

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA**

Sílvia Maria Santos Carvalho

**Caracterização da transmissão da
Leishmaniose Tegumentar Americana
no município de Ilhéus,
Zona da Mata do estado da Bahia**

**RECIFE,
2010**

SÍLVIA MARIA SANTOS CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DA TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA NO MUNICÍPIO DE ILHÉUS, ZONA DA MATA
DO ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

RECIFE

2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C331c Carvalho, Sílvia Maria Santos.

Caracterização da transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia/
Sílvia Maria Santos Carvalho. – Recife: S. M. S. Carvalho, 2010.
100 f.: il., tabs., mapas, grafs.,

Tese (Doutorado em Saúde Pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.
Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho.

1. Leishmaniose. 2. *Lutzomyia*. 3. Imunofluorescência. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Título.

CDU 616.993.161

SÍLVIA MARIA SANTOS CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DA TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA NO MUNICÍPIO DE ILHÉUS, ZONA DA MATA
DO ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 02/07/2010

BANCA EXAMINADORA

Drº Sinval Pinto Brandão-Filho, PhD
Centro de pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Ângela Cristina Rapela Medeiros, PhD
Universidade de Pernambuco

José Carlos Miranda, PhD
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ

Zulma Maria Medeiros, PhD
Centro de pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Eduardo Henrique Gomes Rodrigues, PhD
Centro de pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

*Dedico esse trabalho à minha mãe,
Maria da Glória Santos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar a superação de dificuldades e ausências, ajudando-me a vencer barreiras;

Ao alicerce da minha vida, minha família, por quem vivo e a quem dedico as minhas conquistas.

À acolhida fraterna e à amizade de Henrique Lanza e Fabiana Portilho, os portos seguros na minha estada em Ilhéus, e grandes amigos;

Ao apoio e amizade no início de todo esse processo de Paulo Andrade, Márcia Melo e filhos;

À confiança do meu estimado orientador, Sinval Pinto Brandão-Filho, cuja valorosa experiência foi fundamental em meu aprendizado e desempenho;

À dedicação e amizade de Maria Edileuza Felinto Brito e Maria Sandra Andrade;

À valorosa contribuição, no processamento de amostras, da Dra. Rosângela Zacarias Machado, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

A toda equipe do laboratório de Imunoparasitologia, de quem levarei saudades. Em especial agradeço aos ensinamentos práticos que Éricka e Inês me proporcionaram; e às valorosas contribuições de Eduardo Henrique;

Aos colegas do curso de doutorado. Um agradecimento especial e sincero à amizade e confiança dos inseparáveis irmãos do coração, presentes para toda uma vida: Sandro Lima e Jaqueline Batista;

À “turma do bem”, companheiros fiéis de todas as horas: Lena, Larissa, João, Delmira, Jackeline, Miríades, Luiz Alberto, Max, Raul, Cristina Caribé, Maria Isabel Severo, Arno, Lise Labejof, Augusto Minervino, Roberto Paixão, Márcia Attié, Ana Paula Mariano.

Aos estimados amigos do Núcleo de Entomologia da 6ª Dires, inspiradores para a concretização desse trabalho de pesquisa: Paulo Barbosa, Sebastião Souza, Adevegistro Pereira, Reinaldo Silva e Missias Leite.

Ao corpo médico, biomédico e de enfermeiras do Centro de Atenção Especializada III (CAE III) da Secretaria Municipal de Saúde de Ilhéus/BA, que acreditou nesse projeto e o tornou possível.

Aos pacientes, sem os quais essa pesquisa não seria possível;

Ao incentivo da Universidade Estadual de Santa Cruz;

A todos os ex e futuros alunos, em quem um mestre deve se inspirar na busca por atualizações profissionais.

CARVALHO, S. M. S. **Caracterização da transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia.** 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana é endêmica em todos os estados do Brasil. De acordo com os registros da Secretaria de Saúde municipal, Ilhéus, localizado no sul da Bahia, é endêmico para a doença. Esse estudo objetivou caracterizar a transmissão da enfermidade nesse município. Foi realizado um estudo retrospectivo entre os anos 2000 e 2006, proporcionando a realização de busca ativa de casos humanos em áreas rural e urbana (Santo Antonio e Teotônio Vilela), com um inquérito populacional em 147 e 77 indivíduos, respectivamente. Foram capturados e identificados 6.439 flebotomíneos com armadilhas CDC, mil deles separados em pools de 20 insetos e submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase. Ademais, 1.528 fêmeas capturadas com armadilhas de Castro foram dissecadas. Foram atendidos 131 pacientes suspeitos da doença no Centro de Atenção Especializada III, entre Agosto/2007 e Setembro/2009, e avaliados clínica, epidemiológica, parasitológica, molecular e imunologicamente. Dos residentes na área urbana 79,4% visitaram, ao menos uma vez, a área rural. Foram identificadas 18 espécies de flebotomos, predominando *Lutzomyia whitmani* (52,49%) e *L. fischeri* (29,98%) na área rural, e *L. cortelezzii* (05 exemplares) na urbana. Não houve infecção natural à dissecação; e nenhum pool foi positivo à PCR. Mas, dos 84 hamsters inoculados com material humano, 03 amostras de esfregaços hepáticos apresentaram amastigotas; e 02 foram detectáveis por PCR para o subgênero *Viannia*. Não houve evidência de transmissão urbana, sugerindo uma origem rural dos casos, onde *L. whitmani* e *L. fischeri* possivelmente são vetores, tendo *L. (V) braziliensis* como agente etiológico nesse ciclo de transmissão. Recomenda-se intensificação na vigilância quanto à notificação de casos e atenção às características epidemiológicas locais.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar. *Lutzomyia*. Imunofluorescência. Reação em Cadeia da Polimerase.

