



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Prevalência da infecção por *Leishmania donovani* a partir do ELISA com antígenos rK39, rK26 e intradermorreação de Montenegro

Vivian Moana de Araujo Viana

Salvador (Bahia), 2013

Ficha catalográfica
SIBI/Biblioteca Gonçalo Muniz: Memória da Saúde Brasileira

Vivian, Vivian Moana de Araujo
V654 Prevalência da infecção por *Leishmania donovani* a partir do ELISA com antígenos rK39 e rK26 e intradermorreação de Montenegro/ Vivian Moana de Araujo Viana – Salvador: 2013.

32 p.

Anexos

Orientador: Prof. Roberto José da Silva Badaró
Orientadora tutora: Zuinara Pereira Gusmão Maia
Monografia (Conclusão de Curso) Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, 2013.

1. Leishmania; 2. Técnicas Imunológicas; 3. Epidemiologia.

CDU: 616.9:606



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Prevalência da infecção por *Leishmania donovani* a partir do ELISA com antígenos rK39, rK26 e intradermorreação de Montenegro

Vivian Moana de Araujo Viana

Professor orientador: **Roberto José da Silva Badaró**
Orientadora tutora: **Zuinara Pereira Gusmão Maia**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia), 2013

Monografia: *Prevalência da infecção por Leishmania donovani a partir do ELISA com antígenos rK39, rK26 e intradermoreação de Montenegro.*

Vivian Moana de Araujo Viana

Professor orientador: **Roberto José da Silva Badaró**

Orientadora tutora: **Zuinara Pereira Gusmão Maia**

COMISSÃO REVISORA

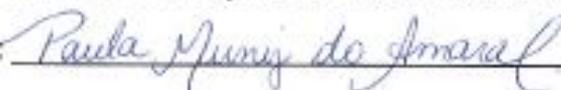
- **Roberto José da Silva Badaró** (Presidente), Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: _____



- **Paula Muniz do Amaral**, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: _____



TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ____ de _____ de 20__

EQUIPE

- **Vivian Moana de Araujo Viana**, Estudante de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Eduardo Sonival Barros Muniz**, Estudante de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Larissa Gonçalves Oliveira**, Estudante de Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.
- **Maria Setsuko Nakatani de Jesus**, Bioquímica do Laboratório de Medicina Tropical do Hospital Universitário Professor Edgard Santos.
- **Carlos Maurício Cardeal Mendes**, Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Zuinara Pereira Gusmão Maia**, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Roberto José da Silva Badaró**, Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina na Bahia da Universidade Federal da Bahia.

FONTE FINACIADORA**FAPESB**

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS

- Laboratório de Medicina Tropical

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS | 3 |
| I. RESUMO | 4 |
| II. OBJETIVOS | 5 |
| II.1 PRINCIPAL | 5 |
| II.2 SECUNDÁRIOS | 5 |
| III FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 6 |
| III.1 INTRODUÇÃO | 6 |
| III.2 PANORAMA DA LEISHMANIOSE VISCERAL | 6 |
| III.3 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE VISCERAL | 7 |
| III.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL | 9 |
| III.4.1 DEMONSTRAÇÃO DIRETA DO PARSITO | 9 |
| III.4.2 TESTES IMUNOLÓGICOS | 10 |
| III.4.2.1 DETECÇÃO DE ANTICORPOS | 10 |
| III.4.2.1.1 Teste de aglutinação direta | 10 |
| III.4.2.1.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) | 11 |
| III.4.2.1.3 Reações imunoenzimáticas | 11 |
| III.4.2.1.4 Testes imunocromatográficos | 12 |
| III.4.2.2 DETECÇÃO DE ANTÍGENOS | 13 |
| III 4.2.3 TESTES INTRADÉRMICOS | 13 |
| IV METODOLOGIA DA PESQUISA | 14 |
| IV.1 DESENHO DO ESTUDO | 14 |
| IV.2 AMOSTRAGEM E AMOSTRA | 14 |
| IV.3 COLETA DE AMOSTRA SANGÍNEA E APLICAÇÃO DO TESTE DE MONTENEGRO | 14 |
| IV.4 INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO DE MONTENEGRO | 15 |
| IV.5 TESTES SOROLÓGICOS ELISA INDITETO COM OS ANTÍGENOS | 15 |

| | |
|--|-----------|
| rK39 E Rk26 | |
| IV.6 INTERPRETAÇÃO DO ELISA INDIRETO | 15 |
| IV.7 ANÁLISE ESTÁTICA | 16 |
| IV.8 QUESTÕES ÉTICAS | 16 |
| V RESULTADOS | 17 |
| VI DISCUSSÃO | 19 |
| VII. CONCLUSÕES | 21 |
| VIII. SUMMARY | 22 |
| IX. REFERÊNCIAS | 23 |
| X ANEXOS | 26 |
| • ANEXO 1- Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa | 27 |
| • ANEXO 2 – Questionário utilizado no inquérito | 28 |
| • ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 29 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Tabela | Título | Página |
|-------------------|--|---------------|
| 1 | Coefficiente de Prevalência de infecção por faixa etária dos indivíduos residentes em Pé de Areia, 2010. | 19 |
| Figura | | |
| 1 | Algoritmo de identificação da infecção por <i>Leishmania</i> sp. em indivíduos residentes em Pé de Areia, 2010. | 18 |
| 2 | Prevalência de infectados por <i>Leishmania</i> sp. sugerida pelo ELISA-rK39, ELISA-rK26, e/ou IDRM em indivíduos residentes em Pé de Areia, 2010. | 19 |

I RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, considerada uma doença negligenciada pela OMS, tem se disseminado rapidamente na Bahia por conta do processo de urbanização. O município de Camaçari, localizado na região metropolitana de Salvador-Bahia, tem se mostrado como área endêmica da doença. Portanto, torna-se essencial obter informações acerca da distribuição da infecção por *Leishmania* sp. para o fornecimento de subsídios para o controle dessa epidemia pela comunidade local.

OBJETIVOS: 1) identificar a prevalência da infecção por *Leishmania donovani* sugerida pelo ELISA com antígenos rK39 e rK26 e/ou intradermoreação de Montenegro, em indivíduos residentes em Pé de Areia, município de Camaçari; 2) descrever o perfil demográfico dos indivíduos incluídos no estudo; 3) fornecer pressupostos para as autoridades locais para a adoção de medidas preventivas de controle da infecção por *Leishmania* sp na comunidade estudada.

METODOLOGIA: Realizou-se um inquérito sorológico entre janeiro e fevereiro de 2011 em 206 indivíduos residentes em Pé de Areia, município de Camaçari-BA para pesquisa de anticorpos contra *Leishmania donovani*. Como instrumentos, adotou-se o ELISA-indireto com antígenos rK-39 e rK-26, e a intradermoreação de Montenegro (IDRM) com solução de leishmanina de *L. amazonensis*.

RESULTADOS: Cerca de 51% dos indivíduos apresentaram positividade em algum dos testes realizados; o coeficiente de prevalência de infecção foi maior no grupo de indivíduos com idade ≤ 17 anos; O ELISA com rK26 se sobressaiu na identificação sugestiva de indivíduos com infecção por *Leishmania* sp.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO: a alta prevalência da infecção por *Leishmania* sp. em Pé de Areia nos induz a classificá-la como novo foco epidêmico; a faixa etária mais acometida pela infecção foram indivíduos jovens; o ELISA com rK39 e rK26 mostraram-se boas ferramentas para inquéritos sorológicos; esse trabalho teve um impacto positivo em Pé de Areia uma vez que permitiu identificar focos sugestivos de infecção.

PALAVRAS CHAVES: Leishmania, Técnicas Imunológicas, Epidemiologia.

