

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS**

**THIAGO LEITE FRAGA**

**EXPOSIÇÃO HUMANA À SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* E AO PARASITO  
*Leishmania* sp. EM ÁREA DE TRANSMISSÃO ESPORÁDICA DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL**

**CAMPO GRANDE**

**2016**

**THIAGO LEITE FRAGA**

**EXPOSIÇÃO HUMANA À SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* E AO PARASITO  
*Leishmania* sp. EM ÁREA DE TRANSMISSÃO ESPORÁDICA DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas e Parasitárias, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval

**CAMPO GRANDE**

**2016**

A Simone pelo seu papel na minha vida, de esposa, colega, companheira, “cozinheira”, fonte de entretenimento e por ter trazido à minha vida o som, o barulho, o desassossego, o caos no pensamento e na organização do lar, chamado HELENA, e pela sua visão de ter balançado o modo de pensar e repensar a vida, a biologia e a ciência.

Aos meus pais, sempre um porto seguro de emoção serena, pelo exemplo de solidez moral e firmeza de caráter e por terem proporcionado apoio incondicional, mesmo distantes.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Dra. Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, por estar sempre disposta a escutar e dividir, pelas ricas discussões, delicadeza e confiança. Agradeço pelas oportunidades que me fizeram crescer, não só profissionalmente, mas como pessoa. Mas especialmente, pela amizade e exemplo de integridade, ética e sabedoria na profissão e na vida.

À Dra. Aldina Barral do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/FIOCRUZ-BA pela grande colaboração, laboratorial, pelo apoio fundamental, oportunidade e acolhida no laboratório. Em especial à grande amiga Juqueline por sua incansável disponibilidade em ajudar-me pelo carinho, amizade e paciência nos ensinamentos quando cheguei ao laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, a todos os professores e funcionários.

A Fundect, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul pelo apoio financeiro.

Ao Ministério da Saúde e LACEN, - na pessoa do Sr. Luis Henrique Demarchi pela cedência do antígeno de Montenegro.

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral .....	12
2.2 Diagnóstico da leishmaniose visceral.....	13
2.2.1 Diagnóstico parasitológico.....	14
2.2.2 Diagnóstico sorológico.....	15
2.2.2.1 ELISA ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ).....	15
2.2.2.2 Teste Imunocromatográfico rK39.....	16
<b>3 INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA.....</b>	<b>14</b>
<b>4 SALIVA DO FLEBOTOMÍNEO.....</b>	<b>19</b>
<b>5 TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA.....</b>	<b>25</b>
<b>6 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>7 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
7.1 Área de estudo.....	29
7.2 Local e população do estudo.....	29
7.3 Critérios de inclusão.....	31
7.4 Critérios de não-inclusão.....	32
7.5 Definição de leishmaniose infecção ou forma assintomática da LV.....	32
7.6 Coleta de sangue.....	32
7.7 Teste de hipersensibilidade do tipo tardia.....	32
7.8 ELISA para detecção de IgG anti- <i>Leishmania</i> .....	33
7.9 ELISA para detectar IgG antissaliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	33
7.10 Teste imunocromatográfico rK39.....	34
7.11 Análise estatística.....	35
7.12 Aspectos éticos.....	35
<b>8 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
8.1 Artigo 1 <b>INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR <i>Leishmania</i> sp. EM CRIANÇAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL.....</b>	<b>38</b>
8.2 Artigo 2 - <b>INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR <i>Leishmania</i> sp. E ANTICORPOS ANTISSALIVA DE <i>Lutzomyia longipalpis</i> EM CRIANÇAS NA REGIÃO CENTRO OESTE DO BRASIL.....</b>	<b>57</b>
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>

<b>10 CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>97</b>

## RESUMO

Este é o primeiro estudo na região Centro-Oeste do Brasil que relata a presença de infecção assintomática por *Leishmania* em crianças de área de transmissão esporádica de leishmaniose visceral. O objetivo do trabalho foi avaliar a exposição humana ao parasito *Leishmania* sp. e à saliva de *Lutzomyia longipalpis*. Anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados pela técnica de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) em 20,1% dos 492 participantes, e 38,6% das crianças apresentaram teste de hipersensibilidade tardia (DTH) positivo. Positividade para anticorpos anti-*Leishmania* e para DTH, foi observada simultaneamente em 10,4% das crianças. A prevalência sorológica foi maior nas crianças de 7 a 9 anos de idade. Todas as amostras foram avaliadas pelo teste rápido rK39 e nenhuma mostrou-se positiva. Do total de 492 crianças, anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* foram detectados em 38,4%. Houve maior porcentagem (64,7%) de crianças com valores de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* nas crianças positivas para anti-*Leishmania* e para o teste de hipersensibilidade do tipo tardia (n=84) com 34,8%. A presença de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* correlacionou-se fortemente com a proteção à infecção e o desenvolvimento de anticorpos anti-*Leishmania*. Os resultados revelam que as crianças foram expostas às picadas de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e ao protozoário *Leishmania* sp., com aparente imunocompetência, pois nenhuma delas, durante o acompanhamento clínico, apresentou sintomatologia sugestiva de leishmaniose visceral. Os resultados relativos à pesquisa de IgG antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* mostraram que, do mesmo modo que muitas crianças foram expostas a flebotomíneos possivelmente infectados, também desenvolveram anticorpos antissaliva, o que pode indicar que a saliva possui poder imunogênico, podendo ser utilizado como marcador epidemiológico de exposição.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, *Lutzomyia longipalpis*, Saliva, Infecção Assintomática, Teste Rápido.

## ABSTRACT

This is the first study in the Central-West Brazil reports the presence of asymptomatic infection by *Leishmania* in sporadic transmission area. The aim of this work was to evaluate human exposure to saliva of *Lutzomyia longipalpis* and parasite *Leishmania* sp. anti-*Leishmania*. Antibodies were detected by Enzyme Linked Immuno Sorbent technique assay (ELISA) in 20.2% participants of 492, and 38.7% of children showed positive DTH. Positivity for antibodies anti-*Leishmania* and stop DTH, was observed in 10.4%. Serological prevalence was higher in children aged 7 to 9 years of age. The presence of antissaliva antibodies of *Lutzomyia longipalpis* correlated strongly with the protection and development of anti-*Leishmania* antibodies. Total of 492 children, antissaliva antibodies of *Lutzomyia longipalpis* were detected in 38.4% of 492 participants. There was a higher percentage (64.7%) of children with values of antissaliva antibodies of *Lutzomyia longipalpis* in children same stop anti-*Leishmania* and stop the late-type hypersensitivity test (n=84) with 34.8%. All as if were evaluated by the quick test rK39 and no proved positive. The results show that, as children were exposed to flebotomíneo and the protozoan, with apparent immune competence, because none of them, during follow-up, minister symptomatology suggestive of visceral leishmaniasis. The results of research of antissaliva IgG capital of *Lutzomyia longipalpis* showed that, in the same way many children were exposed to infected sand fly, also developed the antissaliva antibodies may indicate the saliva sand fly has high immunogenic, but may be notes as epidemiological marker of exposure.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, Saliva, Asymptomatic Infection, Rapid Test.

## 1 INTRODUÇÃO

Em Mato Grosso do Sul, a leishmaniose visceral (LV) é endêmica e as características de introdução e dispersão da doença no Estado têm semelhança epidemiológica com outras áreas de ocorrência, com a doença canina precedendo os casos humanos.

Na cidade de Dourados-MS, casos de LV em cães têm sido identificados pelo Centro de Controle de Zoonoses desde 2003, e hoje a doença figura como um importante agravo entre os animais sendo motivo de preocupação tanto para os clínicos quanto para os órgãos de controle.

A leishmaniose visceral apresenta um amplo espectro clínico manifestando-se desde forma assintomática ou inaparente; oligossintomática ou subclínica e a forma clássica. É uma doença sistêmica, podendo acometer vários órgãos, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea. Apresenta evolução longa, podendo durar alguns meses ou até ultrapassar o período de um ano e se não tratada, pode ser fatal.

Na infecção assintomática, os indivíduos apresentam o protozoário circulante, mas não possuem manifestações clínicas da doença. Em áreas endêmicas esta forma é muito comum, encontrando-se indivíduos com reações sorológicas positivas, porém com baixo nível de anticorpos anti-*Leishmania*.

As infecções subclínicas são marcadas por sintomatologia inespecífica e discreta, ocorre preferencialmente em crianças, e na maioria dos casos evolui para cura espontânea, porém pode progredir para a forma clássica da doença.

A LV clássica expressa febre irregular prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia, palidez cutâneo-mucosa, anorexia, debilidade progressiva, podendo ocorrer também manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos.

A LV assintomática tem sido uma preocupação crescente, pois sabe-se que o parasita a qualquer momento pode manifestar-se e passar a se multiplicar com rapidez no sistema monocítico fagocitário humano, dependendo de fatores como estado imunológico e nutricional do paciente. Assim, têm surgido novas pesquisas nos principais estados do Brasil em que esta parasitose é considerada endêmica.

A confirmação da presença de *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor de *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral, e sua alta densidade na área urbana e peri-urbana da cidade de Dourados, aliado ao incremento progressivo no número de casos caninos e às observações epidemiológicas e/ou experimentais que

sugerem a maior incidência de LV humana em domicílios que albergam cães infectados, faz aumentar o alerta e a busca por melhor conhecimento da situação epidemiológica dessa parasitose em área de transmissão esporádica como a cidade de Dourados.

*Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor de *Leishmania infantum* na América Latina e dada sua importância, muitos estudos têm sido realizados focando a sua interação com os hospedeiros, especialmente na ação da saliva nos processos de hematofagia e de transmissão do parasito, tentando preencher lacunas no conhecimento dessas interações.

No ciclo natural de transmissão da leishmaniose visceral, as fêmeas de flebotomíneos infectadas regurgitam formas promastigotas na pele de hospedeiro junto com a saliva. Componentes salivares possuem propriedades imunomodulatórias que facilitam o estabelecimento da infecção no hospedeiro. Sabe-se que proteínas imunossupressoras estão presentes na saliva da maioria dos artrópodes que realizam repasto sanguíneo, o que pode ser uma razão para que os mesmos atuem como vetores na transmissão de agentes patogênicos e no desenvolvimento da doença no hospedeiro.

Alguns estudos provam que a saliva de flebotomíneos exerce importante papel como anticoagulante, além de possuir o mais potente vasodilatador conhecido, o maxadilán que inibe a ação de macrófagos, aumenta o fluxo sanguíneo e assim acelera e otimiza o repasto sanguíneo. Além do maxadilán, foi provado a existência de um grande número de substâncias nos extratos salivares de flebotomíneos, que incluem a habilidade de inibir a hemostasia, vasoconstrição e desenvolvimento da inflamação e da resposta imune. Estas proteínas salivares mostraram ser imunogênicas para seres humanos, cães e ratos.

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea de flebotomíneo introduz suas peças bucais na pele do hospedeiro vertebrado, causando traumas e laceração de pequenos vasos e hemorragia local. A picada do inseto exerce na pele uma ação mecânica e enzimática por meio da saliva, e mecanismos naturais de defesa do hospedeiro são ativados no local da inoculação, tais como reações do sistema complemento, ativação de trombina, plaquetas, anticorpos naturais e fagócitos. Repetidas exposições ao homogeneizado de extrato salivar de *Lutzomyia longipalpis* em ratos mostrou proteção suficiente para impedir o desenvolvimento da doença.

Fatores inerentes ao hospedeiro também podem afetar o processo da infecção por *Leishmania* spp, destacando-se a presença de determinadas citocinas durante os eventos iniciais da diferenciação celular e os mecanismos sinalizadores usados pelas

subclasses de células T auxiliares. Em condições normais, várias células fagocíticas englobam os parasitos, que se multiplicam rapidamente e resistem à ação destruidora dos macrófagos, culminando com o rompimento da célula antes que a mesma exerça seu papel de destruição dos parasitos.

Este quadro de interações entre componentes da saliva, proteínas da superfície do parasito e padrões distintos de resposta mediada por linfócitos determinam o curso da relação parasito-hospedeiro, ou seja, suscetibilidade ou resistência, tendo em vista que o maxadilán, as interleucinas e prostaglandinas são capazes de potencializar a visceralização do parasito e o desenvolvimento da doença.

Estudos voltados para a interação da saliva com o sistema imune de hospedeiros vertebrados fazem-se ainda mais necessários depois da demonstração *in vivo* de proteção contra a infecção por *Leishmania* conferida pela imunização com componentes salivares. Neste contexto, este estudo justifica-se devido à necessidade de esclarecer se a população humana de áreas com leishmaniose visceral canina encontra-se exposta às picadas de *Lutzomyia longipalpis* e, conseqüentemente ao protozoário.

A análise da presença de marcadores sorológicos preditivos de suscetibilidade ou resistência é de grande importância no estudo da leishmaniose visceral, pois poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle epidemiológico, visto que as proteínas salivares do vetor representam um potencial marcador de exposição aos reservatórios do agente etiológico, contribuindo para a compreensão das interações entre vetor-hospedeiro neste agravo de grande importância em saúde pública.

Diante destas informações e o incipiente conhecimento sobre o papel dos portadores assintomáticos na leishmaniose visceral, a hipótese que se levanta é se indivíduos que residem numa área com presença de *Lutzomyia longipalpis*, seriam capazes de desenvolver imunidade antissaliva e uma resposta imune contra *Leishmania infantum*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral também conhecida como Calazar tem por agentes etiológicos, protozoários pertencentes ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, sendo conhecidas três espécies pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (HERWALDT, 1999), quais sejam, *Leishmania (L.) donovani*, agente causador de uma antroponose na Índia e em algumas regiões da África, onde o homem é o único reservatório; *L. (L.) infantum* encontrada em parte dos continentes asiático, africano e europeu, responsável por uma zoonose de canídeos silvestres, tendo o cão como reservatório doméstico do protozoário, à semelhança da parasitose que ocorre no Novo Mundo, pois trabalhos utilizando análises genética e fenética, não mostram distinção entre *L. infantum* e *L. chagasi*, por isso, acredita-se que os parasitos constituem uma única espécie (GRIMALDI; DAVID; MAHON-PRATT, 1987; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000).

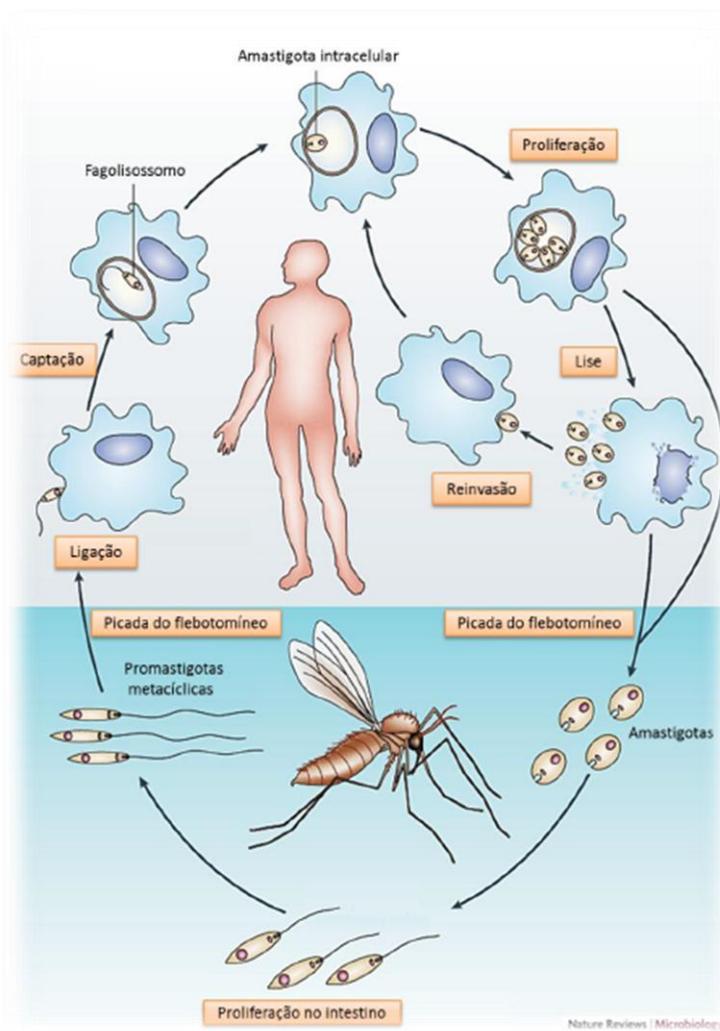
A leishmaniose acomete cerca de 12 a 15 milhões de indivíduos em todo o mundo, principalmente aqueles residentes em áreas tropicais e subtropicais do planeta. Estima-se que 500.000 novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente, constituindo assim um crescente problema de saúde pública, acometendo boa parte dos continentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2014).

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica, podendo acometer vários órgãos, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea. Caracteriza-se por acessos irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. Apresenta evolução longa, podendo durar alguns meses ou até ultrapassar o período de um ano e se não tratada, pode ser fatal (BRASIL, 2014).

A transmissão usual de *Leishmania* spp ocorre a partir da picada de insetos vetores, flebotomíneos. Apenas as fêmeas são hematófagas. Estas estão aptas a hematofagia no primeiro dia de vida, porém normalmente a realizam após o segundo dia, tempo em que suas peças bucais já se encontram rígidas e as glândulas salivares amadurecidas (VOLF; TESAROVÁ; NOHYNKOVÁ, 2000; PRATES; SANTOS; MIRANDA, 2008). O ciclo de vida do parasito inicia-se quando uma fêmea ingere formas amastigotas de *Leishmania* durante o repasto sanguíneo no hospedeiro

vertebrado infectado. Após a picada, as amastigotas ingeridas juntamente com o sangue, livres ou no interior dos macrófagos, se diferenciam em formas promastigotas no intestino do inseto vetor, multiplicam-se e atingem o estágio de promastigota metacíclica, forma infectante para os hospedeiros vertebrados. A transmissão do parasito ocorre quando o flebotomíneo infectado faz um segundo repasto sanguíneo e inocula as formas infectantes na pele do vertebrado juntamente com a saliva (KAYE; SCOTT, 2011) (Figura 1).

Figura 1- Ciclo de vida de *Leishmania* sp.



Fonte: Adaptado de Kaye; Scott (2011).

## 2.2 Diagnóstico da leishmaniose visceral

Na leishmaniose as características clínicas e epidemiológicas não são sempre específicas podendo se confundir com outras patologias. Assim, o diagnóstico

laboratorial é necessário para confirmar a suspeita clínica, e fatores como a agilidade e a confiabilidade dos resultados são essenciais para o tratamento oportuno e controle epidemiológico da parasitose. Entretanto, as técnicas de diagnóstico de maior sensibilidade necessitam de mão de obra qualificada e/ou equipamentos complexos, cuja disponibilidade em áreas endêmicas, onde são mais necessários, é limitada.

Nesse contexto, o diagnóstico da LV ainda pode ser considerado um problema importante e de difícil solução. Guerin *et al.* (2002) realizaram um estudo na Índia que exemplificou a dificuldade da confirmação diagnóstica ao estimar aproximadamente em 7,7 meses o tempo entre início dos sintomas e o diagnóstico definitivo da doença. No Brasil, Pastorino *et al.* (2002); Queiroz; Alves; Correia, (2004) Brustoloni *et al.* (2010); Oliveira *et al.* (2010), descrevem que há grande variabilidade em relação ao tempo de evolução da doença encontrada, períodos que variam de dois a seis meses em média. A demora no diagnóstico e tratamento dos pacientes com LV, tem sido fatores de risco para morte.

### **2.2.1 Diagnóstico parasitológico**

O padrão “ouro” no diagnóstico da leishmaniose visceral ainda são as técnicas baseadas na detecção direta e no isolamento em cultivo *in vitro* do parasito. Apesar da vantagem de apresentarem metodologia simples para realização dessas técnicas, há a necessidade da coleta de aspirados de medula óssea, baço, linfonodo ou de fígado, o que torna esses procedimentos invasivos e arriscados. Embora a especificidade da microscopia direta seja elevada, a sensibilidade é muito variável com níveis relatados em torno de 55% a 97% em material de medula óssea, 95% em aspirados esplênicos e 60% em linfonodos (MURRAY *et al.*, 2005; SINGH, 2006).

A coleta do aspirado de baço, fígado ou medula óssea requer experiência do profissional que a realiza; o procedimento é difícil de ser executado fora de um hospital ou de um centro especializado; e também apresenta algumas contraindicações, como em casos de anemia grave, tendência à hemorragia ou durante a gestação (DESJEUX, 2004). Durante a punção do baço ou fígado pode haver complicações, causando sangramentos o que torna esse procedimento arriscado e potencialmente fatal (SIDDIG *et al.*, 1988; ZIJLSTRA *et al.*, 2002). Apesar disso, o exame microscópico de aspirado de medula óssea é um método diagnóstico seguro para os pacientes pediátricos e que oferece grande sensibilidade (85%-95%) para demonstração do parasita

(SRIVASTAVA *et al.*, 2011; KAFETZIS; MALTEZOU, 2012). No entanto, punções repetidas podem ser necessárias para o aumento da sensibilidade da técnica.

O cultivo dos parasitos pode ser usado como alternativa para aumentar a sensibilidade. Entretanto, a cultura de tecidos, geralmente realizada em meios enriquecidos apropriados (meio líquido de LIT – “*liver infusion tryptose*” ou de Schneider, e meio NNN – “Novy MacNeal – Nicolle”) é demorada, com crescimento de parasitos demandando dias ou semanas, não sendo adequada para casos que requeiram decisões imediatas (MURRAY, 2000; BRASIL, 2014). Em relação aos índices de positividade da mielocultura, há variações em torno de 40%-50%, enquanto que a de aspirado esplênico situa-se em torno de 70-98% (SINGH; SIVAKUMAR, 2003).

### **2.2.2 Diagnóstico Sorológico**

Uma resposta do tipo humoral com elevados níveis de anticorpos é observada entre os pacientes com LV antes da resposta celular (BURS *et al.*, 1993). Sendo assim, a utilização da sorologia tem sido explorada para o diagnóstico da doença em pacientes imunologicamente competentes.

