vasodilator maxadilan.<sup>10</sup> More recently,<sup>13,11</sup> new cDNA clones were identified, 9 of which encode secretory material as indicated by their leader sequences or isolation and amino-terminal sequence of their coded proteins. One such salivary gland cDNA, coding for the salivary anti-clotting protein was expressed in *E. coli*. Large amounts of product were obtained in inclusion bodies, which were further purified by HPLC to serve as an antigen in the present study. Reactivity to recombinant anti-clotting protein correlated positively with serum anti-*Leishmania* titers. However, it did not correlate with DTH response or with the response against total salivary homogenate, indicating that the response to individual salivary components may not be representative of that to the total homogenate.<sup>13</sup>

Immune reaction to salivary homogenate is complex, as indicated by the Western blot data (Figure 4). Each antigen in the homogenate may elicit a different pattern of response in different individuals, and may have a different temporal pattern of induced reactivity according to the timing and intensity of exposure. Ultimately, production and testing of several recombinant antigens may yield a mix that will substitute for the whole salivary homogenate. However, individual antigens may have unique value, as indicated by the recombinant anti-clotting protein. Serum anti-recombinant protein IgG levels correlated positively with serum IgG levels against leishmanial antigen, indicating that this recombinant antigen may be a good marker of vector exposure. Ultimately, before either saliva or recombinant antigens can be used for widespread ELISA screening, two controlled, basic studies should be accomplished: 1) the frequency with which exposed humans develop antibodies to those antigens will have to be determined; and 2) the specificity and sensitivity of an ELISA to detect those antibodies will have to be determined.

**Acknowledgments:** We are grateful to an anonymous reviewer for helpful criticism and suggestions. Work supported in part by grants from the Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), and National Institutes of Health (TMRC, USA). Aldina Barral and Manoel Barral-Netto are Senior Investigators of the Brazilian National Research Council (CNPq).

**Authors' addresses:** Aldina Barral, Eduardo Honda and Manoel Barral-Netto, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, R. Waldemar Alcântara, 121—Brotas, 40.295-001 SSA, Bahia, Brazil. Phone 55-(0)71-356.8782 Ext.215 FAX 55-(0)71-356.2255. E-mail: mbarral@cpqgm.fiocruz.br. Arlene Caldas and Jackson Costa, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, Praça Madre Deus No. 02, 65.025-560 São Luis, Maranhão, Brazil, Phone/FAX 55-98-2225135. Vera Vinhas, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas, s/n, 40.110-040 SSA, Bahia, Brazil, Phone 55-71-237-7353, FAX 55-71-245-7110. José M.C. Ribeiro, J.G. Valenzuela and Rosane Charlab, Section of Medical Entomology, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, Building 4 Rm. 126, 4 Center Dr. MSC-0425, Bethesda MD 20892-0425, Phone: (301) 496-3066 FAX: (301) 402-4941. Edgar D. Rowton, Department of Entomology, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, District of Columbia 20307, Phone: 202-782-0026.

Reprint requests: José M.C. Ribeiro, NIAID/LPD, Building 4 Rm. 126, 4 Center Drive, MSC-0425, Bethesda MD 20892-0425. Phone: (301) 496-3066. FAX: (301) 402-4941. E-mail: JRibeiro@nih.gov.

## REFERENCES

1. Killick-Kendrick R, 1979. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand flies. Lumsden W, Evans D, eds. *Biology of the kinetoplastida*. New York: Academic Press, 395–460.
2. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr, 1986. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 154: 1003–1011.
3. Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD Jr, 1987. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis in Northern Brazil. *J Infect Dis* 156: 1030–1033.
4. Badaro R, Jones TC, Lorenco R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Johnson WD Jr, 1986. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 154: 639–649.
5. Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaró R, Rocha H, Johnson WD Jr, 1992. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis* 165: 535–540.
6. Titus RG, Ribeiro JMC, 1990. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. *Parasitol Today* 6: 157–160.
7. Titus RG, Ribeiro JMC, 1988. Salivary gland lysates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306–1308.
8. Theodos CM, Ribeiro JMC, Titus RG, 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* 59: 1592–1598.
9. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL, 1998. 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: 1941–1953.
10. Lerner EA, Shoemaker CB, 1992. Maxadilan: cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem* 267: 1062–1066.
11. Lerner EA, Ribeiro JMC, Nelson RJ, Lerner MR, 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266: 11234–11236.
12. Soares MB, Titus RG, Shoemaker CB, David JR, Bozza M, 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF- $\alpha$  and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* 160: 1811–1816.
13. Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JM, 1999. 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.
14. Jones LD, Hodgson E, Nuttal PA, 1989. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J Gen Virology* 70: 1895–1898.
15. Jones LD, Kaufman WR, Nuttal PA, 1992. Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. *Experimentia* 48: 779–782.
16. Bell JF, Stewart SJ, Wikel SK, 1979. Resistance to tick-borne *Francisella tularensis* by tick-sensitized rabbits: Allergic Kennedyity. *Am J Trop Med Hyg* 28: 876–880.
17. Feingold B, 1968. The allergic responses to insect bites. *Ann Rev Entomol* 13: 137.
18. Brummer-Korvenkontio H, Lappalainen P, Reunala T, Palosuo T, 1994. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. *J All Clin Immunol* 93: 551–555.
19. Wikel SK, 1996. Host immunity to ticks. *Ann Rev Entomol* 41: 1–22.
20. Schwartz BS, Ribeiro JMC, Goldstein MD, 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiological tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132: 58–66.
21. Schwartz BS, Ford DP, Childs JE, Thomas RJ, 1991. Anti-tick saliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *Am J Epidemiol* 134: 86–95.
22. Modi GB, Tesh RB, 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Phlebotomidae) in the laboratory. *J Med Entomol* 20: 568–569.
23. Ribeiro JMC, Rowton E.D., Charlab R., 2000. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 271–277.
24. Badaro R RS, Barral A, Orge G, Jones TC, 1986. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 35: 72–78.
25. Reed S, Badaro R, Masur H, Carvalho E, Lorenco R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WJ, Jones T, 1986. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35: 79–85.
26. Sanders ML, Jaworski DC, Sanchez JL, DeFraitres RF, Glass GE, Scott AL, Raha S, Ritchie BC, Needham GR, Schwartz BS, 1998. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *Am J Trop Med Hyg* 59: 279–285.
27. Sanders ML, Glass GE, Nadelman RB, Wormser GP, Scott AL, Raha S, Ritchie BC, Jaworski DC, Schwartz BS, 1999. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *Am J Epidemiol* 149: 777–784.