II OBJETIVOS

II.1 PRINCIPAL

Identificar a prevalência da infecção por *Leishmania donovani* sugerida pelo ELISA com antígenos rk39 e rk26 e intradermoreação de Montenegro em indivíduos residentes em Pé de Areia, município de Camaçari, região metropolitana de Salvador-BA.

II.2 SECUNDÁRIOS

1. Descrever o perfil demográfico dos indivíduos incluídos no estudo;
2. Fornecer pressupostos para as autoridades locais para a adoção de medidas preventivas de controle da infecção por *Leishmania* sp na comunidade estudada.

III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

III.1 Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar é uma protozoonose causada por espécies do complexo *Leishmania donovani*. A *Leishmania infantum* (denominada *Leishmania chagasi* na América Latina) é uma espécie predominante na Europa, Norte da África, América do Sul e América Central, enquanto que a *L. donovani* prevalece no Leste da África, Índia e Oriente Médio (18, 20, 29). Existem dois tipos de LV. A primeira, zoonótica, ocorre nas áreas onde o agente etiológico é a *Leishmania infantum* (ou *Leishmania chagasi*) e sua transmissão se dá do animal reservatório para o vetor e deste para o homem. A segunda, antroponótica, é transmitida do homem para o vetor e deste para o homem e prevalece nas áreas afetadas pela *L. donovani*. (14)

A LV era caracterizada como uma doença eminentemente rural, porém mais recentemente tem atingido áreas urbanas de médio e grande porte, caracterizando-se como um problema de saúde pública no nosso país e em outras áreas do continente americano. Na área urbana, a principal fonte de infecção é o cão (*Canis familiaris*). (21) É uma zoonose típica das áreas tropicais, onde os insetos dos gêneros *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo são os documentados vetores que transmitem a doença ao homem. (2)

As leishmânias são parasitas intracelulares obrigatórios que residem na forma de amastigotas dentro do sistema fagocítico mononuclear - sobretudo nas células de Kupffer do fígado, células reticulares e macrófagos do baço, medula óssea e dos linfonodos - dos mamíferos suscetíveis (ex: homem). No trato digestivo dos vetores invertebrados, os flebotomos, as leishmânias se desenvolvem até atingirem a sua forma flagelada denominada promastigota. (2)

III.2 Panorama da Leishmaniose Visceral

A LV é considerada uma doença negligenciada pela OMS e sua incidência global é estimada em 200.000 a 400.000 casos por ano. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sul do Sudão, Etiópia e Brasil. (1)

No Brasil, os primeiros casos de leishmaniose visceral foram identificados por Penna em 1934 (25). Atualmente, a LV é uma doença endêmica, embora haja surtos frequentes, e está presente em 21 estados e 5 regiões brasileiras. No período entre 2006 e 2010, foram

registrados 18.168 casos de LV no país e em 2011 a incidência da doença foi de 2,0 casos por 100.000 habitantes. Em 2010, a região Nordeste representou 47,1% dos casos, seguidas pelas regiões Norte (10,8%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%). (22)

A migração e o processo de urbanização são os principais fatores de risco para a expansão da LV, tornando esta zoonose um crescente problema de saúde pública em diversos locais do mundo. Grandes cidades brasileiras, tais como: Fortaleza, Jacobina, João Pessoa, Natal, Petrolina, São Luís, Sobral, Teresina e, mais recentemente, Salvador têm sido afetadas pela doença. (30) Na Bahia a doença era restrita à região central do estado, Chapada Diamantina, até os anos 60. A partir daí espalhou-se rapidamente, atingindo regiões costeiras e periferia das grandes cidades, locais onde *a priori* eram considerados inadequados para a distribuição do vetor *Lu. longipalpis*. (25) Em 1991, Cunha e cols. identificaram um novo foco de LV em Monte Gordo, distrito pertencente ao município de Camaçari, e sua expansão para a área metropolitana. Após esse estudo, outros casos foram identificados próximos a Salvador – Lauro de Freitas, Barra do Jacuípe e Areia, com casos suspeitos em Itapuã. (15)

III.3. Formas clínicas da Leishmaniose Visceral

A infecção pelo *L. donovani* pode gerar três tipos de resposta no organismo parasitado: 1) reação local com destruição do parasito fagocitado; 2) fagocitose por histiócitos e interação parasito-hospedeiro com persistência do parasito no organismo de forma latente e por tempo indeterminado – infecção assintomática; 3) fagocitose e multiplicação dos parasitos dentro dos macrófagos com disseminação para o sistema mononuclear fagocitário, determinando, na dependência de fatores de risco associados, um espectro de doença variável, que vai de formas subclínicas (oligossintomáticas) até a síndrome completa ou calazar propriamente dito – forma clássica. (2)

Dessa forma, indivíduos que apresentam anticorpos contra *Leishmania* spp. podem ser divididos em quatro grupos de acordo com a sua evolução clínica: i) um grupo que permanece assintomático (23.2%), ii) outro que desenvolve a doença dentro de semanas após a detecção da infecção pela sorologia (17.4%), iii) um terceiro que desenvolve a forma subclínica da doença evoluindo em seguida para a doença (média de cinco meses) (15.1%) e iv) um último grupo que desenvolve a forma subclínica, porém resolvem os sintomas espontaneamente após um período prolongado (média de 35 meses). (3)

Vários estudos têm documentado que a maioria dos indivíduos que vivem em área endêmica apresenta evidências de infecção pelo *L. donovani* - sorologia positiva ou teste

intradérmico reator – sem história de doença clínica aparente, caracterizando uma infecção assintomática. (2)

Indivíduos com o calazar clássico apresentam, após um período de incubação que dura em torno de 2 a 6 meses, sintomas e sinais de infecção sistêmica persistente (incluindo febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso) e a invasão parasitária do sangue e do sistema retículo-endotelial (em geral o sistema fagocítico), apresentando linfonomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. A febre está comumente associada a calafrios e pode ser intermitente. A fadiga e a fraqueza são agravadas pela anemia, causada pelo estado inflamatório persistente, hiperesplenismo e em alguns casos por sangramento. (14)

Com o avanço da doença a esplenomegalia pode agravar-se, causando distensão abdominal e dor, a qual pode ser potencializada por eventual hepatomegalia. Sintomas e sinais de co-infecção bacteriana como pneumonia, diarreia ou tuberculose pode confundir o quadro clínico no momento do diagnóstico inicial. Os doentes frequentemente aguardam semanas a meses para procurar assistência médica, podendo vir a óbito por co-infecção bacteriana, sangramento maciço ou anemia severa. (14)

Existe também a forma aguda disentérica da leishmaniose visceral com uma grande semelhança no quadro séptico, com febre alta, tosse e diarreia acentuada. As alterações hematológicas são discretas e a hepatoesplenomegalia não é expressiva; muitas vezes o fígado é de tamanho normal e o baço não ultrapassa 5 cm de megalia. A história, mesmo imprecisa, não ultrapassa dois meses de evolução. Confunde-se com febre tifóide, malária, esquistossomose mansônica, doença de Chagas aguda, toxoplasmose aguda, histoplasmose e outras doenças febris agudas que cursam com hepatoesplenomegalia. A característica marcante é a elevação de globulinas com grande quantidade de anticorpos específicos IgM e IgG anti-leishmânia. O encontro de parasito no mielograma não é tão habitual como nos casos de calazar clássico, apesar de um intenso parasitismo esplênico e hepático. (2)

A forma subclínica ou oligossintomática da leishmaniose visceral está bem elucidada na literatura e caracteriza-se por sintomas inespecíficos, tais como mal-estar, febre baixa, diarreia, adinamia e tosse intermitentes associados a hepatomegalia discreta e esplenomegalia eventual.(3) Essa é a forma mais frequente da doença em áreas endêmicas. (2) A desnutrição é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doença potencialmente fatal. Observou-se níveis elevados de desnutrição pré-infecção em crianças que desenvolveram a forma clássica da doença. Essa relação não foi identificada naquelas que desenvolveram a forma subclínica. (12)