O Ministério da Saúde recomenda a utilização da reação de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e recentemente o teste imunocromatográfico rK39, devido a sua rápida aplicação e fácil interpretação.

#### **2.2.2.1 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)**

É usada para diagnóstico de muitas doenças infecciosas, incluindo as leishmanioses e baseia-se na reação antígeno-anticorpo, detectada por um anticorpo contra a espécie avaliada, conjugado a uma enzima. A detecção do complexo Ag/Ac é revelada por um sal cromógeno. A intensidade da reação é medida pela densidade ótica (DO) em um espectrofotômetro. O teste tem sido o de maior escolha para o diagnóstico da LV, pois é um método prático, rápido, de resultados confiáveis e mostra-se uma técnica muito sensível e específica. Entretanto, seus valores dependem da qualidade dos antígenos empregados. O antígeno total solúvel de *Leishmania* é o mais utilizado, com sensibilidade entre 80%-100%, porém tem a desvantagem de ser pouco estável, apresentando uma reprodutibilidade pouco satisfatória e, em baixa titulação da amostra,

apresenta reações cruzadas com tuberculose, toxoplasmose e tripanossomose (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000; KUMAR *et al.*, 2001; SUNDAR; RAI, 2002; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

A obtenção de antígenos têm sido melhorada através da utilização da tecnologia do DNA recombinante, com a produção e purificação em grandes quantidades, de moléculas recombinantes e de relevância no diagnóstico (SUNDAR; RAI, 2002; MOHAPATRA *et al.*, 2010).

O produto recombinante rK39 provou ser um antígeno muito sensível e específico para o diagnóstico sorológico de LV (BURS *et al.*, 1993; BADARÓ *et al.*, 1996). O rK39 é específico para espécies do complexo *L. donovani* e quando aplicado no teste ELISA, mostrou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade (BURS *et al.*, 1993). Pode-se citar outros antígenos recombinantes já utilizados e em fase de validação, como o rK28 e o rK26 (PATTABHI *et al.*, 2010).

#### **2.2.2.2 Teste Imunocromatográfico rK39**

O teste rápido (Kalazar Detect™) é um teste imunocromatográfico produzido pela InBios International, Seattle, WA, USA, destinado à determinação qualitativa de anticorpos no soro, que permite a detecção rápida de anticorpos contra *Leishmania* sp. O produto é composto de uma membrana de nitrocelulose, uma ampola contendo tampão, uma lanceta, um tubo capilar plástico e álcool. Na membrana de nitrocelulose está adsorvido o antígeno rK39, formando a linha teste e anti-IgG humano, constituindo a linha controle (ANDERSON; LITWIN; WELCH, 2008).

O teste imunocromatográfico rK39 tornou-se popular nos últimos anos (SRIVASTAVA *et al.*, 2011), por ser um teste de aplicação rápida (“*dipstick*”), de fácil interpretação, com leitura em 10 minutos. É um método diagnóstico de imunoensaio qualitativo e baseia-se na reação do sangue ou soro do paciente com o antígeno recombinante de *Leishmania*, rK39, purificado e fixado em papel de nitrocelulose (SUNDAR; RAI, 2002; GONTIJO; MELO, 2004).

O antígeno recombinante K39 (rK39) é específico para as espécies do complexo *L. donovani* (BURS *et al.*, 1993; GONTIJO; MELO, 2004).

Em pacientes sintomáticos, a sensibilidade do teste imunocromatográfico rK39 é alta 90-100% (SUNDAR; RAI, 2002; VEEKEN *et al.*, 2003), enquanto que a especificidade pode variar muito de acordo com a região (SUNDAR; RAI, 2002).

Estudo de meta-análise para a validação do teste mostrou sensibilidade de 93,9% e especificidade de 95,3% com intervalo de confiança de 95% (CHAPPUIS *et al.*, 2007; COTA; SOUZA; RABELLO, 2011).

### 3 INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA

A infecção assintomática vem sendo apresentada com certa relevância em vários países como Índia (DAS *et al.*, 2011); África (FAKHAR *et al.*, 2008); Itália (BIGLINO *et al.*, 2010); Irã (SOUHAILA; KHAWLA; KHITAM, 2010) e Brasil (BARÃO *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2013).

Há muita discussão sobre a interação entre espécies visceralizantes de *Leishmania* e a resposta imune humana, assim como sobre os mecanismos imunológicos responsáveis pelas manifestações clínicas que resultam dessa interação.

Em relação à resposta imune humoral na leishmaniose, testes sorológicos têm sido de grande importância no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos, pois além de analisar a presença de anticorpos anti-*Leishmania*, permitem avaliar o curso evolutivo da infecção e auxiliar na compreensão dos mecanismos de controle do sistema imune sobre os parasitos (TRUJILLO *et al.*, 1999).

Métodos imunológicos são os melhores e mais utilizados na prática diária para avaliar a resposta imune humana contra a infecção assintomática por *Leishmania* e auxiliar na avaliação epidemiológica. Em geral, dois tipos de testes têm sido escolhidos: a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) que permitem avaliar a resposta imune humoral (resposta imune CD4+ Th2) e (resposta imune CD4+ Th1) avaliada pelo teste de hipersensibilidade retardada (*Delayed Type Hypersensitivity* - DTH).

Nos ensaios, geralmente apenas um tipo de teste imunodiagnóstico tem sido utilizado para avaliar a resposta humoral ou a celular, o que dificulta a abordagem mais ampla da resposta imune. Com o objetivo de ilustrar estas situações, é importante mencionar estudos feitos na África, especialmente no Sudão (ZIJLTRA *et al.*, 2002) e na Etiópia (ALI, ASHFORD, 1994), relatando a epidemiologia, as manifestações clínicas e a imunologia da infecção humana causada por *Leishmania* (*Leishmania donovani*), usando o DTH para explorar a hipersensibilidade do tipo tardia ou o ELISA para investigar a resposta de detecção de anticorpos.

Em alguns países asiáticos, como Índia (SUNDAR; SAHU; MEHTA, 2003) e Nepal (SCHENKEL *et al.*, 2006) onde é alta a prevalência de leishmaniose causada por *L. (L.) donovani*, foram usadas abordagens imunológicas semelhantes às da África para compreender os aspectos da doença humana. Em países mediterrâneos da Europa, como a Itália (PAMPIGLIONE *et al.*, 1975), Espanha (GARROTE *et al.*, 2004) e Grécia (PAPADOPOULOU *et al.*, 2005), onde *L. (L.) infantum*, é agente de leishmaniose visceral humana, as investigações imunológicas da infecção humana utilizaram a associação dos testes intradérmico e de pesquisa de anticorpos.

Os estudos de prevalência de infecção por *Leishmania infantum* têm sido desenvolvidos com as mais variadas ferramentas de diagnóstico. Na América do Sul, onde o Brasil concentra a maior incidência de LV por *L. (L.) infantum*, poucos estudos baseados em testes isolados, relatam a epidemiologia e aspectos clínicos e imunológicos da infecção, e quando utilizam associação de testes, estes são realizados em crianças (BADARÓ *et al.*, 1986a; BADARÓ *et al.*, 1986b; REED *et al.*, 1986; JERÔNIMO *et al.*, 2000; BARRAL *et al.*, 2000; GAMA *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2005).

No Brasil, os testes mais utilizados para a avaliação da prevalência de infecção são as provas sorológicas por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA, sendo estas consideradas, como métodos de escolha para inquéritos populacionais (GONTIJO; MELO, 2004). Alguns estudos são de base molecular, permitindo a detecção de DNA parasitário em amostras de sangue periférico (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BIGLINO *et al.*, 2010).

No Brasil a maioria dos estudos de prevalência foi realizada na região nordeste, lançando mão de diferentes técnicas (D'OLIVEIRA *et al.*, 1997). Em duas localidades no Maranhão (MA) foram encontradas prevalências de 18,6% e 13,5% para os testes de ELISA e DTH, respectivamente, sem associação com as características da população estudada (CALDAS *et al.*, 2001).

Após a inoculação do parasito, a infecção por *L. infantum* pode levar a uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T CD4+ e um perfil de citocinas Th1. A resposta imune celular é caracterizada por altos níveis na produção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXCL9 e baixos níveis de citocinas reguladoras como IL-10 e IL-5 (CARVALHO *et al.*, 2012). Paralelamente a essa resposta, a sobrevivência da *Leishmania* depende da evasão do sistema imune, sendo que este parasito é altamente adaptado para execução desse mecanismo de sobrevivência (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

O controle da infecção por *Leishmania* sp. no meio intracelular é dependente da resposta imune mediada por células, pois o macrófago é a principal célula efetora da eliminação das formas amastigotas após sua ativação pelos linfócitos T *helper*. Para que a replicação parasitária não ocorra, é necessária predominância da resposta imune celular do tipo Th1, envolvendo linfócitos CD4 e CD8 e citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, síntese de derivados de N<sub>2</sub>, a exemplo do óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (KAYE; SCOTT, 2011). Dessa forma, uma atuação equilibrada do sistema imunológico é muito importante para que o parasito não cause danos, fazendo com que embora permaneça presente não cause doença.

Levando em consideração a semelhança da resposta imune nas infecções por *Leishmania* sp., em residentes de área endêmica para *L. braziliensis*, cerca de 10-20% dos indivíduos sem história de leishmaniose tegumentar e sem cicatrizes compatíveis, apresentam DTH positivo caracterizando uma forma subclínica da doença. A resposta imune nesses indivíduos é caracterizada pelo controle da replicação parasitária e ausência de dano tecidual, o que pode ser explicado por estes indivíduos apresentarem uma resposta moderada e modulada, com presença de menores níveis de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  e maior produção de IL-10 quando comparados com pacientes com leishmaniose cutânea (FOLLADOR *et al.*, 2002). Giudice *et al.*, (2012) citam também, a possibilidade desses indivíduos controlarem a infecção por meio da resposta inata, uma vez que macrófagos de indivíduos com a forma subclínica eliminam *L. braziliensis* de maneira mais eficiente do que macrófagos de pacientes com a forma cutânea da parasitose.

A manutenção da imunidade específica a *Leishmania* nos indivíduos assintomáticos reforça a ideia de que o estímulo frequente do parasito pode conferir proteção contra a reativação ou reinfeção pela *Leishmania* (BITTAR *et al.*, 2007).

#### **4 SALIVA DO FLEBOTOMÍNEO**

Uma variedade de substâncias encontradas na saliva de artrópodes hematófagos inclui, entre outras, moléculas com atividades anticoagulante, anti-inflamatória, anti-histamínica e vasodilatadora, que facilitam a aquisição do sangue por diminuírem a percepção do hospedeiro vertebrado e interferem no processo da hemostasia (RIBEIRO, 1987; TITUS; RIBEIRO, 1988; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003).

Em flebotomíneos, substâncias salivares têm sido identificadas e caracterizadas por meio de vários estudos. Ribeiro *et al.*, (1987) forneceram informações preliminares sobre a influência da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na aquisição de sangue para sua alimentação.

A importância da saliva dos flebotomíneos na infecção por *Leishmania* tem sido mostrada em diversos estudos. Os flebotomíneos injetam, junto com sua saliva, os parasitos no hospedeiro vertebrado. A saliva contém um repertório variado de moléculas que modulam as respostas hemostática, inflamatória e imune de seus hospedeiros. Um novo e potente peptídeo denominado de maxadilan, isolado apenas da saliva de *Lu. longipalpis* é o principal vasodilatador presente e apresenta influência na infecção por *Leishmania* (LERNER; RIBEIRO; NELSON, 1991; MORRIS *et al.*, 2001; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003).

Além do maxadilan outras substâncias, entre elas, a apirase salivar, a 5' nucleotidase (enzima que hidrolisa AMP formando adenosina, composto com atividades imunossupressora, vasodilatadora e antiplaquetária), e a adenosina deaminase (enzima que converte a molécula de adenosina para inosina, composto com múltiplos efeitos antiinflamatórios) estão presentes na saliva de *Lu. longipalpis* (CHARLAB; ROWTON; RIBEIRO, 2000).

Titus e Ribeiro (1988) demonstraram que extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis*, quando inoculado juntamente com formas promastigotas de *L. major* nas patas de camundongos, provocava exacerbação da infecção, com lesão cinco a dez vezes maior e carga parasitária cinco mil vezes maior que nos animais inoculados apenas com o parasito. Este fenômeno é possível devido a diferentes mecanismos imunomoduladores mediados pela saliva do vetor.

Em modelos murinos para estudos de leishmaniose causada por *L. major*, a resistência ao parasito está associada à expressão de citocinas como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-12 (IL-12), caracterizando resposta imune do tipo Th1. Esta resposta promove a estimulação de macrófagos para produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio, lesivos ao parasito. Já a suscetibilidade está ligada à expressão predominante de IL-4 e IL-10, características de resposta do tipo Th2 (KANE; MOSSER, 2001; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Utilizando este modelo experimental, tem-se mostrado que saliva de *Lu. longipalpis* direciona a resposta imune para o tipo Th2, favorecendo o sucesso da infecção pelo parasito (ANDRADE *et al.*, 2007). Esta modulação é causada principalmente pela estimulação

de expressão de IL-4 e diminuição na expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 pela saliva do vetor (LIMA; TITUS, 1996; MBOW *et al.*, 1998).

Alguns componentes específicos da saliva de *Lu. longipalpis* possuem propriedades imunomodulatórias. Morris *et al.*, (2001) mostraram que o vasodilatador maxadilan é capaz de exacerbar a infecção por *L. major* em camundongos com a mesma intensidade que a saliva total. Esta exacerbação ocorre devido a ação do vasodilatador sobre os macrófagos, estimulando a produção de citocinas do tipo Th2, ao mesmo tempo que provoca uma diminuição na produção de citocinas do tipo Th1 (BRODIE *et al.*, 2007). Adicionalmente, a imunização de camundongos com maxadilan sintético propiciou a proteção dos animais contra a infecção por *L. major* (MORRIS *et al.*, 2001).

Outra propriedade salivar relacionada ao sistema imune é a inibição do sistema complemento. Cavalcante; Pereira; Gontijo, (2003) mostraram que saliva de *Lu. longipalpis* é capaz de inibir a ação lítica do sistema complemento humano tanto pela via clássica como pela via alternativa.

A inibição do sistema complemento pela saliva de *Lu. longipalpis* provavelmente favorece o sucesso da infecção por *Leishmania* sp., pois apesar de formas promastigotas deste protozoário possuírem meios de evasão do complemento, como a metalo-protease gp63, que cliva C3b em iC3b (C3b inativado), e a presença de lipofosfoglicano (LPG) em toda sua superfície lhe conferindo proteção parcial contra o complexo de ataque à membrana (CAM) (NUNES; RAMALHO-PINTO, 1996; KANE; MOSSER, 2001;), trabalhos com *L. donovani*, *L. tropica*, *L. enrietti* e *L. amazonensis*, mostraram que a ativação do complemento pode resultar na morte dos parasitos quando o soro humano e de diferentes espécies, incluindo cães, galinhas e cobaias, está mais concentrado (REZAI; ARDEHALI; GETTNER, 1975; NORONHA *et al.*, 1998).

Em camundongos, produtos salivares de *Lu. longipalpis* ou *Phlebotomus papatasi* exacerbam a infecção por *Leishmania major* (BELKAID *et al.*, 1998; MBOW *et al.*, 1998; MORRIS *et al.*, 2001). O poder exacerbatório da saliva de *Lu. longipalpis* na infecção por *L. major* pode ser decorrente das atividades do maxadilan sobre os macrófagos. Fatores associados com a eliminação do parasito, produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e TNF- $\alpha$  liberados por macrófagos ativados, são inibidos pelo maxadilan (VALENZUELA *et al.*, 2001)

Além da exacerbação da infecção, a saliva dos flebotomíneos parece influenciar a produção de citocinas. Em macrófagos de camundongos estimulados por

lipopolissacarídeos (LPS), o maxadilhan modulou a produção de citocinas estimulando padrão de resposta do tipo Th-2, como a IL-6 e inibindo a produção de TNF- $\alpha$ , molécula fundamental para a destruição da *Leishmania* (SOARES *et al.*, 1998). Mbow *et al.* (1998) mostraram que em camundongos resistentes à infecção, o sonicado de glândula salivar (SGS) de *Phlebotomus papatasi* quando inoculado juntamente com *L. major* resultou no aumento da expressão de RNAm de IL-4 e inibiu a produção de RNAm de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , IL-12 e óxido nítrico-sintetase indutível (iNOS), bloqueando o desenvolvimento da resposta protetora Th1.

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

A saliva dos flebotomíneos foi capaz de aumentar a infectividade em estudos realizados com outras espécies de *Leishmania* (SAMUELSON *et al.*, 1991; WARBURG *et al.*, 1994; LIMA; TITUS, 1996). *Leishmania braziliensis* que normalmente não estabelece infecção em camundongos, causa lesões cutâneas progressivas em camundongos BALB/c quando inoculada em associação com lisado de glândula salivar do flebotomíneo (SAMUELSON *et al.*, 1991).

Embora os componentes salivares do flebotomíneo exacerbem a infecção por *Leishmania*, tem sido documentado que a pré-exposição a estes componentes ou às picadas desses insetos, conferem proteção contra a infecção. Em um modelo natural de leishmaniose cutânea, desenvolvido por Belkaid *et al.* (1998), a coinoculação do sonicado de glândula salivar do *Phlebotomus papatasi* com promastigotas metacíclicas de *L. major* na derme da orelha de camundongos, resultou na exacerbação da infecção, tanto nos suscetíveis quanto nos resistentes. Esse efeito foi completamente eliminado em camundongos pré-expostos aos componentes da saliva. Os autores verificaram também que os anticorpos antissaliva produzidos pelos animais sensibilizados neutralizaram o efeito exacerbatório da infecção.

Em camundongos BALB/c a exposição frequente às picadas de *Lu. longipalpis* resultou na produção de anticorpos IgG antissaliva. Nos animais pré-expostos, a injeção de sonicado de glândula salivar induziu um infiltrado inflamatório e recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos mais intensos do que no grupo não exposto, mostrando que a saliva promove uma resposta inflamatória inicial, que poderia criar um

ambiente impróprio para o estabelecimento do parasito nos hospedeiros mamíferos (SILVA; ROMERO; NASCENTES, 2011).

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

Belkaid *et al.* (1998) investigando o efeito de picadas por *Phlebotomus papatasi* em humanos e camundongos previamente sensibilizados pelas picadas deste flebotomíneo, observaram que ambos desenvolveram uma reação de hipersensibilidade tipo tardia e apresentaram um aumento local do fluxo sanguíneo após a picada. A caracterização da resposta celular em camundongos sensibilizados mostrou acúmulo de monócitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos CD4 nos infiltrados, sendo a DTH dependente de células CD4+. Estes resultados sugerem que o sonicado de glândula salivar usado para a sensibilização é uma fonte de antígeno.

Valenzuela *et al.* (2001) caracterizaram nove proteínas salivares de *P. papatasi*, sendo que um componente de 15 kDa foi capaz de conferir proteção a camundongos desafiados com parasitos mais homogeneizado de glândula salivar. Uma vacina de DNA contendo o cDNA para a proteína de 15 kDa conferiu proteção contra a infecção por *Leishmania*. Os experimentos mostraram que camundongos geneticamente deficientes de célula B, quando desafiados com uma vacina de DNA contendo o gene para a proteína de 15 kDa (Pps15) do homogeneizado de glândula salivar de *P. papatasi* ficaram protegidos contra um novo desafio por *L. major* mais homogeneizado de glândula salivar.

Morris *et al.* (2001) verificaram que, em camundongos, a exacerbação da infecção por *L. major* ocorreu tanto com o lisado de glândula salivar, quanto com o maxadilán e que, a vacinação prévia dos animais com este componente salivar, resultou na produção de anticorpos antimaxadilán que se relacionou à proteção do animal contra infecção por *Leishmania*. Dosagens de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico realizadas nas células (na sua maioria CD4) de linfonodos regionais destes animais, resultaram em quantidades significativas desses produtos. Portanto, nos camundongos vacinados, resposta celular e humoral foram estimuladas.

A proteção conferida pelos componentes salivares do flebotomíneo poderia ser decorrente da neutralização, pelos anticorpos formados, dos componentes da saliva responsáveis pelo estabelecimento do patógeno (BELKAID *et al.*, 1998; MORRIS *et*

*al.*, 2001; VALENZUELA *et al.*, 2001). Alternativamente, a imunidade poderia derivar de uma reação de hipersensibilidade tipo tardia, deixando o local inadequado para o estabelecimento da *Leishmania* (BELKAID *et al.*, 1998; KAMHAWI *et al.*, 2000). A capacidade de anticorpos antissaliva em neutralizar a bioatividade de componentes salivares também tem sido observada em camundongos desafiados com picadas repetidas do inseto *Anopheles stephensis* (MATHEWS; SIDJANSKI; VANDERBERG, 1996) e em hamsters (*Mesocricetus auratus*) expostos a picadas de *Phlebotomos argentipes* (GHOSH; MUKHOPADHYAY, 1998).

Os estudos que buscam elucidar o papel da saliva dos flebotomíneos ou de seus componentes na infecção por *Leishmania* são, na maioria das vezes, restritos a modelos murinos ou, se em humanos, voltados para o estudo da atividade imunomodulatória em células de doadores humanos saudáveis ou “naive” à infecção por *Leishmania* (SAMUELSON *et al.*, 1991; WARBURG *et al.*, 1994; LIMA; TITUS, 1996; BELKAID *et al.*, 1998; MBOW *et al.*, 1998; MORRIS *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2002).

Costa *et al.* (2002) estudaram a resposta imune humana utilizando células de doadores saudáveis tratadas com sonicado de glândula salivar de *Lu. longipalpis* e estimuladas ou não com lipopolissacarídeos, e verificaram que o sonicado promoveu a síntese de IL-6, IL-8 e IL-12, inibiu a secreção de IL-10 e TNF- $\alpha$  em monócitos, e afetou a expressão de moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) na superfície de monócitos e macrófagos, sugerindo que a saliva afeta a resposta imune.