III. 4. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico acurado da LV possui extrema importância no controle e eliminação do parasito. Até muito recentemente, esse diagnóstico era complexo e invasivo (exame microscópico direto de aspirado de baço, linfonodos ou medula óssea), porém o avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas capazes de avaliar de maneira eficiente a presença da doença, e subsidiar estratégias racionais de controle. (27)

Como a apresentação clínica da LV é pouco específica, os testes confirmatórios são essenciais para identificar os indivíduos que necessitam de tratamento. Esses testes devem possuir alta sensibilidade (>95%), uma vez que a LV é uma condição potencialmente fatal, como também alta especificidade, posto que as drogas utilizadas no tratamento da doença são tóxicas. Idealmente, o teste diagnóstico deve ser capaz de distinguir a doença aguda da infecção assintomática, pois nenhuma droga conhecida atualmente é segura o suficiente para tratar infecções assintomáticas. Além disso, esses testes devem ser simples e acessíveis. (14)

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral se constitui fundamentalmente de três grupos de exames: i) exames parasitológicos - demonstração direta do parasito, isolamento em cultivo *in vitro* (meios de cultivo) e isolamento em cultivo *in vivo* (inoculações animais e xenodiagnóstico); ii) testes imunológicos – teste intradêmico, testes sorológicos e detecção de antígenos por sondas de DNA e PCR; iii) exames complementares - exames hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. (6)

III.4.1 Demonstração direta do parasito

A visualização microscópica das formas amastigotas do parasito em aspirados de linfonodos, medula óssea ou baço é a forma clássica e o padrão-ouro para o diagnóstico da LV (14, 23). Nessa técnica o aspirado de tecido é fixado com álcool absoluto em lâminas de microscopia e prossegue-se a uma coloração por Giemsa. (26)

Na prática médica quando o paciente tem uma suspeita de leishmaniose visceral, para a demonstração direta do parasito procede-se ao aspirado de medula óssea. Fazem-se duas lâminas e o restante do material reserva-se para inoculação em meios de cultivo ou em animais, se disponíveis. Nos pacientes com forma aguda da doença, a positividade no aspirado de medula óssea é de 80-90%. Todavia, nas formas subclínicas é inferior a 10%. A maior positividade é encontrada no aspirado esplênico, que chega até 100%. No sangue periférico a positividade é inferior a 30%, exceto nos pacientes co-infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), onde a positividade é superior a 50%. (6)

A aspiração de medula óssea é uma técnica dolorida, enquanto que a aspiração do baço está associada ao risco de hemorragia fatal em mãos inexperientes. (28) Além disso, a acurácia do exame microscópico é influenciada pela habilidade do técnico de laboratório e da qualidade dos reagentes utilizados. (14)

O cultivo do parasito pode melhorar a sensibilidade na detecção do parasito, porém essa técnica é raramente necessária na prática clínica. Sua utilização fica restrita a situações peculiares: obtenção de parasitos para uso de antígenos no diagnóstico imunológico e identificação de espécie; obter organismos para inoculação em animais experimentais; teste de drogas; suplementar o diagnóstico ou fornecê-lo quando outros métodos falharam. (28)

III.4.2 Testes imunológicos

O imunodiagnóstico da LV é dividido em três categorias: i) detecção de anticorpo; ii) detecção de antígeno, e iii) teste intradérmico. (28)

Os diversos métodos disponíveis para a detecção de anticorpos no soro de pacientes já foram aplicados ao diagnóstico da leishmaniose. Didaticamente podemos dividi-los em dois grupos: testes que utilizam antígenos particulados (parasitos inteiros) – reação de aglutinação direta (DAT) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI); e testes que utilizam extratos ou frações antigênicas específicas – reações imunoenzimáticas (ELISA, Micro-ELISA, Fast-ELISA, Dot-ELISA), testes imunocromatográficos (TRALd, Ensure, Strip tests) e alguns outros testes já em desuso (reação de fixação do complemento, contra-imunoelektroforese e reação de hemaglutinação). (6)

III.4.2.1. Detecção de anticorpo

III.4.2.1.1. Teste de Aglutinação Direta (DAT)

A reação ou teste de Aglutinação Direta é um dos testes mais simples utilizados no diagnóstico da leishmaniose e, assim como o teste imunocromatográfico baseado no antígeno rK39, foi desenvolvido especificamente para utilização em campo. (6, 14) Esse teste é sensível, específico e menos dispendioso. Adiciona-se o azul brilhante de Coomassie a uma preparação de antígenos de promastigotas e prossegue-se à incubação com o soro do indivíduo. A aglutinação é observada após uma noite inteira de incubação. (26) Títulos iguais ou superiores a 1/3.200 é altamente sugestivo de calazar, porém nos títulos positivos e inferiores a esse limite, deve-se criteriosamente afastar reatividades cruzadas com outras doenças, sobretudo doença de Chagas, tuberculose, hanseníase, leishmaniose tegumentar e histoplasmosse. (2) Uma meta-análise de estudos que utilizaram o DAT mostrou uma

sensibilidade de 94.8% (95% intervalo de confiança (IC) 92.7% - 96.4%) e uma especificidade de 85.9% (95% IC, 72.3% – 93.4%) no diagnóstico da LV. (13)

O DAT é mais simples que muitos outros testes, mas requer suprimentos como microplacas e micropipetas, técnicos de laboratório treinados e um controle regular de qualidade. Outras desvantagens são a necessidade de armazenamento dos antígenos a 2-8 °C após descongelamento e um prolongado período de incubação. (14)

III.4.2.1.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A RIFI começou a ser amplamente utilizada no diagnóstico da leishmaniose em 1964. Os promastigotas fixados em lâminas foram os primeiros antígenos utilizados. Entretanto, amastigotas provenientes de fígado e baço de hamsters infectados melhoram a especificidade do teste. (6) A RIFI tem demonstrado boa sensibilidade, porém a necessidade de condições laboratoriais sofisticadas dificultam a sua utilização em campo nas áreas endêmicas. (28)

III.4.2.1.3. Reações imunoenzimáticas

Na década de 1980, os métodos imunoenzimáticos permitiram uma maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico sorológico do calazar com a utilização de extrato contendo antígenos de *Leishmania* sp. O teste de ELISA (*Enzyme Lynked Immunosorbent Assay*) nas versões *Fast-ELISA* ou *Dot-ELISA*, é bastante sensível com os diversos antígenos utilizados. A especificidade está na dependência dos antígenos utilizados. As frações glicoprotéicas são bastante específicas, porém as sensibilidades são inferiores aos extratos de antígenos brutos. Portanto, os testes de ELISA negativos praticamente afastam a possibilidade de calazar se o doente não é portador de SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida). Os títulos são bastante elevados e normalmente estão cinco a 10 vezes maiores que o *cut off* usado nas leituras espectrofotométricas. (2)

Atualmente, antígenos recombinantes definidos como espécie-específicos têm sido utilizados nos testes imunoenzimáticos e testes rápidos *Dip stick*, para diagnóstico de campo. (2) Em 1992, Burns e cols. identificaram uma proteína extremamente sensível e específica no diagnóstico da LV: a proteína recombinante (rK39) que contém 39 aminoácidos que se repetem e que é parte de uma proteína predominante em amastigotas de *L. chagasi*, a LcKin, de 230 kDa. (10). As sensibilidades e especificidades do ELISA-rK39 variam entre os estudos: Badaró e cols. encontraram uma sensibilidade de 99% e especificidade de 100%, no Brasil (1996); Zijlstra e cols. encontraram uma sensibilidade de 93% e especificidade de 80%, no Sudão; no Brasil, Braz. e cols encontraram uma sensibilidade de 94,7% e uma sensibilidade

de 98,2% (2002); Em Bangladesh, Kurkjian e cols. encontraram uma sensibilidade de 97,0% e especificidade de 98,9% (2005) (5, 9, 17, 31).

Verificou-se, no entanto, que o antígeno rK39 é indicado para detectar antígenos circulantes presentes em leishmaniose visceral clinicamente manifesta (doença ativa). Os indivíduos com infecção assintomática eventualmente são negativos. Portanto, anticorpos anti-rK39 presentes no soro de pacientes suspeitos de LV são indicativos de doença em atividade ou replicação de parasitos. (6)

Em 1999, Bathia e cols. clonaram dois outros antígenos da *L. chagasi*: o rK9 e o rK26. (8) Estes antígenos apresentaram elevada sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos específicos no soro de portadores de infecção por *Leishmania* spp. e, por conseguinte, reconheceram anticorpos no soro de pessoas com infecção inaparente. (6) A utilização do antígeno rK26 foi portanto sugerida em conjunto com o rK39 para o diagnóstico efetivo, não invasivo, e acurado da LV (8).

III.4.2.1.4. Testes Imunocromatográficos

Testes utilizando sistemas enzimáticos com proteína A ligada a corantes específicos, têm sido empregados para realização de teste por imunocromatografia ou *Dot*-ELISA em papéis, o que possibilita a utilização destes testes nas áreas endêmicas. (6)

Em 1998, o rK39 foi adaptado para um teste imunocromatográfico denominado TRALd (Teste Rápido Anticorpo *L. donovani*), com sensibilidade e especificidade no campo de 94%. Sundar e cols., 1998, encontraram uma sensibilidade de 100% do TRALd em pacientes com calazar na Índia. (6)

Diversos estudos têm sido realizados no intuito de comparar as diversas ferramentas diagnósticas existentes para a detecção da LV. Uma metanálise recente comparou o teste imunocromatográfico com rK39 e o ELISA-rK39 com as técnicas DAT, RIFI e p-ELISA (ELISA com uma preparação de antígeno promastigota). Concluiu-se que o teste imunocromatográfico com rK39, o ELISA-rK39 e o DAT são as melhores opções para a implementação de um diagnóstico rápido, fácil e eficiente da LV. (19)

Vale ressaltar, contudo, que os testes baseados na detecção de anticorpos possuem algumas limitações no diagnóstico da LV: são incapazes de identificar a recidiva da doença, uma vez que a resposta com anticorpos tende a persistir (embora com níveis mais baixos) após a cura; infecções assintomáticas, com testes sorológicos positivos, são muito comuns em áreas endêmicas. (29)

III.4.2.2. Detecção de antígeno

Os testes para detecção de antígeno também têm sido avaliados e, teoricamente, eles deveriam ser mais específicos que aqueles que detectam anticorpos, uma vez que eles evitam reações cruzadas e podem distinguir infecções ativas de infecções passadas. Além disso, esses testes parecem estar bem relacionados com a resposta ao tratamento (teste de cura) (14). O mais estudado é o teste de aglutinação com látex do Calazar (Katex), que detecta um antígeno da leishmânia na urina de pacientes com LV. (1) No entanto, o Katex ainda deve ser aprimorado. (14)

Devido as limitações inerentes às técnicas de detecção de parasitos, novas abordagens têm sido desenvolvidas desde os anos 80, como a hibridização do DNA. Embora esses métodos tenham uma sensibilidade considerável, o seu uso tem sido embargado na rotina devido a complexidade do processo de hibridização do DNA. (28) O advento da utilização da reação em cadeias de polimerase (PCR) tem permitido a amplificação de DNA e consequentemente viabilizado um instrumento diagnóstico espécie-específico para o diagnóstico das doenças infecciosas. (6) Apesar das altas sensibilidade e especificidade, o teste ainda precisa ser adaptado para campo. Além disso, a demonstração frequente dos testes PCR-positivos em indivíduos infectados assintomáticos em áreas endêmicas impossibilita o uso clínico dessa ferramenta nessas situações. (29) No entanto, é possível que o PCR venha a se constituir num método padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose. (6)

III.4.2.3. Teste intradérmico (reação de Montenegro)

A avaliação da hipersensibilidade retardada de pacientes com leishmaniose é um método simples e bastante útil no diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Contudo, na leishmaniose visceral, a resposta de hipersensibilidade retardada a antígenos de leishmânia é quase sempre negativa na fase aguda da doença e perdura negativa em média até 12 meses após o tratamento. (6)

No contexto da LV, o teste de Montenegro é capaz de detectar exposição à *L. donovani*. Vários estudos têm documentado que a maioria dos indivíduos que vivem numa área endêmica apresenta evidências de infecção pelo *L. donovani* sp., sem história de doença clínica aparente. Esses estudos chamam atenção para a elevada taxa de indivíduos sorologicamente positivos ou reatores no teste intradérmico sem evidências de doença. Pelo menos 30% dos adultos que vivem nas áreas endêmicas têm intradermorreação de Montenegro (IDRM) fortemente positiva sem história de doença prévia. (24)

IV METODOLOGIA DA PESQUISA

IV.1. Desenho do estudo

Este é um estudo de corte transversal realizado na coorte intitulada “Estudo Epidemiológico da Leishmaniose Visceral Humana Assintomática e Sub-Clínica no Município de Camaçari – BA: um modelo de intervenção” atualmente em andamento no Hospital das Clínicas, Salvador-BA, e sob a coordenação de Dr. Roberto Badaró.

IV.2. Amostragem e Amostra

Nesse estudo foram selecionados todos os 206 indivíduos pertencentes e presentes nas 94 residências sorteadas para comporem a pesquisa.

Para definição da amostra de 94 domicílios, assumiu-se uma prevalência esperada de 10% e nível de confiança de 95% para a população de Pé de Areia, que segundo informações da 1ª DIRES (2008) possuía 3.364 habitantes. Por cálculo amostral, obteve-se o valor mínimo do tamanho da amostra (203 indivíduos) para a presente pesquisa. O erro assumido para a prevalência esperada foi 4% acrescida de 20% para possíveis perdas, e o efeito de delineamento 50%.

Para definição das residências utilizou-se progressão geométrica, e a identificação das mesmas se baseou na marcação feita pela SUCAN situadas no acesso principal das residências; todos os indivíduos de cada domicílio sorteado presentes no momento da visita foram convidados a participar da pesquisa; no caso em que não houve o aceite de pelo menos um morador da residência, a mesma foi desconsiderada do estudo, e incluiu-se a residência mais próxima, em caso de igualdade de distâncias, foi considerada a residência à esquerda (definido por sorteio aleatório simples). Ao total, foram entrevistados 206 indivíduos.

IV.3. Coleta de amostra sanguínea e aplicação do teste de Montenegro

Após concordarem com, e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (em anexo), os indivíduos tiveram duas amostras de sangue colhidas (total de 8mL) e/ou se submeteram a intradermoreação de Montenegro (IDRM), entre janeiro e fevereiro de 2011.

As amostras de sangue foram colhidas em tubo vacutainer® por punção venosa periférica, centrifugadas por 10min. a 4000rpm, para então ter o soro alíquotado e armazenado em tubos criogênicos a -20°C para posterior realização de testes sorológicos.

Para a realização do teste de Montenegro foi aplicado 0,1 mL de solução de leishmanina (antígeno de *Leishmania amazonensis*, cepa BA125, 50 μ L/mL) na intraderme do antebraço direito dos indivíduos por meio de seringa de 0,3mL.

IV.4. Interpretação da Reação de Montenegro

Os indivíduos que foram submetidos à Reação de Montenegro foram classificados em reator (induração ≥ 5 mm) ou não reator (induração < 5 mm, ou ausência da mesma). Foram considerados válidos todos os resultados obtidos entre 48hs. e 72hs. da data de aplicação da solução de leishmanina.