Barral *et al.* (2000) e Gomes; Mendonca; Silva, (2007) mostraram que crianças residentes em uma área endêmica para LV, não só reconhecem proteínas salivares de *Lu. longipalpis*, como produzem anticorpos antissaliva do flebotomíneo, não havendo produção de anticorpos IgG contra a saliva de *P. papatasi* e *Lu. whitmani*, sugerindo especificidade da resposta antissaliva de *Lu. longipalpis*. Foi observada ainda, uma correlação positiva entre anticorpos antissaliva e DTH positiva e que, os soros humanos reconheceram, principalmente, algumas proteínas.

Assim, diante dos resultados que vêm sendo obtidos em diferentes estudos, Morris *et al.* (2001) e Valenzuela *et al.* (2001) sugerem que componentes da glândula salivar de flebotomíneos podem ser potenciais candidatos à vacina contra a leishmaniose humana.

## 5 TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA – DTH

O DTH é um teste de hipersensibilidade tardia específico para *Leishmania*, introduzido em 1926 por Montenegro como uma ferramenta de diagnóstico para a leishmaniose cutânea ou muco-cutânea e foi usado, pela primeira vez, em áreas endêmicas de LV no Quênia, em 1959 (BERN *et al.*, 2006). Classicamente é utilizado em estudos epidemiológicos para a detecção de exposição a *Leishmania*, caracterizada como infecção subclínica ou assintomática (REED, 1996; CALDAS *et al.*, 2002; SUNDAR; RAI, 2002; JERONIMO *et al.*, 2004; GOUVEA *et al.*, 2007; CRESCENTE *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009).

O uso do DTH baseia-se na sua positividade nos pacientes em contato com parasitos do gênero *Leishmania*. Este teste pode ser positivo em pacientes com qualquer forma clínica de leishmaniose e, no caso da LV, é positivo nos indivíduos assintomáticos, nas formas oligossintomáticas e nos curados. Entretanto, sua negatividade não necessariamente seria o contrário, pois poderia significar ausência de resposta celular frente aos antígenos parasitários. O teste tem mostrado um bom desempenho quando usado para avaliar infecções assintomáticas, apresentando correlação variável com estudos sorológicos (RIERA *et al.*, 2004). Alguns autores sugerem que a detecção de formas assintomáticas de LV em estudos de acompanhamento, e por consequência, em estudos de incidência, seriam melhor realizados utilizando o DTH do que testes sorológicos (IBRAHIM *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2002), pois a resposta imune mediada por células é fundamental na proteção contra *Leishmania* spp.

Na leishmaniose visceral uma forte reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) a antígenos de *Leishmania* é comumente associada à forma assintomática da doença. No entanto, em indivíduos apresentando manifestações clínicas, ou seja, a doença em atividade, observa-se a supressão da resposta imune celular, com os pacientes mostrando ausência de resposta a antígenos de *Leishmania* e ausência de proliferação linfocitária com DTH negativo.

Testes de hipersensibilidade do tipo tardia são amplamente utilizados como métodos de triagem para a identificação de pessoas com resposta imune positiva contra *Mycobacterium tuberculosis*, em que recente meta-análise indicou uma sensibilidade global de 77% para a tuberculose ativa (PAI; ZWERLING; MENZIENS, 2008; LANGE; MORI, 2010).

Indivíduos com forma subclínica de LV, conforme análise em populações de área endêmica, mostram uma forte resposta proliferativa celular e DTH positivo, além de produzirem maiores níveis de IFN- $\gamma$  do que aqueles que evoluíram para doença (BACELLAR *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2012).

Nos casos agudos de LV, o teste mostra-se negativo devido à ausência da resposta de hipersensibilidade tardia, tornando-se posteriormente positivo nos casos curados, em torno de um ano após o tratamento específico, o que caracteriza o teste como um indicador de prognóstico pós tratamento (REED, 1996; HAILU *et al.*, 2001; SUNDAR; RAI 2002; DE ALMEIDA *et al.*, 2006), além de ser um marcador para o desenvolvimento de resistência adquirida à doença (JERONIMO *et al.*, 2000). Assim, a reação positiva ao DTH constitui um marcador fenotípico, com provável controle genético, pois é encontrada em agrupamentos familiares (CABELLO *et al.*, 1995) e relacionada com os genes LECT2 e TGFBI, associados à capacidade de elaborar uma resposta imune adquirida para a infecção por *L. infantum chagasi* (JERONIMO *et al.*, 2007).

Todavia, há ainda a necessidade da produção de reagentes seguros, eficazes e padronizados em âmbito mundial, já que o antígeno é obtido de diferentes formas em várias concentrações e diluente (PINEDA *et al.*, 2001). Na Índia, por exemplo, o teste cutâneo para avaliação de hipersensibilidade tardia revelou baixa sensibilidade em pacientes curados de LV, quando utilizado antígenos de espécies de *Leishmania* diferentes da *L. donovani*, causadora da LV naquele país, mostrando a necessidade de padronização local, pois caso contrário, há dificuldade de avaliação de exposição prévia com esse teste (GIDWANI *et al.*, 2009).

No Brasil, estudos realizados para avaliar a resposta do teste cutâneo a antígenos de *Leishmania* na leishmaniose visceral (BADARÓ *et al.*, 1990; REED, 1996), detectaram que, após a recuperação clínica, os pacientes tiveram reação de hipersensibilidade tardia positiva a promastigotas de *L. infantum chagasi* em até 95%-100% dos casos, não produzindo resposta positiva em controles saudáveis, pacientes com tuberculose ou portadores de esquistossomose. Baixa resposta positiva (<5%) foi observado em indivíduos com doença de Chagas. Posteriormente, o teste cutâneo DTH foi realizado em populações selecionadas. Na cidade de Jacobina-BA, 89% dos pacientes com LV confirmada desenvolveram DTH positivo quando testados em 1 a 6 anos após tratamento (BADARÓ *et al.*, 1986a). Em Natal, numa área endêmica da parasitose, foi observado reação de DTH positiva em pacientes com oito meses a três

anos após tratamento (JERONIMO *et al.*, 2004). No Ceará, uma *coorte* encontrou que 76% dos indivíduos que se tornaram anticorpos positivos foram também reagentes ao teste de DTH, e 86% das pessoas que foram confirmadas como portadoras de LV tornaram-se DHT positivas após tratamento (EVANS *et al.*, 1995).

Desta maneira, em nosso país, um teste DTH positivo, na ausência de história de LV, é considerado evidência de infecção progressiva por *L. infantum chagasi*, portador de LV assintomática ou autorresolução da infecção.

Estudos realizados em áreas endêmicas para *Leishmania* mostram que a evolução da infecção por este microorganismo é espectral, com características de suscetibilidade e resistência a desenvolver formas graves da doença. Essas categorias fenotípicas são críticas para análise imunogenética da infecção. Estudos longitudinais sugerem que pode haver um subconjunto de pessoas com infecção assintomática que, aparentemente, não desenvolvem teste cutâneo positivo ou não mantem uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia duradoura, tornando-se negativos ao longo do tempo (JERONIMO *et al.*, 2000; BERN *et al.*, 2006). A existência desses grupos precisa ser definida, pois desta forma, uma quantidade maior de indivíduos previamente infectados está sendo classificada inadequadamente como não exposta e pode subestimar um contingente maior de indivíduos que foram expostos a *Leishmania*.

Os dados disponíveis até então, não determinam se as pessoas infectadas e que apresentam um DTH negativo, inicialmente desenvolveram uma resposta positiva e posteriormente negativaram a resposta com a eliminação do parasito, ou se eles, não conseguiram desenvolver resposta a antígenos de *Leishmania*. Da mesma forma, não é possível saber se uma resposta positiva ao DTH é duradoura, podendo-se considerar como um marcador de controle da infecção por *L. infantum chagasi*. Nesse caso, quais são os fatores relacionados com a perda ou manutenção dessa resposta ao longo do tempo e quais as citocinas e quimiocinas envolvidas nessas condições?

Presume-se que a infecção assintomática por *L. infantum chagasi* resulte em um estado de resistência ao desenvolvimento de doença, e a persistência de um DTH positivo pode ser devido à exposição contínua ao parasito. Também se supõem que este estado de resistência, marcado por uma resposta positiva ao DTH, é mantida ao longo da vida em indivíduos que não se tornam imunocomprometidos (BADARÓ *et al.*, 1986b; JERONIMO *et al.*, 2000).

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a infecção assintomática por *Leishmania* sp. em crianças de área de transmissão esporádica de leishmaniose visceral, detectando-se a exposição ao parasito *Leishmania* sp. e à saliva de *Lutzomyia longipalpis*.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever dados sociodemográficos, econômicos e epidemiológicos de crianças de área de transmissão esporádica para leishmaniose visceral.

Investigar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em crianças de área de transmissão esporádica para leishmaniose visceral.

Determinar a prevalência de crianças reativas ao teste de hipersensibilidade tardia (DTH) anti-*Leishmania* em área de transmissão esporádica para leishmaniose visceral.

Investigar a presença de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* em crianças de área de transmissão esporádica para leishmaniose visceral.

## **7 MATERIAL E MÉTODOS**

### **7.1 Área de estudo**

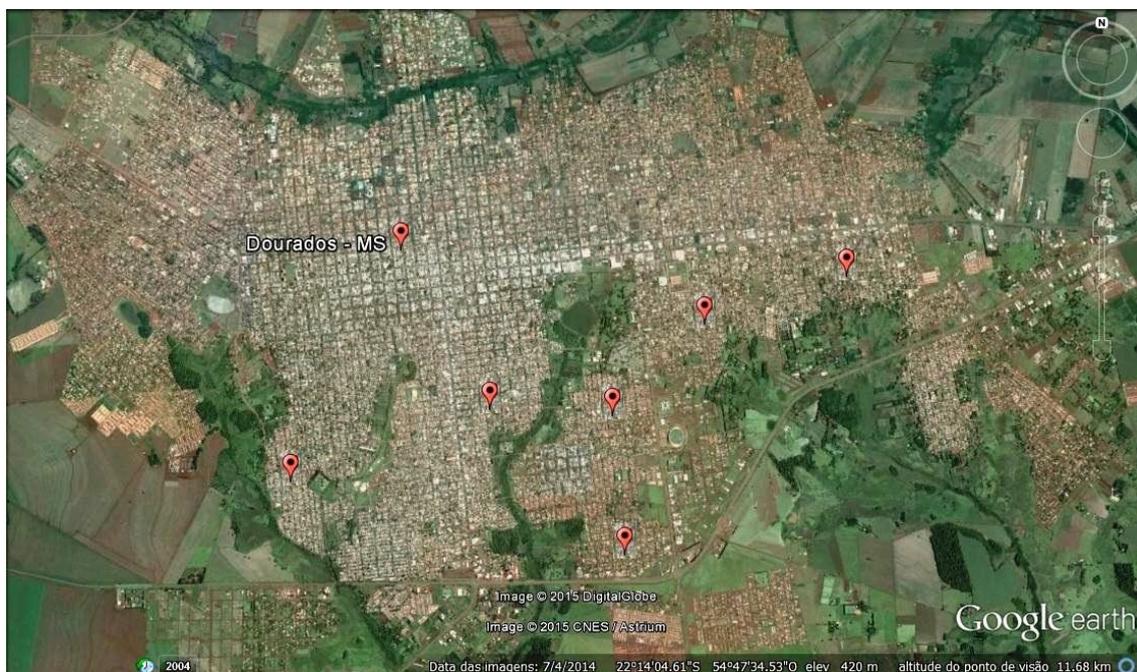
Este estudo foi conduzido na área urbana de Dourados, MS, que apresenta área territorial de 4.086 km<sup>2</sup>, e oito distritos (Itahum, Guassú, Formosa, Picadinha, Indápolis, Panambi, Vila Vargas e Vila São Pedro). O município localiza-se em uma planície na região sul do Estado do Mato Grosso do Sul e dista 220 km da capital, Campo Grande, Centro-Oeste do Brasil. O relevo é plano com suaves ondulações, estando em uma altitude média de 430,49 m. O clima é tipicamente equatorial, no verão é tropical e úmido, e no inverno tropical seco. O município possui 207.498 habitantes, com 181.005 pessoas residindo na área urbana e discreto predomínio do sexo feminino (99.761). A densidade demográfica é de 47,97hab/km<sup>2</sup>. Aproximadamente 90% dos habitantes residem em casas de alvenaria (IBGE, 2010). A fonte de renda principal é a pecuária e, há alguns anos, a cidade tem recebido imigrantes devido à implantação de indústrias na região, com crescimento demográfico na localidade.

A distribuição por faixa etária no município é de 8,9% de habitantes entre 0 a 4 anos de idade, 9,5% de 5 a 9 anos, 20,4% de 10 a 19 anos, 17,3% de 20 a 29 anos, 15,2% de 30 a 39 anos, 12% de 40 a 49 anos, 7,7% de 50 a 59 anos e 8,9% com 60 anos ou mais.

### **7.2 Local e população do estudo**

O estudo foi realizado com 492 crianças, com idade variando entre quatro a 13 anos, sem histórico de LV e clinicamente sadias, matriculadas em escolas municipais e estaduais de Dourados/MS (Figura 2): Escola Estadual Alicio de Araújo, Centro de Educação Irmãos Marista, Escola Municipal Neil Fioravante, Escola Municipal Maria da Rosa Antunes da Silveira Câmara, Escola Municipal Loide Bonfim Andrade, Escola Municipal Prefeito Álvaro Brandão e Escola Municipal Isabel Muzzi Fioravanti, no período de fevereiro de 2011 a fevereiro de 2014. Após os esclarecimentos sobre a natureza do estudo e seus objetivos (Figura 3 A), em linguagem clara e acessível, os pais ou responsáveis que concordaram com o ingresso da criança no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Figura 2 - Mapa de Dourados mostrando a localização das escolas participantes do estudo



Fonte: Google Earth Maps Dourados

Foi elaborado um formulário específico para o estudo, visando à obtenção de dados demográficos, socioeconômicos e epidemiológicos, tais como, sexo, idade, renda familiar, presença de cão no domicílio, tipo de moradia, dentre outros.

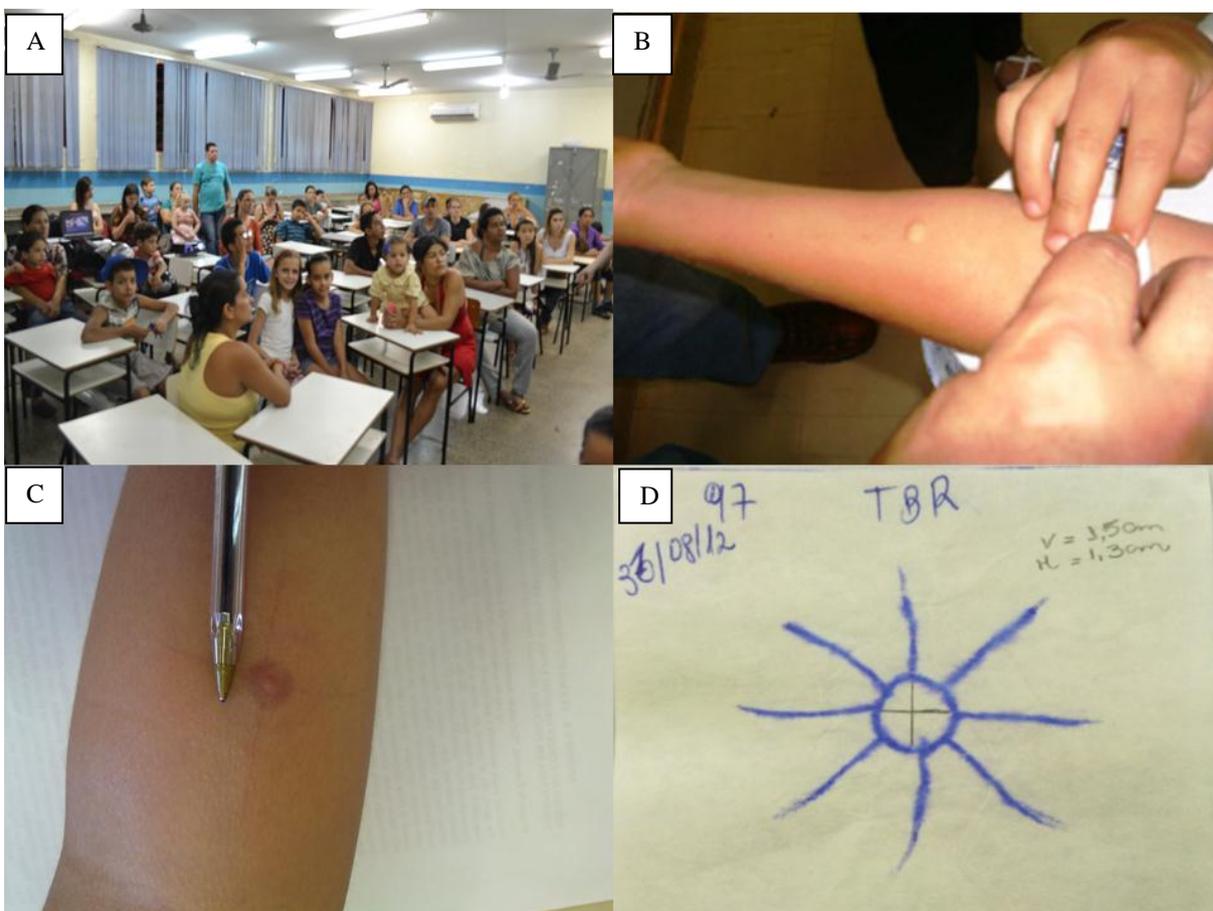
A equipe formada por médico, médicos veterinários, farmacêuticos, enfermeiros e agentes de saúde, foi treinada e orientada para a obtenção dos dados, coleta de sangue, aplicação e leitura do teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) (Figura 3 B,C,D).

No início do estudo as crianças foram submetidas a uma coleta de material biológico para a realização dos exames sorológicos e uma aplicação e leitura do teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), além do exame clínico para avaliar a presença ou não de sintomatologia sugestiva de leishmaniose visceral. No decorrer do estudo as crianças foram acompanhadas clinicamente para avaliar a possível ocorrência de sinais e ou sintomas de LV.

### 7.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo crianças maiores de quatro anos de idade, sem histórico de leishmaniose visceral, ausência de sinais clínicos sugestivos de leishmaniose e que os pais e/ou responsáveis concordaram em assinar o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) para coleta do sangue e aplicação do DTH (Teste de hipersensibilidade do tipo tardia).

Figura 3 – A: Palestra de apresentação do trabalho; B, C, D – Aplicação e leitura do DTH, Dourados-MS, 2011- 2014.



#### **7.4 Critérios de não inclusão**

No estudo não foram incluídas crianças cujos pais e/ou responsáveis não concordaram em participar e aquelas que pediram para serem retiradas do estudo em qualquer momento da realização do mesmo.

#### **7.5 Definição de leishmaniose infecção ou forma assintomática da LV**

Para o estudo, considerou-se infecção ou forma assintomática da LV, a positividade à pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* e/ou IDRMs positiva, na ausência de manifestações clínicas da doença (CALDAS *et al.*, 2001; GAMA *et al.*, 2004; BRASIL, 2014).

#### **7.6 Coleta de sangue**

Foram coletados 10 mL de sangue periférico. As amostras devidamente identificadas foram mantidas à temperatura ambiente em caixa isotérmica até serem processadas para a obtenção do soro no laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Unigran-Dourados. Os soros foram encaminhados ao Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz – BA (CPqGM-FIOCRUZ) para os exames sorológicos.

#### **7.7 Teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)**

O teste de DTH foi realizado em todos os participantes, de acordo com as instruções do fabricante, e a leitura realizada 72 horas após a inoculação intradérmica de 0,1mL do antígeno solúvel de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa de referência OMSMHOM/BR/73/PH8) na concentração  $1 \times 10^7$  leishmanias/mL, na face anterior do antebraço direito. O antígeno utilizado foi proveniente do Centro de Pesquisas e Produção de Imunobiológicos (CPPI) da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. A interpretação baseou-se na área de induração apresentada, sendo adotados os seguintes valores de referência: <5mm (= negativo), ≥5mm (= positivo).

## 7.8 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de IgG anti-*Leishmania*

A sorologia anti-*Leishmania* foi realizada por meio da reação imunoenzimática ELISA conforme descrito por Barral *et al.*, (2000), com algumas adaptações. Placas de 96 poços (Linbro/Titertek), foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (SLA), 10 µg/mL em tampão carbonato (NaHCO<sub>3</sub> 0,45M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,02M, pH 9,6) durante a noite a 4°C. Depois de três lavagens com PBS-Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente com PBS- Tween 0,05% mais 1% de soro bovino fetal (BSA). Os soros foram diluídos 1:100 com PBS-Tween 0,05% mais 0,25% de BSA e incubada por 1 hora a 37°C. Após uma última série de lavagens, os poços foram incubados com anti-IgG humano conjugado a fosfatase alcalina (Sigma, Sr. Louis, MO) na diluição 1:2500 em PBS-Tween 0,05% mais 0,25% de BSA por 1 hora a 37°C. Novamente as placas foram lavadas e colocadas para revelar por 30 minutos em uma solução cromogênica de p-nitrofenilfosfato em tampão carbonato de sódio pH 9,6 com 1mg/mL de MgCl<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com 50µL/poço de NaOH 3M, e as densidades ópticas (DO) lidas no comprimento de onda de 405 nm em um leitor de placas Spectral Max 190 Soft Max-Pro Software versão 5 (*Molecular Devices Corporation Sunnyvale, Califórnia 94089*). A concentração do antígeno bruto utilizada foi determinada em um experimento de dose-resposta para avaliar um sinal ótimo sem perder a especificidade (dados não mostrados). Em todos os experimentos, os valores foram subtraídos dos obtidos no *background*. O ponto de corte (*cut off*) do ELISA anti-IgG total de *Leishmania* foi estabelecido pelo cálculo da média mais três vezes o desvio-padrão (DP) da densidade ótica de amostras de soro de 26 indivíduos de uma área urbana não endêmica (CN). As amostras de soro com DO acima do *cut off* 0,064, foram consideradas positivas para *Leishmania*.

Valor do ponto de corte = DO (CN) + 3X DP (CN).

## 7.9 ELISA para detectar IgG antissaliva de *Lutzomyia longipalpis*

As glândulas salivares foram obtidas de fêmeas de flebotomíneos provenientes da colônia de *Lu. longipalpis* do Laboratório de Imunoparasitologia –CPqGM, gentilmente cedidas pela Dra Aldina Maria Prado Barral. As placas (Linbro/Titertek)

foram sensibilizadas com antígeno de glândula salivar (100 µl/poço) diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS Tween 0,05% (250 µl /poço) e bloqueadas por 2 horas em temperatura ambiente, dispensando 270 mL por poço de PBS Tween 0,05% + 1% soro bovino fetal (BSA). As placas foram novamente lavadas quatro vezes com PBS Tween 0,05% (250 µl /poço) e incubadas com soros diluídos 1:100 em PBS Tween 0,05% + 0,25% BSA (100 µl /poço) durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS Tween 0,05% (250 µl /poço) e adicionado o segundo anticorpo, anti-IgG humano na diluição de 1/5000 em PBS Tween 0,05% + 0,25% BSA (100 µl /poço) e incubado durante 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS Tween 0,05% (250 µl /poço) e logo após adicionado o substrato p-NN (p-nitrofenilfosfato: 1mg/mL) (Sigma N-9389) diluído em tampão carbonato-bicarbonato mais MgCl<sub>2</sub>, sendo dispensados 100 µl do substrato. Após 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com NaOH 3M (50 µl /poço). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Spectra May 190, SunnyVali, CA, EUA) no comprimento de onda de 405 nm. A reação sorológica foi considerada positiva quando o nível de absorvância (*cut-off*) era igual ou superior a 0,028, representando a média mais dois desvios-padrão das absorvâncias de 26 soros de indivíduos sadios não expostos ao *Lu. longipalpis*.

### 7.10 Teste imunocromatográfico rK39

Foi utilizado o teste rápido (Kalazar Detect™, Inbios International, Seattle, WA) e realizado estritamente conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, cerca de 20 µL das amostras de soro foram transferidos para a área específica da fita com três gotas de tampão de corrida. Após 10 minutos, a leitura dos resultados foi realizada visualmente por três pesquisadores diferentes. O teste foi considerado positivo quando foi possível visualizar as duas linhas, teste e controle; e negativo quando somente a linha controle foi visualizada na membrana de nitrocelulose. Em ambos os casos, a visualização da linha controle, localizada logo acima da linha-teste, indica que a execução do teste foi adequada.

### **7.11 Análise estatística**

As análises efetuadas constam nos artigos apresentados nos resultados.

### **7.12 Aspectos éticos**

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o protocolo N° 2173 (Anexo 1).

## **8 RESULTADOS**

### **8.1 ARTIGO 1**

**INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania* sp. EM CRIANÇAS NA  
REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL**

### **8.2 ARTIGO 2**

**INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania* sp. E ANTICORPOS  
ANTISSLIVA DE *Lutzomyia longipalpis* EM CRIANÇAS NA REGIÃO  
CENTRO OESTE DO BRASIL**

## **8.1 ARTIGO 1**

**INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania* sp. EM CRIANÇAS NA  
REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL**

## INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania* sp. EM CRIANÇAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL

<sup>1</sup>Thiago Leite Fraga, <sup>2</sup>Magda Freitas Fernandes, <sup>1</sup>Janaina Michelle de Oliveira, <sup>1</sup>Elenir Rose Jardim Cury Pontes, <sup>2</sup>Ana Paula Silva Levay, <sup>2</sup>Elenice Brandão Almeida da Cunha, <sup>1</sup>Adriana de Oliveira França, <sup>1</sup>Yvone Maia Brustoloni, <sup>2</sup>Fábio Juliano Negrão, Ludiele Castro <sup>1</sup>Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias – PPGDIP. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brazil.

Autor para Correspondência: Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval. Address: Laboratório de Parasitologia Clínica/CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Caixa Postal 549, Cidade Universitária, S/N, 79070-900 Campo Grande, Brazil. Tel.: +55 67 33457691

E-mail address: elizabeth.dorval@ufms.br

**RESUMO:** Este é o primeiro estudo na região Centro-Oeste que relata a presença de infecção assintomática por *Leishmania* sp. em crianças residentes em área de transmissão esporádica para leishmaniose visceral, com a doença canina desde 2003 e a ocorrência do primeiro caso humano autóctone somente em 2012. O papel dos portadores assintomáticos na cadeia de transmissão ainda não está bem esclarecido e a possibilidade do parasito poder ser transmitido por esses indivíduos deve ser melhor avaliada. O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de anticorpos e resposta imune celular anti-*Leishmania* em crianças de área de transmissão esporádica para leishmaniose visceral. Anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados pela técnica de ELISA em 20,1% dos 492 participantes, e 38,6% das crianças apresentaram DTH positivo. Positividade para anticorpos anti-*Leishmania* e para DTH, foi observada em 10,4%. A prevalência sorológica foi maior em crianças de 7 a 9 anos de idade. Todas as amostras foram avaliadas pelo teste rápido rK39 e nenhuma mostrou-se positiva. Os resultados revelam que as crianças foram expostas ao protozoário, e nenhuma delas, durante o acompanhamento clínico, apresentou sintomatologia sugestiva de leishmaniose visceral. Palavras-chave: Leishmaniose, anticorpos, teste rápido, infecção assintomática.

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa incluída entre as sete endemias mundiais com ampla distribuição, atingindo 62 países com, aproximadamente, 200 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção. Suas formas clínicas podem variar desde infecções assintomáticas ou inaparentes, oligossintomáticas a infecções clássicas (WHO, 2014).

Nos últimos anos o registro de casos novos da doença no Brasil aumentou, expandindo-se para áreas urbanas e peri urbanas, com maior incidência no Nordeste, observando-se, no entanto, curva ascendente nas regiões Sudeste, Norte e Centro-Oeste (BRASIL, 2014).

O número de portadores assintomáticos é muito mais elevado do que o número de pacientes com manifestações clínicas, com prevalência variando de 30 a 73,4% (MARQUES *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2010; MARY *et al.*, 2006; MARTÍN-SÁNCHEZ *et al.*, 2004). A maioria desses indivíduos apresenta infecção auto resolutiva e apenas cerca de 12-20% desenvolvem a doença. Características inerentes ao parasito, bem como estado geral de saúde e condição fisiológica do hospedeiro, parecem estar implicados na progressão da doença, como pode ser observado pela maior incidência de LV em crianças e idosos (JERONIMO *et al.*, 2000; SINGH; SIVAKUMAR, 2003; BAÑULS *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2011; JIMENEZ-MARCO *et al.*, 2012).

O papel dos portadores assintomáticos na cadeia de transmissão do agente etiológico da LV, ainda não está bem esclarecido e a possibilidade do parasito ser veiculado por esses indivíduos deve ser melhor avaliada (COSTA *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

Constituiu objetivo deste trabalho a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e da resposta imune celular anti-*Leishmania* em crianças de área urbana com transmissão esporádica de leishmaniose visceral.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 492 crianças sem histórico de LV e clinicamente saudáveis, de escolas municipais e estaduais de Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), no período de fevereiro de 2011 a fevereiro de 2014.

Previamente à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram realizadas palestras para os pais e ou responsáveis pelas crianças a fim de informar e esclarecer sobre a doença e o estudo. Após a assinatura, estes eram entrevistados para o preenchimento de formulário sobre dados sociodemográficos, econômicos e epidemiológicos.

No início do estudo as crianças foram submetidas a uma coleta de material biológico para a realização dos exames sorológicos e uma aplicação e leitura do teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), além do exame clínico para avaliar a presença ou não de sintomatologia sugestiva de leishmaniose visceral. No decorrer do estudo as crianças foram acompanhadas clinicamente para avaliar a possível ocorrência de sinais e ou sintomas de LV.

Não foram incluídas crianças que não aceitaram participar da pesquisa ou aquelas cujos responsáveis recusaram-se a assinar o TCLE.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o protocolo N° 2173, de 27 de outubro de 2011.

### **DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania***

De cada participante, foram coletados 10 mL de sangue periférico para obtenção de soro e realização do teste sorológico.

Para obtenção do antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), cepa de *L. infantum chagasi* (MHOMBr83BA-3) foi mantida em meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Os parasitos obtidos foram inicialmente submetidos a 10 ciclos alternados de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho-maria, e posteriormente centrifugados (1600xg, 4°C, 15'). O sobrenadante contendo o SLA foi coletado, filtrado (0,22µm) em fluxo laminar e quantificado através do Micro BCA TM *Protein Assay Reagent Kit* (Pearce).

## **ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania***

As reações foram realizadas conforme descrito por Barral *et al.* (2000), com adaptações. Placas de 96 poços (Linbro/Titertek) foram sensibilizadas com SLA (10 µg/mL) em tampão carbonato (NaHCO<sub>3</sub> 0,45M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,02 M, pH 9,6) a 4°C *overnight*. Após três lavagens com PBS-*Tween* 0,05%, as placas foram bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente com PBS *Tween* 0,05% mais 1% de soro bovino fetal (BSA). Os soros foram diluídos 1:100 com PBS-*Tween* 0,05% mais 0,25% de BSA e incubados por 1 hora a 37°C. Após uma última série de lavagens, os poços foram incubados com anti-IgG humano conjugado a fosfatase alcalina (Sigma, St. Louis, MO) na diluição 1:2500 em PBS-*Tween* 0,05% mais 0,25% de BSA por 1 hora a 37°C. Novamente as placas foram lavadas e colocadas para revelar por 30 minutos com uma solução cromogênica de p-nitrofenilfosfato em tampão carbonato de sódio pH 9,6 com 1mg/mL de MgCl<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de NaOH 3M, e as densidades ópticas foram lidas no comprimento de onda de 405 nm em um leitor de placas Spectral Max 190 Soft Max-Pro Software versão 5 (Molecular Devices Corporation Sunnyvale, California 94089). Em todos os experimentos, os valores obtidos foram subtraídos dos obtidos no *background*. O *cut off* do ELISA anti-IgG total de *Leishmania* foi estabelecido pelo cálculo da média mais três vezes o desvio-padrão da densidade óptica (DO) das amostras de soro de 26 indivíduos sem histórico de LV. As amostras de soro com DO acima do *cut off* 0,064, respectivamente, foram consideradas positivas para *Leishmania*. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes com resultados semelhantes.

## **Teste Rápido Anti-*Leishmania* rK39**

O teste rápido (*Kalazar Detect*<sup>TM</sup>, Inbios International, Seattle, WA) foi realizado segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, 20 µL da amostra de soro foram adicionados na área específica da fita do teste rápido, seguido de três gotas de tampão de corrida. A leitura dos resultados foi feita após dez minutos do início do teste, considerando-se positivo ou negativo de acordo com a presença ou ausência da linha teste.

### **Teste de Hipersensibilidade Tardia (DTH)**

A DTH foi realizada em todos os participantes, com a leitura realizada 72 horas após a inoculação intradérmica de 0,1mL do antígeno solúvel de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa de referência OMSMHOM/BR/73/PH8) na concentração  $1 \times 10^7$  leishmanias/mL na face anterior do antebraço direito. A interpretação baseou-se na área de induração apresentada, sendo adotados os seguintes valores de referência:  $\leq 5$ mm (negativo),  $\geq 5$ mm (positivo), de acordo com o manual do fabricante. O antígeno utilizado foi proveniente do Centro de Pesquisas e Produção de Imunobiológicos (CPPI) da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.

### **Análise Estatística**

Para verificar possíveis associações entre a soroprevalência da infecção por *L. (L.) infantum chagasi* e variáveis sociodemográficas e ambientais foi realizado o teste qui-quadrado. Para estimar as razões de prevalência ajustadas, foi utilizada a Regressão de Cox (com tempo igual a uma unidade), utilizando as variáveis com significância < que 20%. Os programas utilizados foram EPI INFO versão 7 (Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta/Georgia/Estados Unidos), e Bio Estat 5.3 (Sociedade Mamirauá, Belém/Pará/Brasil).

## **RESULTADOS**

Do total de 492 crianças, 52% eram meninos e 48% meninas. A idade variou de quatro a 13 anos, com mediana de oito anos. Todas as crianças eram procedentes de Dourados, MS e 99,6% eram de área urbana.

Do total de crianças (n=492), 61% apresentaram renda menor que dois salários mínimos vigentes e em 91% (449/492) dos domicílios dos entrevistados o cão estava presente e dentre estes, 19% (86/449) relataram ter o animal diagnosticado com leishmaniose.

Anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados em 20,1% (16,6% a 23,7% IC 95%) dos 492 participantes e 38,6% (34,3% a 42,9% IC 95%) crianças apresentaram DTH positivo. Cinquenta e uma crianças, 10,4% (7,7% a 13,1% IC 95%) apresentaram positividade tanto para anticorpos anti-*Leishmania* quanto para DTH (Figura 1).

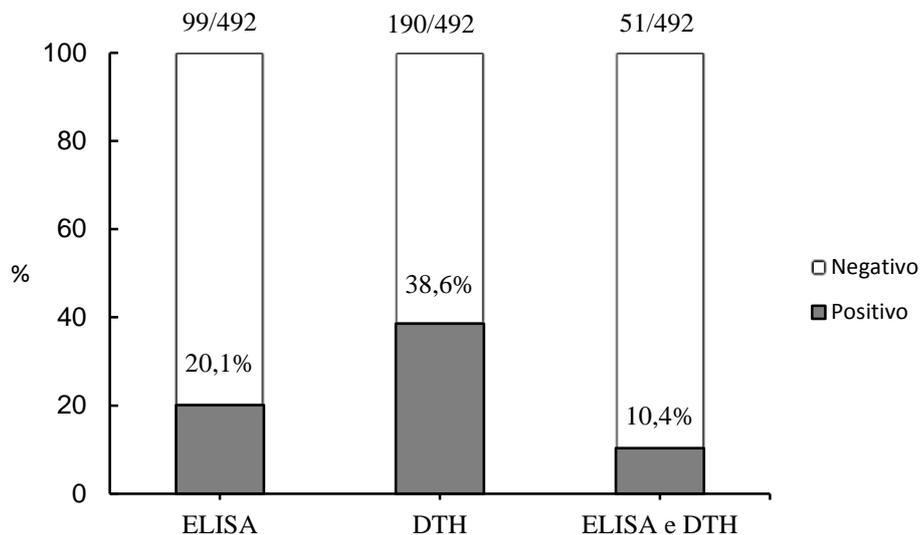


Figura 1 – Número e porcentagem de positivos nos testes ELISA anti-*Leishmania* e DTH em crianças assintomáticas na região Centro-Oeste do Brasil.

O ELISA anti-*Leishmania* apontou que a soroprevalência foi maior nas crianças de 7 a 9 anos de idade, no entanto pelo DTH, não houve diferença entre as faixas etárias (Tabela 1). Todas as amostras foram avaliadas pelo teste rápido e nenhuma mostrou-se positiva.

Tabela 1 – Resultado do DTH e ELISA anti-*Leishmania*, por idade, em crianças assintomáticas na região Centro-Oeste do Brasil

Faixa etária	Positivo		Negativo		<i>p</i> ( $\chi^2$ )
	Nº.	%	Nº.	%	
ELISA					
4 a 6 anos	8	17,8	37	82,2	<b>0,003</b>
7 a 9 anos	69	25,5	202	74,5	
10 a 13 anos	22	12,5	154	87,5	
DTH					
4 a 6 anos	21	46,7	24	53,3	0,506
7 a 9 anos	102	37,6	169	62,4	
10 a 13 anos	67	38,0	109	61,9	

Segundo os dados apresentados na tabela 2, houve maior prevalência de infecção por *Leishmania* sp. nos escolares residentes em domicílios do tipo alvenaria em relação às casas de madeira ou barracos, e também que não fizeram passeios ou viagens no último ano, assim como naqueles que enterravam o lixo domiciliar, destinavam os dejetos para valas ou matas, que não possuíam vegetação peri-domiciliar e que criavam animais silvestres no peri ou intra-domicílio.

Tabela 2 - Prevalência da infecção por *Leishmania* sp. de acordo com as variáveis sociodemográficas e ambientais em crianças assintomáticas na região Centro-Oeste do Brasil.

Variáveis	n	Positivos		p ( $\chi^2$ )
		Nº.	%	
Sexo				0,143
Feminino	236	54	22,9	
Masculino	256	45	17,6	
Renda Familiar				0,306
Até dois salários	301	65	21,6	
Mais que dois salários	191	34	17,8	
Tipo de moradia				<b>&lt;0,001</b>
Alvenaria	341	84	24,6	
Barraco	52	6	11,5	
Madeira	99	9	9,1	
Passeios ou viagens no último ano				<b>0,013</b>
Não	126	35	27,8	
Sim	366	64	17,5	
Destino do Lixo				<b>&lt;0,001</b>
Enterrado	26	12	46,2	
Queimado	34	10	29,4	
Coletado	432	77	17,8	
Destino de dejetos				<b>0,007</b>
Vala/Mata	178	42	23,6	
Fossa Asséptica	233	51	21,9	
Rede de Esgoto	81	6	7,4	
Vegetação peri-domicílio				<b>&lt;0,001</b>
Não	72	28	38,9	
Sim	420	71	16,9	
Criação de Cachorro				0,111
Cachorro com leishmaniose	86	23	26,7	
Cachorro sem leishmaniose	363	71	19,6	
Não	43	5	11,6	
Animais silvestres peri e intra-domicílio				<b>&lt;0,001</b>
Sim	305	77	25,2	
Não	187	22	11,8	

Pela análise multivariada, apenas a variável “residir em domicílio do tipo alvenaria” permaneceu associada com a prevalência de infecção por *Leishmania* sp. As razões de prevalência ajustadas e demais resultados da Regressão de Cox estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Análise multivariada para a prevalência da infecção por *Leishmania* sp. em crianças assintomáticas na região Centro-Oeste do Brasil.

Variáveis	<i>p</i>	Razão de prevalência ajustada (RP ajustada)	IC 95% (RP ajustada)
Tipo de moradia	<b>0,019</b>	<b>1,49</b>	<b>1,07 - 2,07</b>
Vegetação peri-domicílio	0,111	0,57	0,28 - 1,14
Passeios ou viagens no último ano	0,179	1,34	0,87 - 2,06
Destino de Lixo	0,336	0,77	0,45 - 1,32
Criação de Cachorro	0,600	1,10	0,78 - 1,54
Destino de Dejetos	0,636	1,07	0,81 - 1,43
Sexo	0,919	0,98	0,66 - 1,46
Animais silvestres peri e intra-domicílio	0,960	1,01	0,67 - 1,54

## DISCUSSÃO

Este constitui o primeiro relato da ocorrência de infecção assintomática por *Leishmania* sp. em crianças na região Centro-Oeste, embora essa forma de apresentação da leishmaniose no estado de Mato Grosso do Sul, já tenha sido constatada em população de áreas de alta endemicidade como Três Lagoas (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e Campo Grande (FRANÇA *et al.*, 2013).

Merece destaque o fato do município de Dourados/MS ser considerado área de transmissão esporádica para LV, com presença da doença canina desde 2003 e a ocorrência do primeiro caso humano autóctone somente em 2012.

Embora os estudos de prevalência de infecção assintomática por *Leishmania* sp. não demonstrem uma relação bem definida e uniforme entre a proporção dos casos de doença ativa e de indivíduos infectados, trata-se de um instrumento auxiliar para o real dimensionamento da doença e adoção das medidas de controle, uma vez que se faz

necessário conhecer o impacto e a importância desses portadores na cadeia epidemiológica da parasitose, a fim de melhor compreender os processos de transmissão, disseminação e sobrevivência do agente (FRANÇA *et al.*, 2013).

Os resultados sobre as condições socioeconômicas, ambientais e hábitos de vida da população estudada são importantes na epidemiologia da leishmaniose, e podem contribuir para que a doença seja de maior ocorrência nas áreas rurais e periurbanas, porém diferem do observado por outros autores que mostram uma associação dessas variáveis com a infecção por *Leishmania* em áreas de alta endemicidade (BERN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; BIGLINO *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2012; PONTE *et al.*, 2011), no entanto, dificulta comparações, tendo em vista que a área estudada é de autoctonia recente, com apenas quatro casos de LV doença e apresenta ainda incipiente conhecimento epidemiológico sobre a sua dinâmica de transmissão.

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* tem relevância no diagnóstico da LV assintomática (CALDAS *et al.*, 2010), pois evidencia a indução da resposta humoral e isso a torna útil em inquéritos epidemiológicos (BUELTZINGSLOEWEN *et al.*, 2004), pois na ausência de sinais e sintomas, um teste sorológico positivo define infecção (CALDAS *et al.*, 2001; BRASIL, 2014).

A soroprevalência em populações saudáveis em diferentes áreas pode variar de valores inferiores a 10% nas regiões de baixa ou moderada transmissão (KOIRALA *et al.*, 2004; SCHENKEL *et al.*, 2006) a valores superiores a 30% em regiões de alta transmissão e em contactantes (IBRAHIM *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

No presente estudo a prevalência sorológica foi de 20,1%, o que confirma a presença da infecção por *Leishmania* sp. e alerta para a possibilidade dessas crianças saudáveis atuarem como fontes de infecção. Embora considerada uma área de transmissão esporádica de *Leishmania*, o índice obtido está inserido entre os comumente encontrados em populações de áreas de alta endemicidade de LV (D'OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008), e foi semelhante aos 18,6% referido por Caldas *et al.* (2001) também em crianças, porém de área endêmica do Maranhão. Muitas vezes a justificativa para tais índices numéricos é atribuída às variações na dinâmica da transmissão que ocorre nas diferentes áreas, aos métodos de diagnóstico utilizados e à faixa etária da população em questão (WERNECK, 2008; FELIPE *et al.*, 2011).