IV.5. Testes sorológicos: ELISA-indireto com os antígenos rK39 e rK26

Os níveis de anticorpos IgG anti-rK39 foram determinados pelo ELISA-indireto utilizando-se microplacas de poliestireno sensibilizadas com o antígeno rK39 (50ng/poço). O soro de cada paciente foi diluído em tampão PBS com Tween 20 0,1% e soro de albumina bovina 0,1% na concentração de 1:100 μ L. O mesmo foi feito com os controles negativo e positivo. Foram distribuídos 50 μ L de soro diluído em cada poço numa frequência de: 1 poço para o controle positivo(CP), triplicata para o controle negativo (CN) e em duplicata para cada paciente. As microplacas foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente e em seguida lavadas cinco vezes com tampão PBS com Tween 20 0,05%, pH 7,4, e secadas. Distribuiu-se 50 μ L de conjugado de peroxidase (proteína A) diluído 1:10.000 μ L em cada poço. As microplacas foram incubadas por 20 minutos e em seguida lavadas cinco vezes com tampão PBS com Tween 20 0,05%, pH 7,4, e secadas. Após a secagem, 50 μ L de substrato TMB peroxidase foi acrescentado a cada poço. Estabeleceu-se uma incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, para então distribuir 50 μ L de H₂SO₄ 1N em cada poço para interromper a reação. Para a leitura das microplacas foi utilizado um espectrofotômetro (ELX 800, BIO-TEK Instruments, Inc.) com filtro de absorvância de 450nm.

Os anticorpos IgG anti-rK26 foram determinados pelo ELISA empregando-se o mesmo protocolo utilizado no ELISA-rK39 com a seguinte alteração: as microplacas foram sensibilizadas com o antígeno rK26 na concentração de 200ng/poço.

IV.6. Interpretação do ELISA-indireto

Os indivíduos que foram submetidos a coleta de sangue periférico para realização de ELISA-indireto foram agrupados a partir dos resultados da sorologia em positivos e negativos para cada ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-rK39; e ELISA-rK26) no banco de dados.

A positividade foi definida pela fórmula: densidade óptica do indivíduo/cut off \geq 1,4; a negatividade, como: densidade óptica do indivíduo/cut off $<$ 1,4.

IV.7. Análise estatística

Para a análise descritiva utilizou-se as medidas de tendência central e de dispersão, e coeficiente de prevalência. O banco de dados foi construído no Excel® versão 2007, e a análise foi realizada no referido programa.

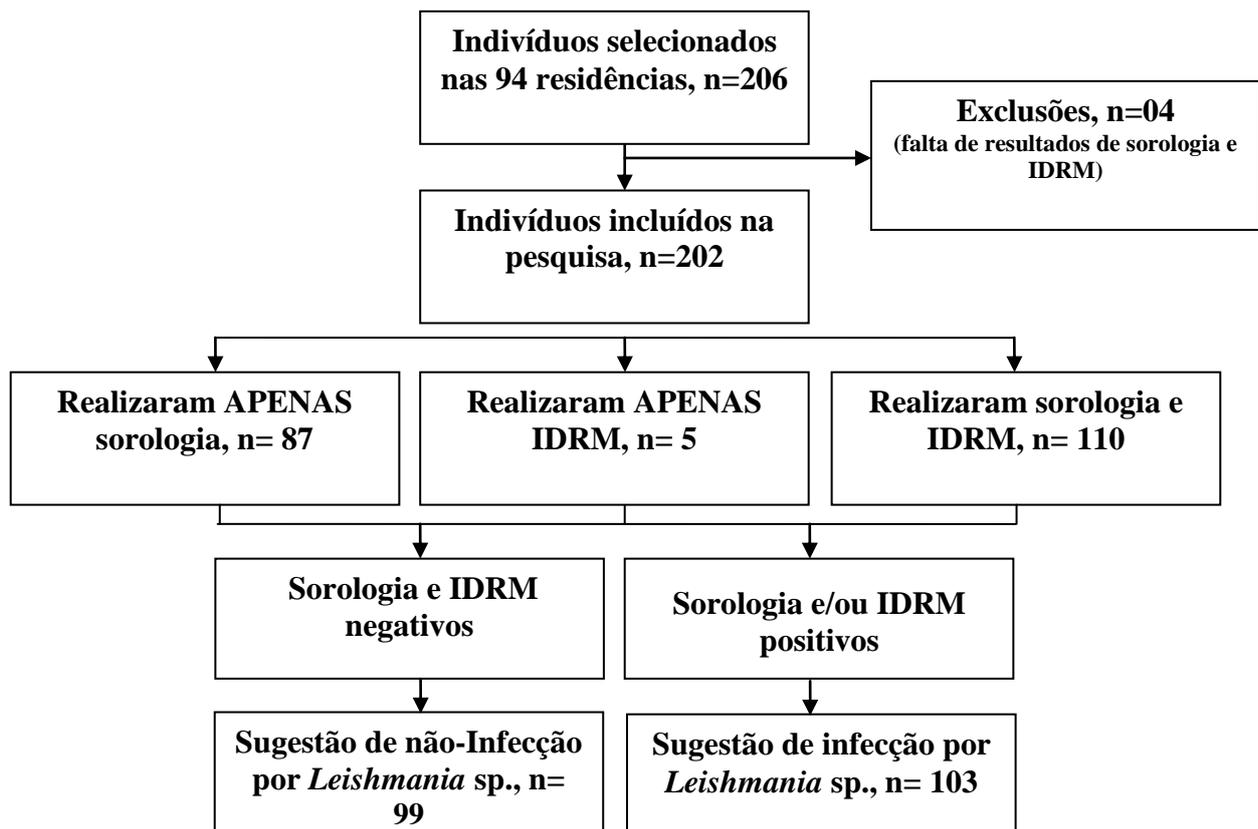
IV.8. Questões éticas

A pesquisa “Estudo Epidemiológico da Leishmaniose Visceral Humana Assintomática e Sub-Clínica no Município de Camaçari – BA: um modelo de intervenção”, a qual este estudo pertence, apresenta registro 034/2008 no Comitê de Ética em Pesquisa do HUPES, e segue as recomendações da Res. CNS 196/96. Os indivíduos que apresentaram positividade em algum dos testes, foram encaminhados para avaliação clínica e assistência médica, se necessária, no Serviço de Infectologia do HUPES.

V. RESULTADOS

Dentre os 206 indivíduos entrevistados, 202 foram incluídos, destes, 60,4% foram do gênero feminino, e a idade variou de 2 a 90 anos, com mediana de 32 anos, e média de $36 \pm 21,5$ anos. Ao todo, 197 indivíduos foram submetidos à sorologia por ELISA com antígenos rK39, e rK26 após punção venosa, e/ou 190 indivíduos à intradermoreação de Montenegro, com 115 resultados válidos. Cerca de 51% dos indivíduos ($n=103$, IC95% 44,1% – 57,8%) apresentaram positividade em algum dos testes realizados, o que sugere que os mesmos foram expostos ao *Leishmania* sp. (Algoritmo 1).

Figura 1 – Algoritmo de identificação da infecção por *Leishmania* sp. em indivíduos residentes em Pé de Areia, 2010.



Destes 103 indivíduos, o coeficiente de prevalência de infecção foi maior no grupo de indivíduos com idade ≤ 17 anos, e entre os indivíduos com idade entre 33 e 49 anos (Tabela 1).

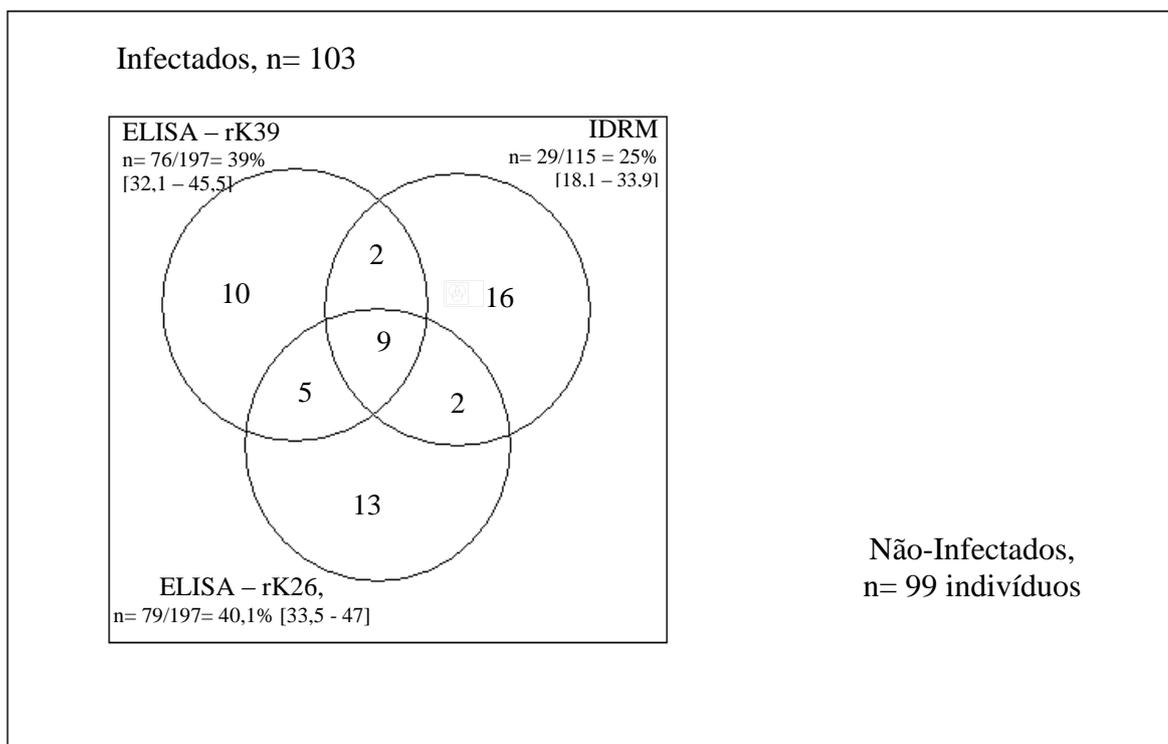
Tabela 1 – Coeficiente de Prevalência de infecção por *Leishmania* sp. por faixa etária dos indivíduos residentes em Pé de Areia, 2010.

| Faixa etária | Número de indivíduos | Número de indivíduos com sugestão de infecção | Coeficiente de Prevalência de infecção (%) [IC] |
|--------------|----------------------|---|---|
| ≤ 17 anos | 51 | 31 | 60,8 [47,1 – 72,9] |
| 18 – 32 | 51 | 23 | 45,1 [32,3 – 58,6] |
| 33 – 49 | 49 | 26 | 53,1 [39,4 – 66,3] |
| ≥ 50 anos | 51 | 23 | 45,1 [32,3 – 58,6] |
| Total | 202 | 103 | 50,9 [44,1 – 57,8] |

Nota: IC=Intervalo de Confiança 95%

O ELISA com o antígeno rK26 sobressaiu-se na identificação, sugestivo da infecção, por *Leishmania* sp., seguido do ELISA-rK39 com 39% (n=76/197, IC95% 32,1% – 45,5%), e IDRМ com 25% (n=29/115, IC95% 18,1% – 33,9%), ver Figura 2.

Figura 2 – Prevalência de infectados por *Leishmania* sp. sugerida pelo ELISA-rK39, ELISA-rK26, e/ou IDRМ em indivíduos residentes em Pé de Areia, 2010.



Total de indivíduos, n= 202

Nota: [Intervalo de Confiança 95%, em %].

VI. DISCUSSÃO

Até a década de 60 a leishmaniose visceral concentrava-se no interior do estado da Bahia, sobretudo na região da Chapada Diamantina, onde o clima é quente e seco, e a vegetação xerófila. (25). Em consequência das ações antrópicas no meio ambiente, somadas ao raio de ação do flebotomíneo vetor, numa média de 250 a 500m (atingindo até 1,5Km), a distribuição geográfica dessa enfermidade tem-se modificado (11). Atualmente a doença tem alcançado a zona costeira e periférica das grandes cidades, locais anteriormente inadequados à distribuição do vetor *Lu. longipalpis* (25). Isso explica a presença da infecção por nós encontrada em Pé de Areia, região metropolitana de Salvador.

A prevalência e a distribuição por faixa etária da infecção humana por *Leishmania* sp. em Pé de Areia (51%) nos faz suspeitar que exista aí um novo foco epidêmico. No entanto, a endemicidade deve ser investigada. Os achados da literatura documentam que a maioria dos indivíduos que vivem em região endêmica apresenta evidências de infecção por *L. donovani*. Nessas áreas verifica-se elevadas taxas de indivíduos sorologicamente positivos ou reatores ao teste intradérmico sem evidências de Calazar.(2) Há relatos que a proporção de infecção/doença em Jacobina, região noroeste da Bahia, foi de 18:1 (3) e no estado do Ceará de 11:1. (16) No estudo realizado em Jacobina, área também endêmica para leishmaniose visceral, a prevalência da infecção estimada pela sorologia em crianças menores de 15 anos foi em torno de 34% (86 crianças com positividade na sorologia em >2.500 testadas) (3), ao passo que em Pé de Areia foi de 63% (27/43 crianças até 15 anos). Embora tenhamos avaliado um menor tamanho amostral, a confirmação de que a prevalência da infecção foi maior entre crianças nos preocupa, pois é sabido que a baixa idade é um fator de risco para o desenvolvimento da doença (3).

Nossos resultados mostraram que o teste com maior capacidade de detecção de infectados foi o ELISA com rK26, 40% (n= 79/197, IC95% 33,5% - 47%), seguido pelo ELISA-rK39 (39%, n= 76/197, IC95% 32,1% - 45,5%), e IDR (25%, n= 29/115, IC95% 18,1% - 33,9%). Os achados corroboram com o encontrado na literatura no que diz respeito ao maior poder de identificação da infecção por *Leishmania* sp. dos ELISAs com rK39 e rK26 em comparação com a Intradermorreação de Montenegro. (7, 19, 23). Dentre esses, o antígeno rK26 é citado como o mais sensível na detecção de pessoas com infecção inaparente (8). Os indivíduos com sorologia e/ou intradermorreação de Montenegro positiva não foram submetidos ao teste padrão-ouro - demonstração direta do parasito - para confirmação da infecção por *L.*

donovani, devido a ausência de indicação clínica. Essa constitui, portanto, a principal limitação deste trabalho.

Esse estudo teve um impacto positivo para a região de Pé de Areia, município de Camaçari, uma vez que permitiu mapear e identificar focos sugestivos de infecção por *Leishmania* sp. Os governantes locais foram contactados e informados sobre tais focos, o que propiciou a adoção imediata de medidas de controle e prevenção da infecção na região, tais como a dispersão de inseticida por meio de veículo apropriado contra flebótomos nas ruas, rastreamento de possíveis cães infectados - principal reservatório do parasita - nas residências investigadas, e mobilização social na comunidade local. Segundo Chappuis e cols., as cinco principais estratégias para eliminação da Leishmaniose Visceral consistem em: i) diagnóstico precoce e tratamento dos casos; ii) manejo do vetor; iii) detecção de casos ativos e passivos; iv) mobilização social e, v) pesquisas científicas na área (14).