Sabe-se que em áreas endêmicas de LV, uma proporção de indivíduos infectados desenvolve a doença (BADARÓ *et al.*, 1986a; NASCIMENTO *et al.*, 1996; CALDAS *et al.*, 2001; BUCHETON *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2006, BRASIL, 2014), porém é importante destacar que nas crianças do presente estudo, nas quais foi detectada a infecção por *Leishmania* sp., verificou-se o controle do parasitismo, uma vez que não desenvolveram a doença durante o período de acompanhamento (24 meses). Este fato reafirma que o teste sorológico isolado não deve ser utilizado para confirmação diagnóstica, apesar do fato de anticorpos específicos serem utilizados, com sucesso, no diagnóstico da leishmaniose visceral quando associado com a clínica, epidemiologia e o exame parasitológico (FUNASA, 1996; WHO, 2011).

A justificativa para o desenvolvimento ou não de doença (SINGH, KUMARI, SINGH, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2011; VIANA *et al.*, 2000) talvez esteja relacionada ao risco de exposição, às diferentes regiões geográficas e aos tipos de resposta imunológica. Porém, ainda não há uma elucidação total sobre como se dá a sobrevivência de *Leishmania* nos portadores, mas acredita-se que este processo esteja principalmente na dependência da resposta imunológica do hospedeiro e da patogenicidade e virulência do parasita (LE FICHOUX *et al.*, 1999; RIERA *et al.*, 2004).

Nenhuma das amostras desse estudo foi considerada positiva pelo teste rápido com antígeno rK39. Esse teste é recomendado para o diagnóstico de LV e apresenta sensibilidade e especificidade variando entre 84 e 97% respectivamente (ASSIS *et al.*, 2009; BRASIL, 2014; WHO, 2011). A sua baixa sensibilidade para detecção da infecção assintomática por *Leishmania* tem sido relatada em outros estudos (ROMERO *et al.*, 2009; WHO, 2011; CLEMENTE *et al.*, 2014; FUKUTANI *et al.*, 2014), já que os ensaios de rK39 são mais úteis para diagnosticar a doença em atividade.

No presente estudo um elevado percentual (38,6%) de crianças apresentou DTH positivo, sugerindo exposição ao protozoário *Leishmania* sp. e uma importante resposta proliferativa celular. Esse resultado assemelha-se ao relatado por outros autores, diferindo, porém pelo fato de serem estudos realizados em áreas de alta endemicidade e em indivíduos com doença subclínica ou em familiares e vizinhos de pacientes com LV doença (BACELLAR *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.* 2005; ABÁNADES *et al.*, 2012).

Presume-se que a infecção assintomática por *L. infantum* resulte em um estado de resistência ao desenvolvimento de doença, e a persistência de um DTH positivo pode

ser devido à exposição contínua ao parasito, além de poder se manter ao longo da vida em indivíduos que não se tornam imunocomprometidos (BADARÓ *et al.*, 1986b; JERONIMO *et al.*, 2000).

O índice de infecção por *Leishmania* sp. observado determina a presença da forma assintomática da LV nas crianças de quatro a 13 anos de idade, mostrando a exposição ao protozoário, e sugerindo efetiva resposta imune celular, pois nenhuma delas, durante o acompanhamento clínico, apresentou sintomatologia compatível com LV. Além disso, medidas efetivas de controle devem ser instituídas e direcionadas prioritariamente a esta faixa etária.

Uma alternativa para o monitoramento dessa área seria a utilização de anticorpos específicos contra componentes da glândula salivar de flebotomíneos, pois podem ser utilizados como marcadores epidemiológicos de exposição ao vetor, já demonstrado para diversas doenças (SCHWARTZ *et al.*, 1990; SANDERS *et al.*, 1999; REMOUE *et al.*, 2006; ORLANDI-PRADINES *et al.*, 2007; POINSIGNON *et al.*, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2010; SCHWARZ *et al.*, 2011), dentre elas as leishmanioses (SOUZA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010), uma vez que também é possível a proteção pela exposição à saliva de *Lutzomyia longipalpis* (ANDRADE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2010).

## **AGRADECIMENTOS**

Dra Aldina Barral e Dra Juqueline Cristal pela inestimável contribuição durante a execução dos testes sorológicos.

Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul - FUNDECT pelo apoio financeiro.

Dr Luis Henrique Ferraz Demarchi - Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Mato Grosso do Sul – LACEN, pela cedência do antígeno de Montenegro.

## REFERÊNCIAS

- Abánades, D.R., Arruda, L.V., Arruda, E.S., *et al.*, 2012. Immunodominant Antigens of *Leishmania chagasi* associated with protection against human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, v.6, n.6, p.1687.
- Andrade, B.B.; Oliveira, C.I.; Brodskyn, C.I. *et al.*, 2007 Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. *Scand J Immunol.*, v. 66, p. 122-127.
- Assis, T.S.M., Caligiorne, R.B., *et al.*, 2009. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.103, n.12, p.1269-1272.
- Bacellar, O., D'Oliveira, A.J.R.; Jerônimo, S. *et al.*, 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, v.12, n.8, p.1228 -1231.
- Badaró, R., Jones, T.C., Lourenço, R., *et al.*, 1986a. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis.*, v.154, p.639-649.
- Badaró, R.; Jones, T.C.; Carvalho, E.M.; *et al.*, 1986b. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis, *J Infect Dis.*, v.154, p.1003-1011.
- Bañuls, A.L., Bastien, P., Pomares, C., *et al.*, 2011. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin Microbiol Infec.*, v.17, n.10, p.1451-1461.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., *et al.*, 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg.*, v.62, n.6, p.740-745.
- Bern, C.; Haque, R.; Chowdhury, R. *et al.*, 2007. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *The Am J Trop Med and Hyg*, v. 76, n. 5, p. 909–914.
- Biglino, A.; Bolla, C.; Concialdi, E. *et al.*, 2010. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont Region) where such infections are traditionally nonendemic. *J of Clinical Microbiol*, v. 48, n. 1, p. 131-136.
- Brasil; 2014. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília, DF, 122p.

Bucheton, B., El-Safi, S.H.; Hammad, A., *et al.*, 2003. Antileishmanial antibodies in an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan: high antibody responses occur in resistant subjects and are not predictive of disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.97, n.4, p.463-368.

Bueltzingsloewen, A. S.; Marty, P.; Rosenthal, E. *et al.*, 2004. Visceral leishmaniasis: a new opportunistic infection in hematopoietic stem-celltransplanted patients. *Bone Marrow Transplan*, v. 33, n. 6, p. 667-668.

Caldas, A.J.M., Silva, D.R.C., Pereira, C.C.R., *et al.*, 2001. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís-MA, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.34, n.5, p.445-451.

Caldas, A. J. M.; Aquino, D. M. C.; Ferreira, N. V. *et al.*, 2010. Avaliação imunológica da intradermoreação de Montenegro. *Rev de Pesqui Saúd*, v. 11, n. 2, p. 9-13.

Clemente, W.T., Rabello, A., Faria, L.C., *et al.*, 2014. High prevalence of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area of Brazil. *Am J Transplant.*, v.14, n.1, p.96-101.

Costa, C.H.N., Stewart, J.M., Gomes, R.B.B., *et al.*, 2002. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.*, v.66, n.4, p.334-337.

Das, V.N., Siddiqui, N.A., Verma, R.B., *et al.*, 2011. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to kala-azar elimination programmes. *Trans R Soc Trop Med and Hyg.*, v.105, n.11, p.661-666.

D'Oliveira Junior, A.; Costa, S.R.M.; Barbosa, A.B., *et al.*, 1997. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 92: 15-20.

Felipe, I. M. A.; Aquino, D. M. C.; Kuppinger, O. *et al.*, 2011. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. *Mem do Instit Oswal Cruz*, v. 106, n. 2, p. 207-211.

França, A.O.; De Castro, V.L.; Lima, M.S.Jr, *et al.*, 2013. Anti-*Leishmania* antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. *Transfus Apher Sci.*; v. 49, n. 3, p. 627-630.

Fukutani, K.F., Figueiredo, V., Celes, F.S., *et al.*, 2014. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. *BMC Infect Dis.*, v.14, p.422.

Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar) - Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, 1996.

Ibrahim, M. E.; Lambson, B.; Yousif, A. O.; *et al.*, 1999. Kala-azar in a high transmission focus: an ethnic and geographic dimension. *The American Journal of Trop Med and Hyg*, v. 61, n. 6, p. 941-944.

Jeronimo, S.M., Teixeira, M.J., Sousa, A.Q., *et al.*, 2000. Natural History of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: Long- Term Follow-Up. *Clin Infec Dis.*, v.30, p.608-609.

Jimenez-Marco, T., Riera, C., Fisa, R., *et al.*, 2012. The utility of pathogen inactivation technology: a real-life example of *Leishmania infantum* inactivation in platelets from a donor with an asymptomatic infection. *Blood Transfus.*, v.10, p.536-541.

Le Fichoux, Y.; Quaranta, J.F.; Aueuvre, J.P., *et al.*, 1999. *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol.*; v.37, p.1953-1957.

Lima, I. D.; Queiroz, J. W.; Lacerda, H. G. *et al.*, 2012. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. *The Americ J of Tropi Medic and Hyg*, v. 86, n. 1, p. 99-107.

Marques, L.H.S., Gomes, L.I., Rocha, I.C.M., *et al.*, 2012. Low parasite load estimated by qPCR in a cohort of children living in urban area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *PloS Negl Trop Dis.*, v.6, n.12, p.e1955.

Martín-Sánchez, J., Pineda, J.A., Morrillas-marquez, F.F., *et al.*, 2004. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Trop Med Hyg.*, v.70, n.5, p.545-548.

Mary, C., Faraut, F., Drogoul, M.P., *et al.*, 2006. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg.*, v.75, n.5, p.858-863.

Moura, G. S.; Santos, A. M.; Aquino, D. M. C. *et al.*, 2012. Factors associated with asymptomatic infection in family members and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Cad de Saúd Pública*, v. 28, n. 12, p. 2306-2314.

Nascimento, M.D.S.B.; Neto, A.P.B.N.; Silva, N.L. *et al.*, 2000. Progressão da intradermorreação de Montenegro e a sororreatividade por ELISA com os antígenos rk39 e crude em indivíduos assintomáticos de área endêmica de leishmaniose visceral. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.33, p. 41.

Nascimento, M.D.S.B., Costa, J.M.L., Fiori, B.I.P., *et al.*, 1996. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose no Estado do Maranhão-Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.29, n.3, p.233-240.

Nascimento, M.D.S.B., Sousa, E.C., Silva, L.M., *et al.*, 2005. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publ.*, v.21, n.6, p.1801-1807.

Nascimento, M.D.S.B., Bezerra, G.F.B., Bandeira Neto, A.P., *et al.*, 2006. Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE anti-leishmania como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luís, MA. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.39, n.1, p.38-42.

Oliveira, A.L.L, Paniago, A.M.M., Sanches, M.A., *et al.*, 2008. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Cadernos de Saude Pública*, v.24, n.12, p.2827-2833.

Orlandi-Pradines, E., Almeras, L., Senneville, L.D., *et al.*, 2007. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes and Infect.*, v.9, n.12-13, p.1454-1462.

Poinsignon, A., Cornelie, S., Mestres-simon, M., *et al.*, 2008. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One.*, v.3, n.6, p.e2472.

Ponte, C. B.; Souza, N. C.; Cavalcante, M. N. *et al.*, 2011. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an endemic area in Raposa, State of Maranhão, Brazil. *Rev da Socied Brasil de Medic Trop* v. 44, n. 6, p. 717-721.

Remoue, F., Cisse, B., Ba, F., *et al.*, 2006. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.100, n.4, p.363-370.

Riera, C.; Fisa, R.; Udina, M. *et al.*, 2004. Detection of *Leishmania infantum* cryptic in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans Soc Trop Med Hyg.*; v.98, p.102-110.

Romero, H.D., Silva, L.A., Silva-Vergara, M.L., *et al.*, 2009. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg.*, v.81, n.1, p.27-33.

Sanders, M.L., Glass, G.E., Nadelman, R.B., *et al.*, 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.*, v.149, n.8, p.777-784.

Schenkel, K.; Rijal, S.; Koirala, S.I.; *et al.*, 2006. Visceral leishmaniasis in southeastern Nepal: a cross-sectional survey on *Leishmania donovani* infection and its risk factors. *Trop Med and Internat Health*, v. 11, n. 12, p. 1792-1799.

Schwartz, B.S., Ribeiro, J.M., Goldstein, M.D., 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol.*, v.132, n.1, p.58-66.

Schwarz, A., Medrano-Mercado, N., Billingsley, P.F., *et al.*, 2010. IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol.*, v.40, n.11, p.1295-1302.

Schwarz, A., Juarez, J.A., Richards, J., *et al.*, 2011. Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission. *Int J Parasitol.*, v.41, n.6, p.591-594.

Silva, L.A., Romero, H.D., Nascentes, G.A.N., *et al.*, 2011. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.*, v.84, n.2, p.261-266.

Silveira, F.T., Lainson, R., Crescente, J.A., *et al.*, 2010. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.104, n.8, p.529-535.

Singh, S.; Kumari, V.; Singh, N. 2002. Predicting kala-azar disease manifestation in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant k39 antigen. *Clin Diag Lab Immunol*, v.9, p.568-572.

Singh, S., Sivakumar, R., 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med.*, v.49, n.1, p.55-60.

Souza, A.P., Andrade, B.B., Aquino, D., *et al.*, 2010. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.4, n.3, p.e649.

Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., *et al.*, 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.4, n.3, p.e638.

Viana, G.M.C.; Nascimento, M.D.S.B.; Viana, M.G.C., *et al.*, 2000. Avaliação prospectiva do antígeno rK39 como indicador de doença ativa em leishmaniose visceral. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 33, supl. 1, p. 319-320.

Werneck, G. L. 2008. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad de Saúd Públic.*, v. 24, n. 12, p. 2937-2940.

WHO, World health organization, 2011. Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949, p.1185.

WHO, World Health Organization, 2014. Leishmaniasis. Situation and trends. Available on: <[www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/index.html](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html)>. Accessed in: August, 2014.

## **8.2 ARTIGO 2**

**INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania* sp. E ANTICORPOS  
ANTISSLIVA DE *Lutzomyia longipalpis* EM CRIANÇAS NA REGIÃO  
CENTRO-OESTE DO BRASIL**

**INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania* sp. E ANTICORPOS  
ANTISSLALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* EM CRIANÇAS NA REGIÃO  
CENTRO-OESTE DO BRASIL**

<sup>1</sup>Thiago Leite Fraga, <sup>2</sup>Magda Freitas Fernandes, <sup>1</sup>Elenir Rose Jardim Cury Pontes, <sup>2</sup>Ana Paula Silva Levay, <sup>2</sup>Elenice Brandão Almeida da Cunha, <sup>1</sup>Adriana de Oliveira França, <sup>1</sup>Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias – PPGDIP. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brazil.

Autor para Correspondência: Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval. Address: Laboratório de Parasitologia Clínica/CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Caixa Postal 549, Cidade Universitária, S/N, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil. Tel.: +55 67 33457691

E-mail address: elizabeth.dorval@ufms.br

## **RESUMO**

No ciclo natural de transmissão da leishmaniose visceral, as fêmeas infectadas de flebotomíneos ao regurgitarem promastigotas na pele de hospedeiro, também inoculam componentes salivares com propriedades imunomodulatórias que facilitam o estabelecimento da infecção no hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* em hospedeiros humanos em área de transmissão esporádica para leishmaniose visceral na região Centro-Oeste do Brasil. A presença de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* e o teste de hipersensibilidade tardia positivo correlacionaram fortemente com a proteção e o desenvolvimento de anticorpos anti-*Leishmania*. Do total de 492 crianças, anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* foram detectados em 38,4% dos 492 participantes. Houve maior porcentagem (64,7%) de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* entre as crianças positivas para anti-*Leishmania* e para o teste de hipersensibilidade do tipo tardia (n=84) com 34,8%. No presente estudo, nenhuma das amostras foi considerada positiva pelo teste rápido rK39. Os resultados relativos à pesquisa de IgG antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* mostraram que, do mesmo modo que muitas

crianças foram expostas ao flebotômíneo infectado como evidenciado pela positividade ao DTH e à pesquisa de IgG anti-*Leishmania*, também desenvolveram anticorpos antissaliva, o que pode indicar que a saliva do flebotômíneo possui um alto poder imunogênico, e levam-nos a aceitar a sua utilização como marcador epidemiológico de exposição.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, *Lutzomyia longipalpis*, saliva.

## INTRODUÇÃO

O modo usual de transmissão de *Leishmania infantum* é pela picada da fêmea de *Lutzomyia longipalpis* e inoculação de formas promastigotas durante o repasto sanguíneo. Alguns estudos provaram que a saliva do flebotômíneo exerce importante papel como anticoagulante, além de possuir o vasodilatador maxadilina que inibe a ação de macrófagos, aumenta o fluxo sanguíneo e assim acelera e otimiza o repasto sanguíneo (LERNER *et al.*, 1991; ANDRADE *et al.*, 2007; VINHAS *et al.*, 2007).

Juntamente com as formas parasitárias, a fêmea de *Lu. longipalpis* depositam componentes salivares que auxiliam nos processos hemostáticos, inflamatórios e imunológicos. Contribuindo ou não para o estabelecimento da infecção (RIBEIRO, 1987; BARRAL *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003), uma grande quantidade de moléculas vasodilatadoras potentes e com propriedades imunomodulatórias que induzem uma imunidade celular e a produção de anticorpos específicos (LERNER *et al.*, 1991; ANDRADE *et al.*, 2007; VINHAS *et al.*, 2007) também estão presentes.

Algumas destas proteínas salivares são imunogênicas em seres humanos, canídeos e ratos (BAHIA *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2007). Exposição repetida a homogeneizado de glândula salivar ou picadas de flebotômíneos têm sido eficazes para proteger ratos sob desafio subsequente com *Leishmania major* (BELKAID *et al.*, 1998; KAMHAWI *et al.*, 2000).

Estudos sorológicos demonstraram que o índice de proteína salivar liberado pelo vetor no repasto sanguíneo é influenciado pela época do ano e pela fonte de alimentação (VOLF; TESAROVA; NOHYNKOVA., 2000; PRATES; SANTOS; MIRANDA, 2008). Uma limitação no uso das proteínas salivares é a falta de especificidade à imunogenicidade nas diferentes espécies, porém duas moléculas de recombinação

podem minimizar este problema, pois são moléculas espécie-específicas de *Lutzomyia longipalpis*, a rLJM17 e rLJM11 que já foram reconhecidas em soros humanos, de cães e raposas em áreas endêmicas de LV (SOUZA; ANDRADE; AQUINO, 2010).

Em estudo realizado por Gomes *et al.* (2002) em área endêmica de LV, a presença de anticorpos antissaliva nos seres humanos correlacionou fortemente com a proteção e o desenvolvimento de anticorpos anti-*Leishmania*, no entanto, indivíduos que tiveram uma fraca produção de anticorpos apresentaram progressão da doença.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* e sua correlação com anticorpos anti-*Leishmania* e resposta celular em crianças de área de transmissão esporádica para leishmaniose visceral na região Centro-Oeste do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado com 492 crianças clinicamente saudáveis e sem histórico de LV, de escolas municipais e estaduais de Dourados/Mato Grosso do Sul, no período de fevereiro de 2011 a fevereiro de 2014.

Previamente à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), eram realizadas palestras para os responsáveis pelas crianças com o objetivo de informar e esclarecer sobre a doença e o estudo. Não foram incluídas crianças que não aceitaram participar da pesquisa ou aquelas cujos responsáveis recusaram-se a assinar o TCLE.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o protocolo N° 2173.

### **Coleta de sangue**

Foram coletados 10 mL de sangue periférico, mantidos a temperatura ambiente até o processamento.

### **Detecção de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis***

As glândulas salivares de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* foram cedidas pelo Laboratório de Imunopatologia da FIOCRUZ/BA- Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

Foram realizados testes sorológicos pelo método imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ELISA a fim de se determinar a presença de anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis*. Como antígeno foi usado o homogeneizado de glândula salivar na concentração de 26,95 µg/mL. As placas de microaglutinação com 96 poços, de baixa afinidade (Linbro/Titertek), foram sensibilizadas com 20 ng de antígeno salivar por poço e ressuspensas em 100 µL de tampão bicarbonato-carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30,8 mM, timerosal 0,01%), pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4°C. Em seguida, o excesso de antígeno foi removido e foram realizadas três lavagens com tampão PBS 1x Tween 0,05%. Para o bloqueio foi utilizado o tampão PBS 0,1% Tween 0,05% soro bovino fetal (BSA), durante 1 hora a 37°C.

Foram adicionados 100 µL de soro em cada poço na diluição de 1/100 em PBS 1x Tween 0,05%, sendo a placa incubada *overnight* a 4°C. Após a remoção do soro, as placas foram lavadas conforme supracitado e adicionados 100 µL do conjugado humano anti-IgG peroxidase na diluição de 1:2500 (Promega, WI, EUA) por poço, diluído em tampão PBS durante 45 minutos a uma temperatura de 37°C. O anticorpo secundário foi removido e as placas novamente lavadas, sendo adicionados 100 µL de solução reveladora com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), na presença do cromógeno ABTS [2,2 azino-di-(ácido sulfônico 3-etilbenzotiazolino)] (Sigma Chemical Co. St. Louis, MI, EUA) por 1 hora, à temperatura ambiente. Finalmente a reação foi interrompida pela adição de 100 µL SDS a 5% (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>-NaO 4-Sulfato dodecil de sódio - BDH Laboratory supplies). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Titertek instruments, Inc., Huntsville, AL, EUA), com absorvância a 405 nm. O *cut off* do ELISA anti-IgG total de saliva de *Lu. longipalpis* foi estabelecido pelo cálculo da média mais três vezes o desvio-padrão da densidade ótica (DO) das amostras de soro de 26 indivíduos sem histórico de LV. As amostras de soro com DO acima do *cut off* 0,028, foram consideradas positivas para saliva de *Lu. longipalpis*. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes com resultados semelhantes.