VII. CONCLUSÕES

1. A alta prevalência da infecção por *Leishmania* sp. sugerida pela sorologia com ELISA e/ou pela Intradermorreação de Montenegro em Pé de Areia nos induz a classificar essa área como um novo foco epidêmico;
2. A faixa etária mais acometida pela infecção por *Leishmania* sp. foi de indivíduos jovens com até 17 anos;
3. O ELISA com os antígenos rK26 e rK39 sobressaíram-se na identificação de indivíduos expostos a *Leishmania* sp., se comparados ao Teste de Montenegro. Entretanto, recomendamos o uso combinado das técnicas para identificação da exposição ao parasito em inquéritos sorológicos em virtude das suas diferentes populações-alvo;
4. O conhecimento da distribuição geográfica da infecção por *Leishmania* sp. em Pé de Areia pelos dirigentes locais possibilitou a adoção de medidas de prevenção e controle na área, antes negligenciada para o controle do Calazar.

5. VIII. SUMMARY

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis (VL) or kala-azar, considered a neglected disease by WHO, has spread rapidly in Bahia because of the urbanization process. Camaçari, located in the metropolitan region of Salvador, Bahia, has been shown to be endemic area of the disease. Therefore, it becomes essential to obtain information about the distribution of infection by *Leishmania* sp. for the provision of subsidies to control this epidemic by the local community. **OBJECTIVES:** 1) identify the prevalence of infection with *Leishmania donovani* suggested by ELISA rK39 and rK26 antigens and / or Montenegro skin test in individuals from an endemic area of Pé de Areia, Camaçari, 2) describe the demographic profile of the subjects included in the study, 3) provide assumptions for local authorities to adopt preventive measures to control infection with *Leishmania* in the studied community. **METHODS:** We conducted a serological survey between January and February 2011 in 206 individuals living in Pé de Areia, Camaçari-BA for antibodies against *Leishmania donovani*. As instruments, we adopted the indirect-ELISA with antigens rK-39 and rK26, and Montenegro skin test (MST) solution with leishmanina L. Amazonensis. **RESULTS:** About 51% of the individuals were positive in any of the tests, the prevalence rate of infection was higher in the group of persons aged ≤ 17 years; the ELISA with rK26 excelled in identifying individuals with suggestive infection of *Leishmania* sp. **DISCUSSION AND CONCLUSION:** The high prevalence of infection with *Leishmania* sp. in Pé de Areia induces us to classify it as a new epidemic area; young individuals were the most affected by infection; the ELISA with rK39 and rK26 proved to be good tools for serological surveys; this study had a positive impact in Pé de Areia because it identified places of infection.

KEY WORDS: *Leishmania*, Immunologic Techniques, Epidemiology.

IX. REFERÊNCIAS

- 1 Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7(5):e35671.
 - 2 Badaro R, Duarte MIS. *Leishmaniose Visceral (Calazar)*. Veronesi: tratado de infectologia, 1234-1259. 1996. São Paulo, Atheneu.
- Ref Type: Generic
- 3 Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986 Dec;154(6):1003-11.
 - 4 Badaro R, Jones TC, Lorencó R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986 Oct;154(4):639-49.
 - 5 Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996 Mar;173(3):758-61.
 - 6 Badaró R, Reed SG. Leishmanioses. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editors. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 255-62.
 - 7 Bern C, Amann J, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, 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* 2006 Oct;75(4):744-8.
 - 8 Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YA. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 1999 Aug 20;102(2):249-61.
 - 9 Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Oct;67(4):344-8.
 - 10 Burns JM, Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jan 15;90(2):775-9.

- 11 Carneiro D, et al. Identificação de áreas de risco para a Leishmaniose Visceral Americana, através de estudos epidemiológicos e sensoriamento remoto orbital, em Feira de Santana, Bahia, Brazil (2000-2002). *Revista Brasileira de Saúde Pública* 2004 Jan;28(1):19-32.
 - 12 Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD, Jr. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1987 Dec;156(6):1030-3.
 - 13 Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 2006 Oct 7;333(7571):723.
 - 14 Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov;5(11):873-82.
 - 15 Cunha S, Freire M, Eulalio C, Critosvao J, Netto E, Johnson WD, Jr., et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995 Mar;89(2):155-8.
 - 16 Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992 Nov;166(5):1124-32.
 - 17 Kurkjian KM, Vaz LE, Haque R, Cetre-Sossah C, Akhter S, Roy S, et al. Application of an improved method for the recombinant k 39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005 Dec;12(12):1410-5.
 - 18 Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 May 29;104(22):9375-80.
 - 19 Maia Z, Lirio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012 Jan;6(1):e1484.
 - 20 Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000 May;16(5):188-9.
 - 21 Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica 7 ed, 29-63. 2010.
- Ref Type: Generic
- 22 Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral: situação epidemiológica. [http://portal saude gov br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561) 2012

- 23 Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S. Compararative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 2010 Feb;4(2):114-7.
- 24 Reed SG, Badaro R, Masur H, Carvalho EM, Lorenco R, Lisboa A, et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986 Jan;35(1):79-85.
- 25 Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996 Nov;91(6):671-83.
- 26 Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011 Jan;105(1):1-6.
- 27 Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res* 2012 Mar;110(3):1065-78.
- 28 Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 Sep;9(5):951-8.
- 29 van GJ, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 2012 Jun;26(2):309-22.
- 30 WHO. Urbanization: an increasing risk factor for Leishmaniasis. Geneva; 2002 Nov 1. Report No.: 77.
- 31 Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG, et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998 Sep;5(5):717-20.

ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



Universidade Federal da Bahia
Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos
Rua Augusto Viana, s/n -Canela - CEP: 40.110-060 – Salvador - Bahia
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP
Tel.: (71) 3339-6394 FAX: (71) 3339-6228



FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO PROT. CEP – 034/2008

O Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, avaliou o Projeto abaixo descrito.

Projeto de Pesquisa: Estudo Epidemiológico da Leishmaniose Visceral Humana Assintomática e sub-Clinica no Município de Camaçari-BA

Pesquisador Responsável: Roberto Badaró

Data do Parecer: 17 de Dezembro de 2008.

Parecer: Projeto Aprovado.

Atenciosamente,


Dr.ª Maria Cristina Teixeira Cangussu
Coordenadora do CEP/Complexo HUPES

ANEXO 2 - Questionário utilizado no inquérito

Pesquisa de Leishmaniose Visceral em Pé de Areia

Código da Casa: LVPA _____ Nome/Apelido do chefe da Família: _____ Data: ____/____/2011

Endereço com referência: _____

- Casa possui quintal? () Não () Sim. Como? cimentado () de terra ()
- Cria animais? () Não () Sim. Quais? cachorro () / galinha () / porco () / gato () / coelho () / outro () _____
- Faz uso de mosquiteiro/inseticida/fumaça para afastar murissoca? () Não () Sim

| Membro | Nome completo | Data de nasc. | Parentesco | Sadio? (s/n*) | História de Calazar (s/n) | Ano do Calazar | Testes a serem realizados | | |
|--------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------------------|----------------|---------------------------|------|-------|
| | | | | | | | HIV | IDRM | ELISA |
| 01 | | | | | | | () | () | () |
| 02 | | | | | | | () | () | () |
| 03 | | | | | | | () | () | () |
| 04 | | | | | | | () | () | () |
| 05 | | | | | | | () | () | () |
| 06 | | | | | | | () | () | () |
| 07 | | | | | | | () | () | () |
| 08 | | | | | | | () | () | () |

*Se não for sadio, descreva o caso (sinais e sintomas, diagnóstico, terapêutica e resposta clínica) _____

Responsável pela coleta: _____ Responsável pela aplicação do termo de consentimento/questionário: _____

ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**1 – Convite**

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo de pesquisa. Antes de decidir, é importante que entenda o por quê a pesquisa está sendo realizada e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e discutir isto com os seus familiares, amigos e seu médico. Se você desejar, pode levar esta folha para casa para pensar melhor. Nos pergunte se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se você precisar de mais informações. Utilize o tempo que for necessário para decidir se deseja participar do estudo.

2 - Informações Gerais

Título do estudo: Estudo Epidemiológico da Leishmaniose Visceral Humana Assintomática e Sub-Clínica no Município de Camaçari – BA.

Data: 2009 à 2012

Nome do investigador-principal: Dr. Roberto Badaró

Telefone: (71) 3339-6207

3 - Questões de Interesse do Paciente:**3.1 - "Qual o propósito do estudo?"**

Determinar a prevalência da infecção assintomática por *Leishmania donovani* e de formas sub-clínicas de Leishmaniose visceral em Pé de Areia, Camaçari-BA; avaliar o impacto do tratamento precoce das formas sub-clínicas da LVA e, determinar a taxa de co-infecção *Leishmania* e HIV na população estudada.

3.2 - "O que é Leishmaniose visceral?"

A Leishmaniose visceral é causada pelo protozoário *Leishmania* spp. e transmitida pelo mosquito *Lutzomyia* spp. no Brasil, mais conhecido popularmente por mosquito-palha. A forma clínica clássica caracteriza-se por febre, aumento do fígado e baço, aumento da gamaglobulina no sangue, e morte se não instituído o tratamento. A forma sub-clínica da Leishmaniose se caracteriza por presença de sintomas leves, comuns a várias doenças tais como diarreia, tosse e fraqueza associadas à aumento do fígado e baço. Comumente essa forma é, em geral, confundida com parasitose intestinal e desnutrição, todavia tem uma grande importância nas áreas endêmicas, pois se identificadas precocemente o seu tratamento é mais simples e evita a evolução para formas mais graves.

3.3 - "Por que fui escolhido?"

A sua família foi escolhida para participar do estudo por residirem em Pé de Areia, serem vizinhos de pessoas que tiveram Leishmaniose e não apresentarem histórico da doença.

3.4 - "Eu sou obrigado a participar?"

Você pode ou não participar da pesquisa. Se quiser participar, deverá assinar este formulário em duas vias e manter uma cópia com você. Se decidir participar, mas mudar de ideia durante

a pesquisa, poderá sair a qualquer momento sem se desculpar. Isto não afetará o cuidado e a atenção que seu médico tem dado a você.

3.5 - "O que me acontecerá se eu participar?"

Você estará envolvido na pesquisa por um período de dois anos (2009 à 2012), receberá seis visitas, sendo a primeira para o recebimento deste convite e esclarecimento sobre o mesmo e, as outras quatro para coleta de sangue por punção venosa, aplicação intradérmica da solução de leishmanina (Teste de Montenegro), e leitura do Teste de Montenegro. A última visita será para recebimento dos resultados dos exames realizados e, esclarecimentos sobre o mesmo. Você não terá qualquer despesa com a realização dos exames. Caso tenha resultado sorológico positivo para Leishmaniose será encaminhado para o Hospital das Clínicas para avaliação e/ou tratamento gratuitos. Você terá apenas despesas com o seu deslocamento para o Hospital, caso seja necessário. Esperamos contar com sua frequência nas datas previstas e, caso haja qualquer mudança que interfira na programação, avise-nos.

3.6 - "O que posso e o que não posso fazer?"

Não existe nenhuma restrição quanto ao estilo de vida, dieta alimentar ou tratamento para outras enfermidades.

3.7 - "Quais são as desvantagens e riscos em se participar do estudo?"

Pode acontecer de se diagnosticar uma condição não reconhecida por você (por exemplo pressão arterial alta, HIV positivo, etc.). O que poderá ser controlado ou ocultado de terceiros.

3.8 - "Quais são os benefícios em se participar do estudo?"

É esperado que o resultado dos exames possam ajudar você. Mas, isto não é garantido. As informações que obtivermos deste estudo poderão nos ajudar a tratar melhor no futuro de outro paciente com Leishmaniose. Caso você seja portador(a) da leishmaniose nas formas clínica ou subclínica poderá iniciar o tratamento precocemente. Diminuindo assim, a possibilidade de agravamento da doença.

3.9 - "O que acontece quando a pesquisa termina?"

Você tem acesso aos resultados dos exames realizados e recebe esclarecimentos sobre os mesmos. Ocasionalmente, a empresa que patrocina a pesquisa poderá parar o estudo antecipadamente. Se este for o caso, as causas devem ser explicadas aos pacientes.

3.10 – "E se houver problema?"

Não foi estabelecida previamente nenhuma compensação especial para casos em que o(a) paciente sinta-se prejudicado(a) por ter participado do projeto de pesquisa. Se for prejudicado(a) pelo erro ou desatenção de algum profissional, poderá acionar a pessoa na justiça, assumindo o custo normal do processo. Além disso, se desejar apresentar queixa de qualquer aspecto do modo como foi orientado(a) ou tratado(a) durante a pesquisa, você poderá manter contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos.

3.11 - "Minha participação nesta pesquisa será mantida em sigilo?"

Todas as informações coletadas sobre você durante a pesquisa serão mantidas em sigilo. Qualquer informação sobre você que saia do hospital terá seu nome e endereço removidos, de forma que você não poderá ser identificado(a).

3.12 - "O que acontecerá aos resultados do estudo da pesquisa?"

Serão publicados em uma revista na área de saúde e os participantes poderão obter uma cópia através da mesma. Você não será identificado em qualquer relatório de publicação. Qualquer informação sobre você que possibilite a sua identificação será mantida em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo.

3.13 - "Quem revisou o estudo?"

O estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Hospital Universitário Professor Edgard Santos.

3.14 - "Contato para informação adicional e emergências."

A pesquisadora Zuinara Pereira G. Maia estará à disposição através do telefone (71) 8168-7703 para quaisquer informações adicionais ou emergências.

3.15 - "Eu serei indenizado?"

Não foi estabelecido previamente nenhuma compensação especial para casos em que o(a) paciente sinta-se prejudicado(a) por ter participado do projeto de pesquisa. Se for prejudicado(a) pelo erro ou desatenção de algum profissional, poderá acionar a pessoa na justiça, assumindo o custo normal do processo. Além disso, se desejar apresentar queixa de qualquer aspecto do modo como for orientado(a) ou tratado(a) durante a pesquisa, poderá manter contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, telefone (71) 3339-6394.

4 - Quanto aos Métodos de Pesquisa

Serão utilizados métodos sorológicos a partir do ELISA indireto utilizando antígenos bruto e recombinantes, e, Teste de Montenegro. Todo o material perfuro-cortante utilizado para coletar seu sangue ou aplicar a solução de leishmanina será estéril e descartável.

4.1 - Delineamento do estudo

O estudo tem caráter descritivo de cunho epidemiológico.

1ª via para o(a) Paciente

Número da identificação do(a) paciente neste estudo: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Estudo Epidemiológico da Leishmaniose Visceral Humana Assintomática e Sub-Clínica no Município de Camaçari – BA.

Data: 2009 à 2012

Nome do investigador-principal: Dr. Roberto Badaró

Telefone: (71) 3339-6207

Antes de assinar este documento, eu fui suficientemente informado(a) sobre o projeto de pesquisa: os objetivos, os inconvenientes, os benefícios, os perigos e os efeitos colaterais que podem ocorrer quando eu estiver participando da pesquisa. Eu conversei diretamente com o(a) pesquisador(a) e ele(a) respondeu todas as perguntas que fiz com relação a pesquisa sem deixar dúvidas. Eu sei que posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Aceito participar voluntariamente da pesquisa, permitindo que meus registros médicos sejam inspecionados por representantes da empresa que patrocina a pesquisa e por representantes do governo para conferir se o estudo está sendo realizado corretamente.

| | | |
|--|------------------------------------|------|
| Nome do(a) Paciente | Assinatura ou Impressão Digital | Data |
| Nome do(a) Representante do(a) Paciente | Assinatura | Data |
| Pessoa que apresentou a pesquisa se não for o Investigador-principal | Assinatura | Data |
| Nome do Investigador-principal | Assinatura | Data |

2ª via para o Investigador-principal