### **Detecção de anticorpos anti-*Leishmania***

As reações foram realizadas conforme descrito por Barral *et al.* (2000), com adaptações. Placas de 96 poços (Linbro/Titertek) foram sensibilizadas com SLA (10 µg/mL) em tampão carbonato (NaHCO<sub>3</sub> 0,45M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,02 M, pH 9,6) a 4°C *overnight*. Após três lavagens com PBS-*Tween* 0,05%, as placas foram bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente com PBS *Tween* 0,05% mais 1% de soro bovino fetal (BSA). Os soros foram diluídos 1:100 com PBS-*Tween* 0,05% mais 0,25% de BSA e incubados por 1 hora a 37°C. Após uma última série de lavagens, os poços foram incubados com anti-IgG humano conjugado a fosfatase alcalina (Sigma, St. Louis, MO) na diluição 1:2500 em PBS-*Tween* 0,05% mais 0,25% de BSA por 1 hora a 37°C. Novamente as placas foram lavadas e colocadas para revelar por 30 minutos com uma solução cromogênica de p-nitrofenilfosfato em tampão carbonato de sódio pH 9,6 com 1mg/mL de MgCl<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de NaOH 3M, e as densidades ópticas foram lidas no comprimento de onda de 405 nm em um leitor de placas Spectral Max 190 Soft Max-Pro Software versão 5 (Molecular Devices Corporation Sunnyvale, California 94089). Em todos os experimentos, os valores obtidos foram subtraídos dos obtidos no *background*. O *cut off* do ELISA anti-IgG total de *Leishmania* foi estabelecido pelo cálculo da média mais três vezes o desvio-padrão da densidade óptica (DO) das amostras de soro de 26 indivíduos sem histórico de LV. As amostras de soro com DO acima do *cut off* 0,064, respectivamente, foram consideradas positivas para *Leishmania*. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes com resultados semelhantes.

### **Teste Rápido Anti-*Leishmania* rK39**

O teste rápido (Kalazar Detect™, Inbios International, Seattle, WA) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 20 µL das amostras de soro foram adicionados na área específica da fita, seguida de três gotas de tampão de corrida. A leitura dos resultados foi feita após dez minutos do início do teste, considerando-se positivo ou negativo segundo a presença ou ausência da linha teste.

### Teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

O teste de DTH foi realizado em todos os participantes, com a leitura realizada 72 horas após a inoculação intradérmica de 0,1mL do antígeno solúvel de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa de referência OMSMHOM/BR/73/PH8) na concentração  $1 \times 10^7$  leishmanias/mL, na face anterior do antebraço direito. A interpretação baseou-se na área de induração apresentada, sendo adotados os seguintes valores de referência: <5mm (= negativo),  $\geq 5$ mm (= positivo) (BRASIL, 2014). O antígeno utilizado foi proveniente do Centro de Pesquisas e Produção de Imunobiológicos (CPPI) da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.

### Análise estatística

Os dados foram apresentados descritivamente por meio das seguintes medidas: mediana, valor mínimo e máximo da idade, frequência absoluta e relativa das demais variáveis. Para verificar possíveis associações entre as variáveis de estudo foi realizado o teste qui-quadrado ao nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa EPI INFO versão 7 (Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta/Georgia/Estados Unidos). Para a confecção dos gráficos foi utilizado o programa Graph Pad Prism versão 6 (GraphPad Software Inc., San Diego/California/Estados Unidos).

## RESULTADOS

Do total de 492 crianças, 52% eram do sexo masculino e 48% do sexo feminino. A idade variou de quatro a 13 anos, com mediana de oito anos. Todas as crianças eram procedentes de Dourados/MS e 99,6% eram de área urbana.

Anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* foram detectados em 38,4% (16,6% a 23,7% IC 95%) dos 492 participantes. De 256 crianças do sexo masculino, houve detecção de anticorpos antissaliva em 38,6% e 38,1% no feminino (n=236). Apesar do sexo feminino apresentar seis valores mais altos em comparação ao masculino (Figura 1), não houve diferença na porcentagem de crianças com valores acima do *cut off* entre os sexos (Teste Qui-quadrado  $p=0,903$ ).

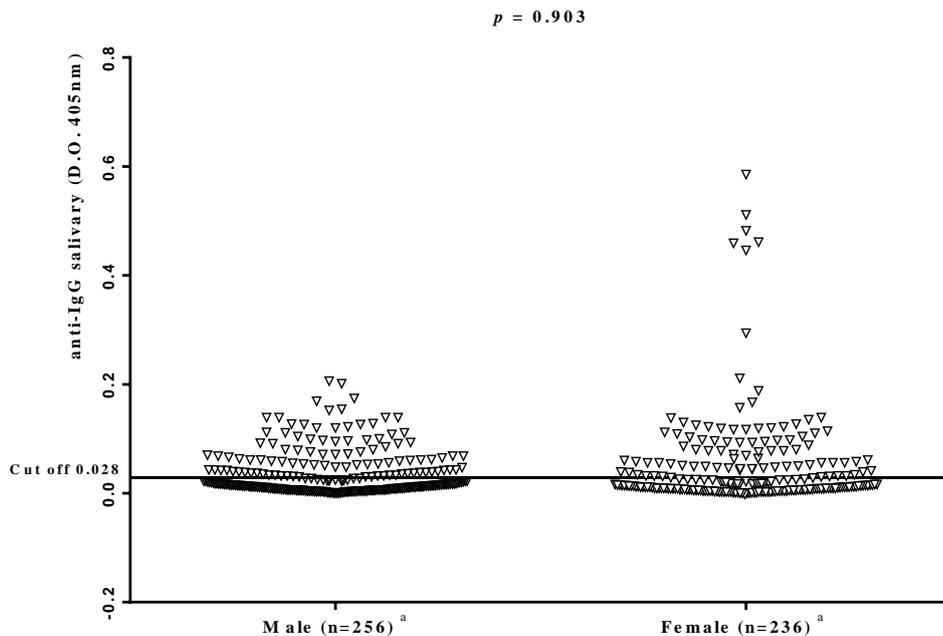


Figura 1 - Quantidade de crianças assintomáticas na região Centro-Oeste do Brasil com ELISA antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* positiva segundo sexo masculino (38,6%) e feminino (38,1%). Cada símbolo representa 1 criança. Teste Qui-quadrado. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa.

De 45 crianças na faixa etária de 4 a 6 anos, 60% apresentaram anticorpos antissaliva, 31,7% na faixa de 7 a 9 anos (n=271), e 43,2% na faixa de 10 a 13 anos (n=176). Houve maior porcentagem de crianças positivas (ELISA antissaliva) na faixa etária de 4 a 6 anos (Teste Qui-quadrado  $p < 0,001$ ) em comparação às outras faixas etárias (Figura 2), mesmo com a presença nessas faixas, de valores mais altos, em duas crianças na faixa de 7 a 9 anos e cinco crianças na faixa de 10 a 13 anos.

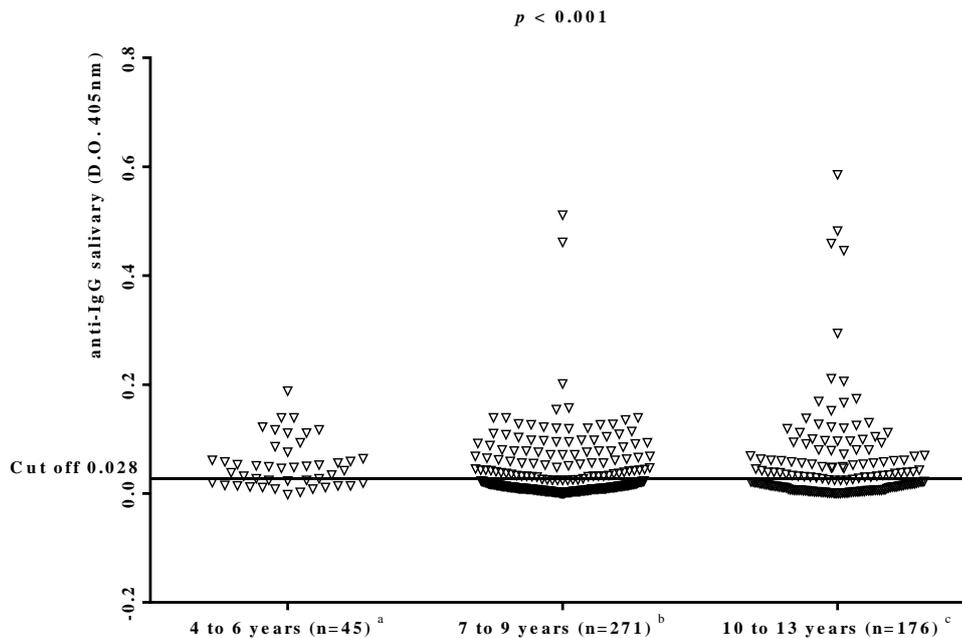


Figura 2 - Quantidade de crianças na região Centro-Oeste do Brasil com ELISA anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis* positiva segundo faixa etária: de 4 a 6 anos (60%), de 7 a 9 anos (31,7%) e de 10 a 13 anos (43,2%). Cada símbolo representa 1 criança. Teste Qui-quadrado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Houve maior porcentagem (64,7%) de crianças com anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis* nas crianças positivas para anti-*Leishmania* (n=99) em comparação às negativas (n=393), com 31,8%, mesmo com sete crianças negativas apresentando valores mais elevados de anticorpos antissaliva (Figura 3).

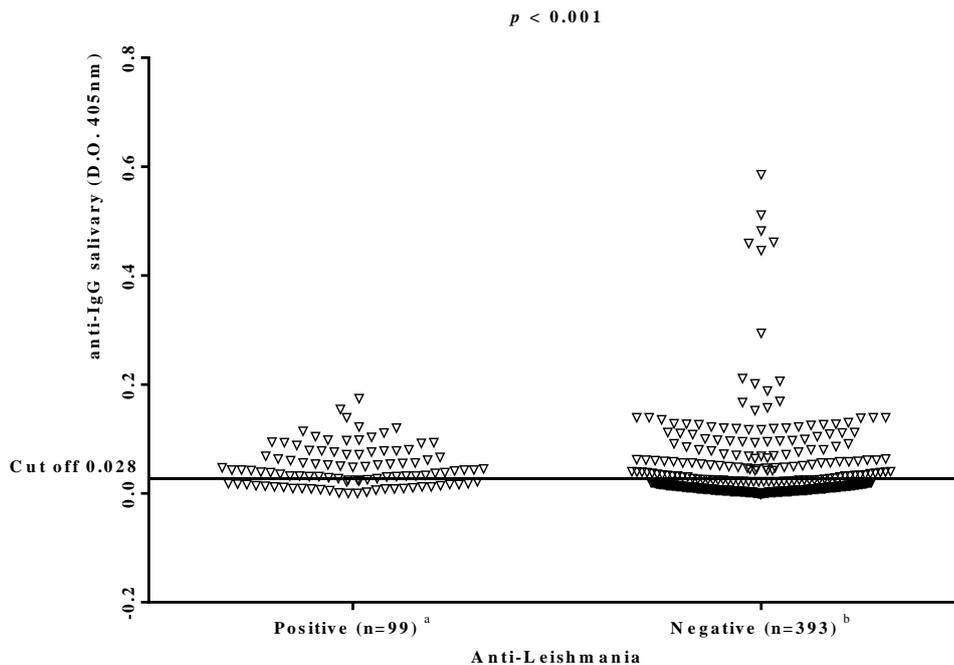


Figura 3 - Quantidade de crianças na região Centro-Oeste do Brasil com ELISA antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* positiva segundo teste para anti-*Leishmania*: positivas (64,7%) e negativas (31,8%). Cada símbolo representa 1 criança. Teste Qui- quadrado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Houve maior porcentagem (44,2%) de crianças com anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis* nas crianças positivas para o teste de hipersensibilidade do tipo tardia (n=84) em comparação às negativas (n=105), com 34,8%, mesmo com seis crianças negativas apresentando valores mais elevados de anticorpos antissaliva (Figura 4).

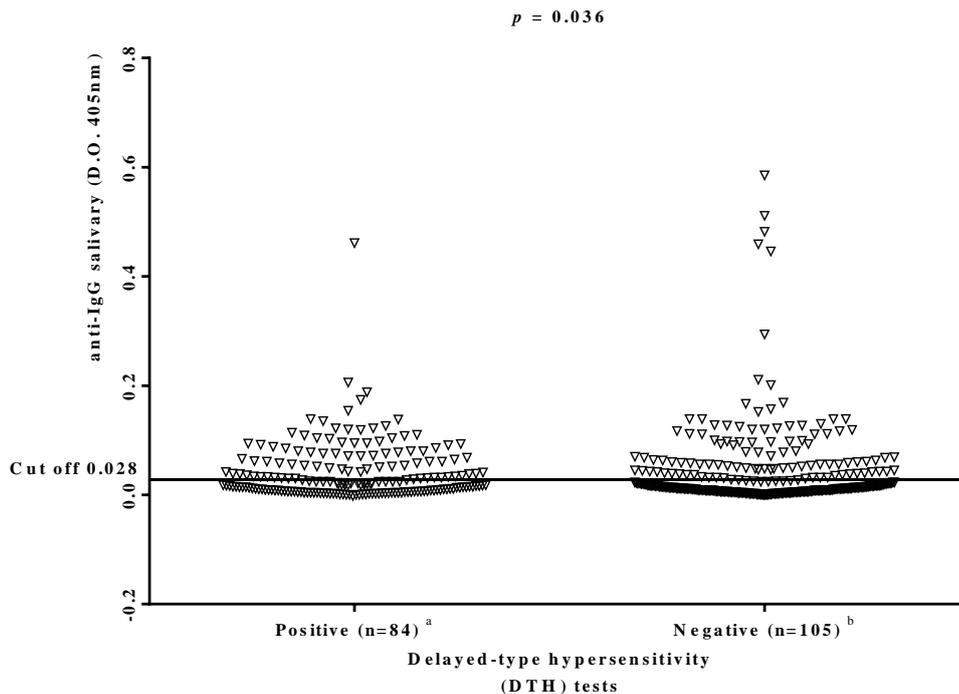


Figura 4 - Quantidade de crianças na região Centro-Oeste do Brasil com ELISA antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* positiva segundo teste de hipersensibilidade do tipo tardia: positivas (44,2%) e negativas (34,8%). Cada símbolo representa 1 criança. Teste Qui-quadrado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Na análise dos grupos segundo a combinação dos resultados do anti-*Leishmania* (A) e do teste de hipersensibilidade do tipo tardia (D), o grupo A+D- apresentou uma porcentagem de 67,5% de crianças com anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis*. Não houve diferença estatística em relação ao grupo A+D+ (62,7%), entretanto houve diferença em relação aos demais grupos, A-D+ (35,9%) e A-D- (29,8%) (Figura 5).

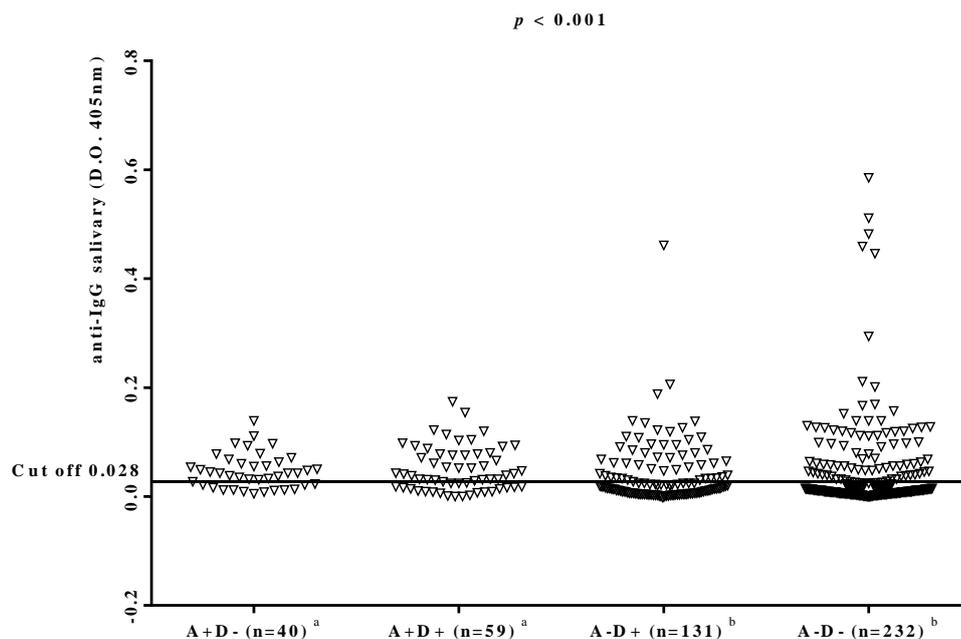


Figura 5 - Quantidade de crianças na região Centro-Oeste do Brasil com ELISA antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* positiva segundo a combinação dos resultados do anti-*Leishmania* (A) e do teste de hipersensibilidade do tipo tardia (D): A+D- (67,5%), A+D+ (62,7%), A-D+ (35,9%) e A-D- (29,8%). Cada símbolo representa 1 criança. Teste Qui-quadrado. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

## DISCUSSÃO

A prevalência de portadores assintomáticos de LV, em áreas endêmicas, tem sido relatada cada vez mais, tanto no Brasil (D'OLIVEIRA *et al.*, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012), como em outros países do mundo (FEDERICO *et al.*, 1991; KUBAR *et al.*, 1997; LE FICHOUX *et al.*, 1999; MARTÍN-SÁNCHEZ *et al.*, 2001; KYRIAKOU *et al.*, 2003; MARY *et al.*, 2006; SCARLATA *et al.*, 2008; DAS *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência de portadores assintomáticos para LV varia de 3 a 73,4%. Estas diferenças são atribuídas aos diferentes métodos de diagnósticos utilizados, no entanto, não se pode excluir outros fatores, como taxa de transmissão, densidade de flebotomíneos, pluviosidade, tempo de

endemicidade e carga parasitária no hospedeiro% (LE FICHOUX *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2010).

Os resultados do presente estudo mostram que crianças residentes em área de transmissão esporádica e que convertem o DTH anti-*Leishmania*, com possível resolução espontânea da infecção e resposta imune recente, são capazes de produzir anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis* à semelhança do observado por Gomes *et al.* (2002) em área endêmica na Bahia. Tais resultados corroboram com a hipótese de outros autores (BELKAID *et al.*, 1998; GHOSH *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2010) sugerindo que a imunidade desenvolvida contra a saliva dos flebótomos pode influenciar a resposta imune contra *Leishmania*, resultando em proteção contra a infecção.

No entanto, o papel protetor de anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis* ainda não foi estabelecido no homem, o que poderá ter implicações na epidemiologia das leishmanioses e em um possível desenvolvimento de vacinas multi-antigênicas. A possibilidade de incluir antígenos salivares na fabricação de vacinas para o combate de doenças transmitidas por artrópodes é uma perspectiva real, tendo em vista a importância da saliva na instalação da infecção (TITUS *et al.*, 2006).

Assim, permite-se sugerir que as crianças do presente estudo que desenvolveram imunidade contra saliva de flebotômico, aumentam a resposta imune contra antígenos de *Leishmania*, protegendo-se do desenvolvimento da doença, uma vez que a positividade ao DTH é normalmente associada com resistência, e 64,7% (64/99) das crianças que foram diagnosticadas com anticorpos anti-*Leishmania*, possuíam a presença de anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis*.

Repetidas picadas pelos vetores resultam na produção de anticorpos antissaliva (REUNALA *et al.*, 1994; PENG *et al.*, 1998), e o estudo em vários modelos animais não só tem demonstrado a produção de anticorpos antissaliva, como também tem procurado elucidar o possível papel protetor destes anticorpos (CROSS *et al.*, 1993; MATHEWS *et al.*, 1996; GHOSH *et al.*, 1998; BELKAID *et al.*, 1998; KAMHAWI *et al.*, 2000; VALENZUELA; BELKAID; GARFIELD, 2001).

Os resultados relativos à pesquisa de IgG antissaliva de *Lu. longipalpis* mostraram que, do mesmo modo que muitas crianças foram expostas ao flebotômico infectado como evidenciado pela positividade ao DTH e à pesquisa de IgG anti-*Leishmania*, também desenvolveram anticorpos antissaliva, o que pode indicar que a saliva do flebotômico, tanto em residentes de áreas não endêmicas como nos de áreas

endêmicas de LV, possui um alto poder imunogênico, e levam-nos a aceitar a sua utilização como marcador epidemiológico de exposição, como sugerido por Barral *et al.* (2000).

Pessoas expostas a *Leishmania* reconhecem antígenos de glândula salivar do flebótomo, ao mesmo tempo em que existe uma correlação positiva entre os níveis de anticorpos IgG antissaliva e a resposta ao antígeno de *Leishmania* por DTH (BARRAL *et al.*, 2000).

Portanto, acredita-se que no grupo de crianças com DTH positivo estariam aquelas protegidas de uma possível infecção por sua capacidade de elaborar uma resposta imune efetiva contra antígenos de *Leishmania*. Apesar deste grupo apresentar uma maior concentração de indivíduos com anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis*, o papel destes anticorpos contendo um possível efeito protetor em relação ao desenvolvimento da doença, ainda não está bem esclarecido. É possível que os anticorpos bloqueiem os produtos salivares reduzindo a ação depressora sobre macrófagos, o que favoreceria uma melhor apresentação de antígeno e o desenvolvimento da imunidade celular. Também é possível indagar se a consequente redução da carga parasitária influencia no desenvolvimento mais eficiente da resposta imune (GOMES *et al.*, 2007).

No presente estudo, nenhuma das amostras foi considerada positiva pelo teste rápido, corroborando outros estudos que relatam a sua baixa sensibilidade para a detecção da infecção assintomática (ROMERO; SILVA; SILVA-VERGARA, 2009; WHO, 2011; CLEMENTE *et al.*, 2014; FUKUTANI *et al.*, 2014), reafirmando que os ensaios de rK 39 são mais úteis para diagnosticar LV ativa do que a infecção.

Os resultados do DTH e da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* revelam que as crianças estão sendo expostas a picadas de *Lutzomyia longipalpis* e ao protozoário *Leishmania*, o que sugere uma possível proteção pela exposição à saliva e uma efetiva imunocompetência, pois nenhuma das crianças durante o acompanhamento clínico apresentou sintomatologia sugestiva de LV (ANDRADE *et al.*, 2007; BARRAL *et al.*, 2010).

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

Diante dos resultados que vêm sendo obtidos em diferentes estudos, Morris; Shoemaker; David (2001) e Valenzuela; Belkaid; Garfield (2001) sugerem que componentes da glândula salivar de flebotomíneos podem ser potenciais candidatos à vacina contra a leishmaniose humana. Ressalta-se que o presente estudo foi realizado em uma área de baixa endemicidade de LV, onde se determinou que a população encontra-se exposta à sucessivas picadas de vetores infectados, tendo em vista a prevalência de infecção detectada (20,1%), permitindo questionar a existência de diversidade antigênica entre os componentes salivares dos flebotomíneos das diferentes áreas de ocorrência da parasitose, uma vez que a situação no município estudado difere de outras áreas no que diz respeito à presença de elevado número de portadores assintomáticos quando comparado aos casos de doença notificados.

#### **AGRADECIMENTOS**

Dra Aldina Barral e Dra Juqueline Cristal, pela contribuição das amostras de saliva de *Lutzomyia longipalpis*.

Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul - FUNDECT pelo apoio financeiro.

Dr Luis Henrique Ferraz Demarchi - Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Mato Grosso do Sul – LACEN, pela cedência do antígeno de Montenegro.

## REFERÊNCIAS

- Andrade, BB, Oliveira, CI, Brodskyn, et al. Role of Sand Fly Saliva in Human and experimental leishmaniasis: Current Insights. *Scand J Immunol.* 2007; 66:122-127.
- Bahia D, Gontijo NF, Leon IR, et al. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Res.* 2007; 100: 449–454.
- 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; 62:740-745.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi, G. et al. 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.* 1998; 188: 1941–1953.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF, Ministério da Saúde, p. 122, 2014.
- Clemente WT, Rabello A, Faria LC. High prevalence of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area of Brazil. *Am J Transplant.* 2014; 14: 96-101.
- Cross ML, Cupp MS, Cupp EW, et al. Antibody responses of Balb/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (Diptera: Simuliidae). *J. Med. Entomol.* 1993; 30:725-734.
- Das VNR, Siddiqui NA, Verma RB, et al. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to kala-azar elimination programmes. *Trans Royal Soc Trop Med and Hyg.* 2011; 105: 661-666.
- D'Oliveira, JR; Costa, SRM.; Barbosa, AB, et al. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92: 15-20.
- Federico G, Damiaco F, Caldarola G, Fantini C. A seroepidemiological survey on *Leishmania infantum* infection. *Eur. J. Epidemiol.* 1991; 7: 380-383.
- Fukutani KF, Figueiredo V, Celes FS. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. *Infect Dis.* 2014; 30: 422.

Ghosh KN, Mukhopadhyay J. The effect of anti-sand fly antibodies on phlebotomus argentipes and *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol*. 1998; 28:275-281.

Gomes RB, Brodskyn C, De Oliveira CI, et al. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis*. 2002; 15:1530-1534.

Gomes RB, Mendonca IL, Silva VC, et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007; 101: 127–133.

Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*. 2000; 290: 1351–1354.

Kubar J, Quaranta JF, et al. Transmission of *L. infantum* by blood donors. *Nat. Med*, 1997; 3; 4: 368.

Kyriakou DS, Alexandrakis MG, et al. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is pre storage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? *Transfus. Med*. 2003; 13: 59-62.

Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JPJ, et al. *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1953-7.

Lerner EA, Ribeiro JMC, Nelson RJ, et al. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chemistry*. 1991; 266: 11234-11236.

Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, et al. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2012; 86; 1: 99-107.

Martin-Sanchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sanchez C, et al. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology*. 2001; 122: 607-615.

Mathews GV, Sidjanski S, Vanderberg JP. Inhibition of mosquito salivary gland apyrase activity by produced in mice immunized by bites of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1996; 55:417-423.

Mary C, Faraut F, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2006; 75: 858-863.

Morris RV, Shoemaker CB, David JR. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol.* 2001;167: 5226-5230.

Oliveira ALL, Paniago AMM, Sanches MA, et al. Asymptomatic infection in family contacts of contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Cad Saúde Publ.* 2008; 24: 2827-2833.

Peng Z, Simons FE. Cross-reactivity of skin and serum specific IgE responses and allergen analysis for three mosquito species with worldwide distribution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 100: 192-198.

Prates DB, Santos LD, Miranda JC, et al. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol.* 2008; 3: 409-413.

Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Palosuo K, et al. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communism* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994; 104: 366-371.

Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Ver Entomol.* 1987; 32: 463-478.

Ribeiro JMC, Francischetti IMB. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology.* 2003; 48: 73-88.

Romero HD, Silva LA, Silva-Vergara ML, et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81: 27-33.

Scarlata F, Vitale F, et al. Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 :394-396.

Silveira FT, Lainson R, et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2010; 104:529-535.

Souza AP, Andrade BB, Aquino D, et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4: 649.

Titus RG, Bishop JV, Mejia JS, et al. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology.* 2006; 628: 131-141.

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; 194:331-342.

Vinhas, V.; Andrade, B.B.; Paes, F. et al. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *Eur J Immunol.* 2007; 37, 3111-3121.

Volf, P.; Tesarová, P.; Nohynková, E. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, Sex and age. *Med. Vet. Entomol.* 2000; 14:251-256.

WHO. Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series 2011; 949:1185.

## 10 DISCUSSÃO

A expansão progressiva das leishmanioses, seja pela maior ação antrópica como também pelas mudanças em seus perfis epidemiológicos, com a adaptação de seus agentes etiológicos a novos hospedeiros e conseqüente introdução no ambiente domiciliar, vem sendo considerado um modelo de doença emergente e têm despertado na comunidade científica, política e na sociedade em geral, séria preocupação frente à gravidade, tanto na forma tegumentar como na visceral, mormente seus índices de morbidade e letalidade e sua grande capacidade de disseminação.

O presente estudo foi motivado pela expansão geográfica da doença, o incremento no número de casos de LV canina, e a situação no município de Dourados, totalmente diversa das demais regiões do estado, ao notificar, em 2012, o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana, nove anos após a ocorrência de casos caninos e quatro anos após o relato da presença do achado, em área urbana, do vetor *Lu. Longipalpis*.

No Mato Grosso do Sul a LV vem sendo diagnosticada tanto na população humana quanto na canina em 58 municípios. De acordo com o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), de janeiro de 1999 até dezembro de 2014 foram confirmados 3.245 casos humanos de LV, com 273 óbitos registrados (MATO GROSSO DO SUL, 2015).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2014), as ações específicas de prevenção e controle da LV devem ser desenvolvidas segundo o perfil epidemiológico dos municípios, classificados anualmente de acordo com o número de casos nos últimos cinco anos, o que determina o município de Dourados como uma área de transmissão esporádica para LV, com presença de quatro casos humanos de leishmaniose visceral até o ano de 2014 (MATO GROSSO DO SUL, 2015).

Sabe-se que o meio ambiente possui papel determinante na distribuição das doenças transmitidas por vetores. Variáveis como clima, fragmentação de florestas e atividades antrópicas, aliadas a fatores socioeconômicos e culturais, podem contribuir para a domiciliação de hospedeiros de parasitos que acometem a saúde humana, favorecendo relações interespecíficas que proporcionam o crescimento das populações de vetores e parasitos (WERNECK, 2010).

Inquéritos realizados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em Dourados, indicam a ocorrência de um aumento anual gradativo nos casos de leishmaniose visceral

canina, o que permite comprovar as dificuldades e a ineficácia dos métodos de controle. A captura frequente de *Lu. longipalpis* na área urbana com o aumento da incidência de casos caninos de LV apontam para a participação desta espécie de flebotomíneo na cadeia de transmissão de *Leishmania infantum* no município, e merece ser avaliada em estudos entomológicos projetados especialmente para esse fim (MATO GROSSO DO SUL, 2015).

Estudos em áreas endêmicas para *Leishmania* mostram claramente que a evolução da infecção por este microrganismo é espectral, com características de suscetibilidade e resistência a desenvolver formas graves da doença. Essas categorias fenotípicas são críticas para análise imunogenética de infecção (DANTAS-TORRES, BRANDÃO-FILHO, 2006).

O número de portadores assintomáticos é muito mais elevado do que o número de pacientes com manifestações clínicas, com prevalências na Europa e América do Sul que variam de 3% a 73,4% com a maioria apresentando infecções auto resolutivas, e apenas 12 a 20% desenvolvendo a doença (LE FICHOUX *et al.*, 1999; MARTÍN-SÁNCHEZ *et al.*, 2001; MARY *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2010; MARQUES, GOMES, ROCHA; 2012).

Pareceu justificado então, avaliar a resposta imune humoral e celular anti-*Leishmania* em crianças de área urbana considerada de transmissão esporádica para leishmaniose visceral, o que está apresentado no artigo **“INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania* sp. EM CRIANÇAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL”**, constituindo o primeiro estudo na região que relata a presença de infecção assintomática por *Leishmania* em crianças de área urbana com baixa endemicidade para LV.

Positividade para anticorpos anti-*Leishmania* e para DTH, foi observada em 10,4% das crianças estudadas. A presença de portadores assintomáticos de LV, em áreas endêmicas, tem sido cada vez mais relatada na literatura, tanto no Brasil (D’OLIVEIRA *et al.*, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012), como em outros países (FEDERICO *et al.*, 1991; KUBAR *et al.*, 1997; LE FICHOUX *et al.*, 1999; MARTÍN-SÁNCHEZ *et al.*, 2001; KYRIAKOU *et al.*, 2003; MARY *et al.*, 2006; SCARLATA, VITALE; 2008; DAS *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência mundial de portadores assintomáticos para LV varia de 3% (LE FICHOUX *et al.*, 1999) a 73,4% (SILVEIRA *et al.*, 2010). Estas diferenças são atribuídas aos diferentes métodos de diagnóstico

utilizados, não podendo excluir outros fatores, como a taxa de transmissão, a densidade de flebotomíneos, a pluviosidade e o tempo de endemicidade.

O ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA) tem sido o método sorológico mais utilizado para o diagnóstico de leishmaniose visceral, e sua positividade, na ausência de sinais e sintomas, define infecção e por este motivo, também tem sido empregado em estudos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas (CALDAS *et al.*, 2001; BRASIL, 2014).

Na forma assintomática da LV os títulos de anticorpos são normalmente baixos (BRASIL, 2014). Nesse estudo, o teste de ELISA detectou 20,1% de indivíduos positivos à semelhança do observado por Nascimento *et al.* (2006) em área endêmica de LV na Ilha de São Luís-MA, porém superior aos 13,5% referido por Caldas *et al.* (2001) na mesma área.

Em áreas endêmicas de LV, uma proporção de indivíduos infectados desenvolve a doença (TEIXEIRA, 1980; BADARÓ *et al.*, 1986b; CALDAS *et al.*, 2001; BUCHETON, *et al.*, 2003; GAMA, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2005, NASCIMENTO *et al.*, 2006), porém apesar dessas observações e de terem sido identificados altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* nas crianças do presente estudo, verificou-se que as mesmas controlaram a infecção durante o período do seguimento (24 meses), uma vez que nenhuma desenvolveu a doença, contrariando o referido na maioria dos trabalhos.

Alguns estudos reforçam a ideia que o DTH é um teste sensível para a detecção da LV assintomática (RIERA *et al.*, 2008). Estudos conduzidos por Moreno *et al.*, (2005) em uma área próxima à Belo Horizonte (MG) concluiu que os testes sorológicos não são confiáveis como ferramenta diagnóstica na forma assintomática da leishmaniose visceral, devendo nesses casos serem empregados métodos moleculares. Acredita-se que isto comprovaria a periodicidade e a rápida passagem do parasito no sangue, tempo muito curto para o hospedeiro elaborar uma resposta humoral suficiente para ser detectada por meio de métodos sorológicos.

Na LV infecção, o teste mostra-se positivo e, por esse motivo, tem sido utilizado em inquéritos epidemiológicos que visam avaliar a prevalência e incidência de infecção por *L. infantum* (CALDAS *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2005, OLIVEIRA *et al.*, 2013).

No presente estudo o DTH mostrou positividade de 38,6%, superior aos 18,6% encontrado em áreas endêmicas do Maranhão (CALDAS *et al.*, 2001), da Bahia (TEIXEIRA, 1980), e de Minas Gerais (BORGES *et al.*, 2003) e também no Quênia no

Leste da África (10,5%) (SCHAEFER *et al.*, 1994). Entretanto, essa prevalência é inferior à detectada em outros estudos brasileiros nos quais foram observados valores de 63,2% (NASCIMENTO, 2006) e 61,7% (NASCIMENTO *et al.*, 2005), e de outros lugares do mundo onde o teste identificou prevalências de 45,9% na Tunísia-Norte da África (BEN SALAH *et al.*, 2003) e 46,5% na Etiópia-Leste da África (ALI; ASHFORD, 1994). Essas variações podem ser decorrentes de diferenças entre as faixas etárias estudadas, à maior ou menor exposição aos flebotomíneos infectados ou ainda, à maior capacidade de resposta imune celular pelos indivíduos dos diferentes estudos.

Os resultados desse estudo revelam que as crianças foram expostas ao protozoário *Leishmania*, com aparente imunocompetência, pois nenhuma delas, durante o seguimento, apresentou sintomatologia sugestiva de leishmaniose visceral.

Durante o processo de transmissão de *Leishmania* sp., os flebotomíneos injetam, junto com sua saliva, os parasitos no hospedeiro vertebrado. A importância da saliva desses insetos na infecção por *Leishmania* tem sido demonstrada em diversos estudos. A saliva contém um repertório variado de moléculas que modulam as respostas hemostática, inflamatória e imune de seus hospedeiros, com destaque para o peptídeo maxadilan, principal vasodilatador presente e com influência na infecção por *Leishmania*, sendo isolado apenas da saliva de *Lu. longipalpis* (RIBEIRO, FRANCISCHETTI, 2003; LERNER, RIBEIRO, NELSON, 1991; MORRIS *et al.*, 2001).

Embora os componentes salivares do flebotomíneo exacerbem a infecção por *Leishmania*, tem sido documentado que a pré-exposição a estes componentes ou às picadas desses insetos, conferem proteção contra a infecção (BELKAID *et al.*, 1998; KAMHAWI *et al.*, 2000; MORRIS *et al.*, 2001; VALENZUELA *et al.*, 2001).

Sabendo-se que crianças residentes em área endêmica para LV, não só reconhecem proteínas salivares de *Lu. longipalpis*, como produzem anticorpos antissaliva do flebotomíneo (BARRAL *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2007), foi realizado o estudo "**INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania* sp. E ANTICORPOS ANTISSALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* EM CRIANÇAS NA REGIÃO CENTRO OESTE DO BRASIL**", visando avaliar a presença desses anticorpos nas crianças de Dourados, área de baixa endemicidade para LV.

Os resultados mostraram que, do mesmo modo que muitas crianças foram expostas ao flebotomíneo infectado, como evidenciado pela positividade ao DTH e a pesquisa de IgG anti-*Leishmania*, também desenvolveram anticorpos antissaliva de *Lu.*

*longipalpis*, o que pode indicar que a saliva possui um alto poder imunogênico, tanto em residentes de áreas não endêmicas, como nos de áreas endêmicas para LV. Esses achados corroboram a possível utilização da saliva de flebotomíneo como marcador epidemiológico de exposição já sugerido por Barral *et al.* (2000).

Embora algumas limitações possam ser apontadas neste estudo, entre elas, o uso do antígeno bruto para a realização da pesquisa de anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis*, cuja concentração pode variar de um exemplar para outro, e a não realização de inquérito entomológico para comparar a densidade vetorial e positividade ao ELISA antissaliva, os resultados obtidos permitem sugerir que a imunidade desenvolvida contra a saliva do flebotomíneo aumenta a resposta imune contra antígenos de *Leishmania*, protegendo os indivíduos saliva positivos do desenvolvimento da doença, uma vez que a positividade ao DTH é normalmente associada com resistência (AQUINO *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2012).

Repetidas picadas pelos vetores parecem resultar na produção de anticorpos antissaliva (REUNALA *et al.*, 1994; PENG, SIMONS, 1998). O estabelecimento de vários modelos animais tem não só mostrado a produção de anticorpos antissaliva, como também tem procurado elucidar o possível papel protetor destes anticorpos (CROSS *et al.*, 1993; MATHEWS; SIDJANSKI; VANDERBERG, 1996; GHOSH, MUKHOPADHYAY, 1998; BELKAID *et al.*, 1998; KAMHAWI *et al.*, 2000; VALENZUELA *et al.*, 2001), fazendo-se necessário investigar se a resposta imune antissaliva depende de uma maior exposição ao vetor ou de uma resposta individual do hospedeiro.

Os resultados mostram que indivíduos que residem em área endêmica e que convertem o DTH anti-*Leishmania*, ou seja, apresentam resolução espontânea da infecção com resposta imune efetiva, são aqueles que foram capazes de produzir anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis*. Estes dados estariam de acordo com a hipótese de outros autores (BELKAID *et al.*, 1998; GHOSH, MUKHOPADHYAY, 1998) sugerindo que a imunidade desenvolvida contra a saliva dos flebótomos pode influenciar a resposta imune contra a *Leishmania*, resultando em proteção contra a infecção. No entanto, um papel protetor destes anticorpos antissaliva de *Lu. longipalpis* ainda não foi estabelecido no homem. O esclarecimento desta função poderá ter implicações na epidemiologia das leishmanioses e num possível desenvolvimento de novas vacinas anti-*Leishmania* a partir dos componentes de glândulas salivares de flebotomíneos (MORRIS *et al.*, 2001; VALENZUELA *et al.*, 2001).

Uma vez que o presente estudo foi realizado em uma área de baixa endemicidade para LV, onde se determinou que a população encontra-se exposta à sucessivas picadas de vetores, provavelmente infectados, tendo em vista a prevalência de infecção por *Leishmania* de 20,1%, é permitido questionar a possibilidade de diversidade antigênica entre os flebotomíneos das diferentes áreas de ocorrência da parasitose, assim como em relação ao agente etiológico e às condições fisiológicas e imunológicas inerentes aos hospedeiros, considerando que a situação no município estudado difere de outras áreas no que diz respeito à presença de elevado número de portadores assintomáticos quando comparado aos casos de doença notificados.

## 10 CONCLUSÃO

Todas as crianças do estudo eram procedentes de Dourados, MS, residentes em área urbana, de ambos os sexos, com idade variando de quatro a 13 anos. Os pais e/ou responsáveis declararam apresentar renda menor que dois salários mínimos vigentes.

Aspectos epidemiológicos de importância para a ocorrência de leishmaniose, estiveram presentes entre as crianças do estudo, destacando-se: condições inadequadas de saneamento básico, o cão do domicílio diagnosticado com leishmaniose, dentre outros. Apenas residir em domicílios do tipo alvenaria, mostrou associação com a presença de infecção assintomática por *Leishmania* sp.

A prevalência sorológica confirma a exposição ao protozoário e a presença da infecção assintomática por *Leishmania* sp. nas crianças de Dourados-MS, e alerta para a possibilidade das mesmas atuarem como fontes de infecção.

O teste de hipersensibilidade tardia mostrou-se reativo em 38,6% das crianças estudadas, sugerindo efetiva resposta imune celular, pois nenhuma delas, durante o seguimento, apresentou sintomatologia compatível com LV.

Positividade simultânea para anticorpos anti-*Leishmania* e teste de hipersensibilidade tardia foi observada nas crianças do estudo, o que indica infecção pelo protozoário e controle do parasitismo, evidenciado pela efetiva resposta proliferativa celular.

Anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* foram detectados nas crianças do estudo, evidenciando a exposição e o desenvolvimento de imunidade contra a saliva de *Lutzomyia longipalpis*, permitindo supor uma possível proteção à infecção por *Leishmania* sp.

A associação entre positividade de anticorpos antissaliva de *Lutzomyia longipalpis* e reatividade ao teste de hipersensibilidade tardia, reforça a hipótese de que a resposta imune antissaliva tem influência na imunidade contra *Leishmania*.

A exposição ao protozoário *Leishmania* e ao vetor, *Lutzomyia longipalpis* não foram determinantes para o desenvolvimento de leishmaniose visceral doença em 24 meses de acompanhamento clínico das crianças.

O teste rápido rK39 não é um bom marcador para avaliar exposição à *Leishmania* em indivíduos assintomáticos.

Embora seja considerada uma área de transmissão esporádica, a prevalência sorológica da infecção por *Leishmania* detectada na população estudada determina a endemicidade da leishmaniose visceral em Dourados-MS.

## REFERÊNCIAS

ALI, A.; ASHFORD, R.W. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. II. Annual leishmanin transformation in a population. Is positive leishmanin reaction a lifelong phenomenon? **Ann Trop Med L**; v. 87, p. 163-167, 1994.

ANDRADE, B.B.; OLIVEIRA, C.I.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL, A.; BARRAL NETO M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scand J Immunol.**, v. 66, p. 122-127, 2007.

AQUINO, D.M.; CALDAS, A.J.; MIRANDA, J.C.; SILVA, A.A.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Epidemiological study of the association between anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies and development of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* antigen. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 83, n. 4, p. 825-827, 2010.

BACELLAR, O.; BARRAL NETTO, M.; BADARO, R.; CARVALHO, E.M. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. **Braz J Med Biol Res.**; v. 24, n. 8, p. 791-795, 1991.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULALIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO E.M. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.**; v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LOURENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis.**; v. 154, p. 639-649, 1986a.

BADARÓ, R.; PEDRAL SAMPAIO, D.; JOHNSON WD, J.R., REED, S.G. Evaluation of the stability of a soluble intradermal skin test antigen preparation in American visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; v. 84, n. 2, p. 226-227, 1990.

BADARÓ, R.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; QUEIROZ, A.C.; JONES T.C. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. **Lancet**; v. 22, n.1, p. 647-649, 1986b.

BARÃO, S.C.; CAMARGO NEVES, V.L.F.; RESENDE, M.R.; SILVA, L.J.; Human asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: a seroprevalence study in urban area of low endemicity. Preliminary results. **Am J Trop Med Hyg**; v.77, p. 1051-1053, 2007.

BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E.D.; VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; BARRAL NETTO, M.; RIBEIRO, J.M. Human

immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am J Trop Med Hyg.**; v. 62, n. 6, p. 740-745, 2000.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEM TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D.L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis : powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis . **J Exp Med**; v. 188, p. 19-53, 1998.

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

BERN, C.; AMANN, J.; HAQUE, R.; CHOWDHURY, R.; ALI, M.; KURKJIAN, K.M. et al. Loss of leishmanin skin test antigen sensitivity and potency in a longitudinal study of visceral leishmaniasis in Bangladesh. **Am J Trop Med Hyg Oct.**; v. 75, n. 4, p. 744-748, 2006.

BIGLINO, A.; BOLLA, C.; CONCIALDI, E.; TRISCIUOGLIO, A.; ROMANO, A.; FERROGLIO, E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont Region) where such infections are traditionally nonendemic. **J Clin Microbiol**; v. 48, p. 131–136, 2010.

BITTAR, R.C.; NOGUEIRA, R.S.; VIEIRA-GONÇALVES, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; MATTOS, M.S.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**; v. 102, n. 5, p. 625-630, 2007.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, Ministério da Saúde, p. 122, 2014.

BRODIE, T.M.; SMITH, M.C.; MORRIS, R.V.; TITUS R.G. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein Maxadilan on mouse macrophages. **Infect Immun**; v. 75, p. 2359–2365, 2007.

BRUSTOLONI, Y.M.; CUNHA, R.V.; CÔNSOLO, L.Z.; OLIVEIRA, A.L.; DORVAL, M.E.; OSHIRO, E.T. Treatment of visceral leishmaniasis in children in the Central-West Region of Brazil. **Infection**; v. 38, n. 4, p. 261-267, 2010.

BURS, J.M, J.R.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARO, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci USA**.; v. 90, n. 2, p.775-779, 1993.

BUCHETON, B.; EL SAFI, S.H.; HAMMAD, A.; KHEIR, M.M.; EUDES, N.; MIRGANI, A.; DESSEIN, A.J.; MARY, C. Antileishmanial antibodies in an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan: high antibody responses occur in resistant subjects and are not predictive of disease. **Trans R Soc Trop Méd Hyg**; v. 97, p. 463-468, 2003.

CABELLO, P.H.; LIMA, A.M.; AZEVEDO, E.S.; KRIEGER, H. Familial aggregation of *Leishmania chagasi* infection in northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**; v. 52, n.4, p.364-365, 1995.

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

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

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; PEDRAL SAMPAIO, D.; BARRAL NETTO, M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; et al. Immunologic makers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **J Infect Dis**; v. 165, n. 3, p. 535-40, 2012..

CAVALCANTE, R.R.; PEREIRA, M.H.; GONTIJO, N.F. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. **Parasitol**; v. 127, p. 87-93, 2003.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**; v.5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHARLAB, R.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Exp Parasitol**; v.95, n.1, p.45-53, 2000.

COSTA, C.H.; STEWART, J.M.; GOMES, R.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.; BOZZA, M, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 66, n. 4, p. 334-337, 2002.

COTA; G.; SOUSA, M.R.;RABELLO, A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-infected patients: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis.**; v. 5, n. 6, p. 823-829, 2011.

CRESCENTE, J.A.; SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; GOMES, C.M.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 103, n. 12, p. 1250-1256, 2009.

CROSS, M.L.; CUPP, M.S.; CUPP, E.W.; RAMBERG, F.B.; ENRIQUEZ, F.J. Antibody responses of Balb/c mice to salivary antigens of hematophagous blaesid flies (diptera: simuliidae). **J Med Entomol.**; v. 30, p. 725-734, 1993.

DANTAS-TORRES. F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop.**; v. 39, n. 4, p. 39-44, 2006.

DAS, V.N.; SIDDIQUI, N.A.; VERMA, R.B.; TOPNO, R.K.; SINGH, D.; DAS, S. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to kala-azar elimination programs. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg.**; v. 105, p. 661–666, 2011.

DE ALMEIDA S.L.; ROMERO, H.D.; PRATA, A.; COSTA, R.T, NASCIMENTO, E.; CARVALHO, S.F. Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 75, n. 4, p. 739-743, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**; v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

D'OLIVEIRA.; JUNIOR, A.; COSTA, S.R.; BARBOSA, A.B.; ORGE, M.S.L.G.; CARVALHO, E.M. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**; v. 92, n.1 p. 15-20, 1997.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; SOUSA, A.Q.M.; PEARSON, R.D. Short report: extended follow-up of the natural history of persons infected with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.** v. 53, n. 4, p. 360-361, 1995.

FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G.R.; ASGARI, Q.; KALANTARI, M.; MOHEBALI, M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible

reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. **An Trop Med Parasitol.** v. 102, p. 577–583, 2008.

FEDERICO, G.; DAMIACO, F.; CALDAROLA, G.; FANTINI, C.; FIOCCHI, V. A seroepidemiological survey on *Leishmania infantum* infection. **Eur J Epidemiol.** v.7, p.380-383,1991.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; ORGE, G.; CHENG, L.H.; DE CARVALHO, L.P.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Vaccine.**; v.31, n. 20, p.1365-1368, 2002.

FRANÇA, A.D.E.; DE CASTRO, V.L.; LIMA, M.S.; PONTES, E.R.; DORVAL, M.E. Anti-*Leishmania* antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. **Transfus Apher Sci.**; v. 49, n. 3, p. 627-630, 2013.

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

GARROTE, J.I.; GUTIÉRREZ, M.P.; IZQUIERDO, R.L.; DUEÑAS, M.A.; ZARZOSA, P.; CAÑAVATE, C. E.; BALI, M.; ALMARAZ, A.; et al. Seroepidemiologic study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon, Spain. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 71, n. 4, p. 403-406, 2004.

GHOSH, K.N.; MUKHOPADHYAY, J. The effect of anti-sand fly antibodies *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. **Int J Parasitology.**; v.28, p.275-281, 1998.

GIDWANI, K.; RAI, M.; CHAKRAVARTY, J.; BOELAERT, M.; SUNDAR, S. Evaluation of leishmanin skin test in indian visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 80, n. 4, p. 566, 2009.

GIUDICE, A.; VENDRAME, C.; BEZERRA, C.; CARVALHO, L.P.; DELAVECHIA, T.; CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infect Dis.**; v.29, n. 12, p. 75, 2012.

GOUVEA, M.V.; WENECK, G.L.; COSTA, C.H, D.E.; AMORIM.; CARVALHO, F.A. Factors associates to Montenegro skin test positivity in Teresina, Brazil. **Acta Trop.**; v. 104, n. 2-3, p. 99-107, 2007.

GOMES, R.B, MENDONCA, I.L, SILVA, V.C. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cercocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; v. 101, p. 127–133, 2007;

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol.**; v. 7, n. 3, p. 338-49, 2004.

GRIMALDI, G, J.R.; DAVID, J.R, MAHON PRATT, D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 36, n. 2, p. 270-287, 1987.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis.**; v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

HAILU, A.; MENON, J.N.; BERHE, N.; GEDAMU, L.; HASSARD, T.H.; KAGER, P.A. et al. Distinct immunity in patients with visceral leishmaniasis from that in subclinically infected and drug-cured people: implications for the mechanism underlying drug cure. **J Infect Dis.**; v.184, n.1, p.112-115, 2001.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet.**; v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

IBGE. Censo Demográfico 2010, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2010.

IBRAHIM, M.E.; LAMBOSN, B.; YOUSIF, A.O.; DEIFALLA, N.S.; ALNAIEM, D.S.; ISMAIL, A, et al. Kalaazar in a high transmission focus: an ethnic and geographic dimension. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 61, n.6, p.941-4, 1999.

JERONIMO, S.M.; TEIXEIRA, M.J.; SOUSA, A.; THIELKING, P.; PEARSON, R.D.; EVANS, T.G. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. **Clin infect Dis.**; v. 30, n.3, p.608-609, 2000.

JERONIMO, S.M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R.F.; CHENG, C.; MONTENEGRO, G.R.; NASCIMENTO, E.T. et al. Na emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand J Infect Dis.**; v. 36, n.6-7, p.443-449, 2004.

JERONIMO, S.M.; HOLST, A.K.; JAMIESON, S.E.; FRANCIS, R.; MARTINS, D.R.; BEZERRA, F.L. et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. **Genes Immun.**; v.8, n.7, p.539-551, 2007.

KAFETZIS, D.A.; MALTEZOU, H.C. Visceral leishmaniasis in paediatrics. **Curr Opin Infect Dis.**; v.15, n.3, p.289-294, 2012.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.**; v.9, n.8, p.604-615, 2011.

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

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J Immunol.**; v. 166, p.1141-1147, 2001.

KUBAR, J.; QUARANTA, J.F.; MARTY, P.; LELIÈVRE, A.; LE FICHOUX, Y.; AUFEUVRE, J.P. Transmission of *L. infantum* by blood donors. **Nat Med.**; v.3, n.4, p. 368, 1997.

KUMAR, R.; PAI, K.; PATHAK, K.; SUNDAR, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol.**; v. 8, n. 6, p. 1220-1224, 2001.

KYRIAKOU, D.S.; ALEXANDRAKIS, M.G.; PASSAM, F.H.; KOURELIS, T.V.; FOUNDOULI, P.; MATALLIOTAKIS, E.; MANIATIS, A.N. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is pre storage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? **Transfus Med.**; v.13, p.59-62, 2003.

LANGE, C.; MORI, T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. **Respirology.**; v.15, n.2, p.220-240, 2010.

LE FICHOUX, Y.; QUARANTA, J.F.; AUFEUVRE, J.P.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **J Clin Microbiol.**; v.37, p.1953-1957, 1999.

LERNER, E. A, RIBEIRO, J.M.C, NELSON, R.J. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J of Biological Chemistry.**; v. 266, p. 11234-11236, 1991

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

LIMA, I.D.; QUEIROZ, J.W.; LACERDA, H.G.; QUEIROZ, P.V.S.; PONTES, N.N.; BARBOSA, J.D.S.; MARTINS, D.R.; WEIRATHER, J.L.; PEARSON, R.D.; WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.B. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. **Am J Trop Med Hyg.**; v.86 n.1, p. 99-107, 2012.

MARQUES, L.H.S., GOMES, L.I., ROCHA, I.C.M. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PloS Negl Trop Dis.**; v.6, n.12, p.1955. 2012.

MARY, C.; FARAUT, F.; DROGOUL, M.P., XERIDAT, B., SCHLEINITZ, N., CUISENIER, B.; DUMON, H. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. **Am J Trop Med Hyg.**; v.75, p.858-863, 2006.

MARTIN-SANCHEZ, J.; LOPEZ-LOPEZ, M.C.; ACEDO-SANCHEZ, C.; CASTRO-FAJARDO, J.J.; PINEDA, J.A.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. **Parasitol.**; v.122, p.607-615, 2001.

MATHEWS, G.V.; SIDJANSKI, S.; VANDERBERG, J.P. Inhibition of mosquito salivary gland apyrase activity by produced in mice immunized by bites of *Anopheles stephensi* mosquito. **Am J Trop Med Hyg.**; v.55, p.417-423, 1996.

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. Informe epidemiológico das leishmanioses nº 1/2015. Campo Grande, MS, 2015.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today.**; v.16, n.5, p.188-189. 2000

MBOW, M.L.; BLEYENBERG, J.A.; HALL, L.R.; TITUS, R.G. *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.**; v.161, p.5571-5577, 1998.

MORRIS, R.V.; SHOEMAKER, CB.; DAVID, J.R.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **J Immunol.**; v.167, p. 5226-5230, 2001.

MORENO, E.C.; MELO, M.N.; GENARO, O.; LAMBERTUCCI, J.R.; SERUFO, J.C.; ANDRADE, A.S.R. et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Rev Soc Bras Med Trop.**; v.38, p.460-463, 2005.

MOHAPATRA, T.M.; SINGH, D.P.; SEN, M.R.; BHARTI, K.; SUNDAR, S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries.**; v. 4, n. 2, p. 114-117, 2010.

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

MURRAY, H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. **Int J Infect Dis.**; v. 4, p.158-177, 2000.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVI, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.**; v.366, p.1561-1577, 2005.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; SOUSA, E.C.; SILVA, L.M.; LEAL, P.C.; CANTANHEDE, K.L.; BEZERRA, G.F.B. et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rk39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cad Saúde Públ.**; v.21, p.1801-1807, 2005.

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

NORONHA, F.S.; NUNES, A.C.; SOUZA, K.T.; MELO, M.N.; RAMALHO-PINTO FJ. Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. **Acta Trop.**; v. 69, p.17-29, 1998.

NORSWORTHY, N.B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infect Immun.**; v. 72, n. 3, p. 1240-1247, 2004.

NUNES, A.C.; RAMALHO-PINTO, F.J. Complement resistance of *Leishmania amazonensis* promastigotes is independent of parasite proteases and lysis of sensitive forms is not due to natural antibodies in normal human serum. **Braz J Med Bio Res.**; v.29, p.1633-1640, 1996.

OLIVEIRA, A.L.L.; PANIAGO, A.M.M.; DORVAL, M.C.E.; OSHIRO, E.T.; LEAL, C.R.; SANCHES, M.; et al. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. **Rev Soc Bras Med Trop.**; v. 39, p. 446-450, 2006.

OLIVEIRA, F.; TRAORÉ, B.; GOMES, R.; FAYE, O.; GILMORE, D.C.; KEITA, S.; TRAORÉ, P.; TEIXEIRA, C. et al. Delayed-type hypersensitivity to sand fly saliva in humans from a leishmaniasis-endemic area of Mali is Th1-mediated and persists to midlife. **J Invest Dermatol.**; v.133, n.2, p. 452-459, 2013.

OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, A.; DORVAL, M.E.; ALVES, T.P.; FERNANDES, T.D.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.L. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Rev Soc Bras Med Trop.**; v. 43, n.2, p.188-93, 2010.

PAI, M.; ZWERLING, A.; MENZIES, D. Systematic Review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. **Ann Intern Med.**; v.5, n.3, p.177-84. 2008.

PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR, P.E.; PLACA, M.; BORGATTI, M.A.; MUSUMECI, S. Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; v. 69, n. 1, p. 60-68, 1975.

PAPADOPOULOU, C.; KOSTOULA, A.; DIMITRIOU, D.; PANAGIOU, A.; BOBOJIANNI, C.; ANTONIADES, G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. **J Infect.**; v.50, n. 1, p. 53-60, 2005.

PASTORINO, A.C.; JACOB, C.M.; OSELKA, G.W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **J Pediatr.**; v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PATTABHI, S.; WHITTLE, J.; MOHAMATH, R.; EL-SAFI, S.; MOULTON, G.G.; GUDERIAN, J.A.; COLOMBARA, D.; ABDOON, A.O. et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.**; v. 4, n. 9, p. 822, 2010.

PENG, Z.; SIMONS, F.E. A prospective study of naturally acquired sensitization and subsequent desensitization to mosquito bites and concurrent antibody responses. **J. Allergy Clin. Immunol.**; v.101, p.284, 1998.

PINEDA, J.A.; MACIAS, J.; MORILLAS, F.; FERNANDEZ-OCHOA, J.; CARA, J.; DE LA, R.R. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluents. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; v. 95, n. 2, p. 173-174, 2001.

PRATES, D.B.; SANTOS, L.D.; MIRANDA, J.C. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. **J. Med. Entomol.**; v. 3, p. 409-413, 2008.

QUEIROZ, M.J.; ALVES, J.G.; CORREIA, J.B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **J Pediatr.**; v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

REED, S.G.; BADARO, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E.M.; LORENCO, R.; LISBOA, A.; et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.**; v.35, n.1, p.79-85, 1986.

REED, S.G. Diagnosis of leishmaniasis. **Clin Dermatol.**; v.14, n.5, p.471-478, 1996.

REZAI, H.R.; ARDEHALI, S.; GETTNER, S. Anti-leishmania activity of normal animal sera. **Ann Trop Med Parasitol.**; v. 69, p.29-33, 1975.

REUNALA, T.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; PALOSUO, K.; MIYANJI, M.; RUIZ-MALDONADO, R.; LOVE, A. et al. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. **Int Arch Allergy Immunol.**; v.104, p. 366-371, 1994.

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

RIBEIRO, J.M.C; FRANCISCHETTI, I.M.B. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. **Annual Rev of Entomol.**; v. 48, p. 73-88, 2003.

RIERA, C.; FISA, R.; UDINA, M.; GALLEGO, M.; PORTUS, M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Trans Soc Trop Med Hyg.**; v.98, n.2, p.102-110, 2004.

RIERA, C.; FISA, R.; LOPEZ-CHEJADE, P.; SERRA, T.; GIRONA, E.; JIMENEZ, M.; et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). **Transfusion.**; v. 48, n.7, p.1383-1389, 2008.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol.**; v. 2, p. 845-858, 2002.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **J Exp Med.**; v.173, n. 1, p. 49-54, 1991.

SCARLATA, F.; VITALE, F. Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; v. 102, p.394-396, 2008.

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

SCHENKEL, K.; RIJAL, S.; KOIRALA, S.; VANLERBERGHE, V.; VAN DER STUYFT, P.; GRAMICCIA, M.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis in southeastern Nepal: a cross-sectional survey on *Leishmania donovani* infection and its risk factors. **Trop Med Int Health.**; v. 11, n. 12, p. 1792-1799, 2006.

SIDDIG, M.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, D.C.; PETERSEN, E.A. Visceral leishmaniasis in the Sudan comparative parasitological methods of diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; v.82, n.1, p.66-68, 1988.

SILVA, L.A., ROMERO, H.D., NASCENTES, G.A.N. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**; v.84, n.2, p.261-266. 2011.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CRESCENTE, J.A.; DE SOUZA, A.A.; CAMPOS, M.B.; GOMES, C.M.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; v.104, p.529-535, 2010.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; PEREIRA, E.A, DE SOUZA A.A.; CAMPOS, M.B.; CHAGAS, E.J.; et al. A longitudinal study on the transmission dynamics of human *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil, with special reference to its prevalence and incidence. **Parasitol.**; v.104, n.3, p.559-567, 2009.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J Med.**; v.123, n.3, p.311-330, 2006.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J Postgrad Med.**; v. 49, n.1, p.55-60, 2003.

SOARES, M.B.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; 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.**; v.160, n. 4, p. 1811-1816, 1998.

SOUHAILA, M.A.; KHAWLA, H.Z.; KHITAM, Y.A.D. Indirect fluorescent antibody test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: an epidemiological study in Iraq. **J Univ Anbar Pure Sci.**; v.4, p.10, 2010.

SRIVASTAVA, P.; ANAND, D.; SANJANA, M.; SHYAM, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; v.105, n.1, p.1–6, 2011.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol.**; v. 9, n.5, p.951-958, 2002.

SUNDAR, S.; SAHU, M.; MEHTA, H. Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a Kala-azar referral unit. **Clin Infect Dis.**; v. 35, p.581-586, 2003.

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

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M.C. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science.**; v.239, p. 1306-1308, 1988.

TRUJILLO, C.; RAMÍREZ, R.; VÉLEZ, I.D.; BERBERICH, C. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunol Lett.**; v. 1, n. 3, p. 203-209, 1999.

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

VEEKEN, H.; RITMEIJER, K.; SEAMAN, J.; DAVIDSON, R. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. **Trop Med Int Health.**; v.8, n. 2, p. 164-167, 2003.

VIANA, L.G.; ASSIS, T.S.M.; ORSINI, M.; SILVA, A.R.; SOUZA, G.F.; CALIGIORNE, R.; et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg.**; v.102, p.548–555, 2008.

VOLF, P.; TESAROVÁ, P.; NOHYNKOVÁ, E. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. **Med Vet Entomol.**; v. 14, p. 251-256, 2000.

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**; v. 345, n. 1312, p. 223-230, 1994.

WERNECK, G.L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica.**; v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WHO, World Health Organization, 2014. Leishmaniasis. Situation and trends. Available on: <[www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/index.html](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html)>. Accessed in: August, 2014.

ZIJLSTRA, E.E.; ALI, M.S.; EL-HASSAN, A.M.; EL-TOUM, I.A.; SATTI, M.; GHALIB, H.W.; KAGER, P.A. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Trans R Trop Med Hyg.**; v. 86, n. 5, p. 505-507, 2002.

**ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -  
UFMS**



**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS**



*Carta de Aprovação*

O protocolo nº 2173 CAAE 0250.0.049.000-11 do Pesquisador Thiago Leite Fraga intitulado "Exposição humana à saliva de *Lutzomyia longipalpis* e ao parasito *Leishmania SP* em área endêmica de Leishmaniose Canina", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram revisados por este Comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 27 de outubro de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde e com o GCP.

Edilson dos Reis

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 3 de novembro de 2011.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>  
[bioetica@propp.ufms.br](mailto:bioetica@propp.ufms.br)  
fone 0XX67 345-7187