CARVALHO, S. M. S. **Characterization of American Tegumentary Leishmaniasis transmission in the municipality of Ilhéus, Zona da Mata region of Bahia State.** 2010. Thesis (Doctorate in Public Health) - Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2010.

ABSTRACT

The American Tegumentary Leishmaniasis is endemic in all states of Brazil. According to the registers of the municipal Health Secretariat, Ilhéus, located in the south of Bahia, is endemic for the disease. This study aimed to characterize the transmission of the disease in this municipality. A retrospective study was conducted between the years 2000 and 2006, allowing the active search of human cases in rural and urban areas (Santo Antonio and Teotônio Vilela), through a population survey with 147 and 77 individuals, respectively. There were captured and identified 6439 phlebotomine sandflies with CDC traps, and a thousand of them were separated in pools of 20 insects and submitted to the Polymerase Chain Reaction. Furthermore, 1528 females captured with Castro aspirators were dissected. There were 131 patients suspected of the disease at the Center of Specialized Care III, between August/2007 and September/2009, and they were evaluated clinically, epidemiological, parasitological, molecular and immunologically. From the urban area residents, 79.4% visited, at least once, the rural area. Eighteen phlebotomine sandflies species were identified, predominating *Lutzomyia whitmani* (52.49%) and *L. fischeri* (29.98%) in the rural area, and *L. cortelezzii* (05 exemplars) in the urban one. There was no natural infection from dissection, and no pool was positive to the PCR. Nonetheless, from the 84 hamsters inoculated with human material, 3 samples from the liver smears showed amastigotes; and 02 were detectable by PCR for the subgenus *Viannia*. There was no evidence of urban transmission, suggesting a rural origin of cases, where *L. whitmani* and *L. fischeri* are possible vectors, having *L. (V) braziliensis* as etiologic agent in this transmission cycle. It is recommended to intensify the inspection regarding case reporting and attention to the local epidemiological characteristics.

Key-words: Tegumentary Leishmaniasis. *Lutzomyia*. Immunofluorescence. Polymerase Chain Reaction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses	12
1.2 Transmissão	14
1.2.1 Ciclo biológico de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	14
1.2.2 Vetores	16
1.2.3 Reservatórios	17
1.3 Padrões de transmissão	18
1.4 Diagnóstico da LTA	18
1.5 Tratamento	21
1.6 Perspectivas de controle	21
1.7 Justificativa	22
1.8 Objetivos	23
1.8.1 Geral	23
1.8.2 Específicos	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Desenho do estudo	24
2.2 Área de estudo	24
2.3 População humana	27
2.3.1 Busca ativa de casos	27
2.3.2 Pacientes atendidos em Posto de Saúde	27
2.4 Exames parasitológicos	28
2.4.1 Pesquisa direta	28
2.4.2 Punção aspirativa	28
2.4.3 Cultura “ <i>in vitro</i> ”	29
2.5 Exames imunológicos	29
2.5.1 Teste Intradérmico de Montenegro (IDRM)	29
2.5.2 Teste de Imunofluorescência Indireta	30
2.6 Pesquisa entomológica	30
2.6.1 Captura de flebotomíneos	30
2.6.2 Exposição de animais sentinelas	31

2.7 Método molecular	32
2.7.1 Extração e purificação de DNA	32
2.7.2 PCR específica para o subgênero <i>Viannia</i>	33
2.8 Análise estatística dos resultados	33
2.9 Considerações éticas	33
3 RESULTADOS	35
3.1 Notificação dos casos humanos de Ita no período de 2000 a 2006	35
3.2 Busca ativa dos casos notificados de LTA	36
3.3 Pacientes submetidos aos testes diagnósticos no CAE III	39
3.4 Isolamento de <i>leishmania</i>	44
3.5 Diagnóstico molecular	44
3.5.1 Concentração de DNA genômico	44
3.5.2 Determinação do limiar de detecção de DNA para o subgênero <i>Viannia</i> baseada na abordagem por PCR	45
3.5.3 Eletroforese em gel de agarose a 1% para revelação dos produtos amplificados na reação de PCR	46
3.6 Fauna flebotomínea nas áreas de coleta	47
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A - Termo de Consentimento para maiores de 18 anos atendidos na Fundação SESP	76
APÊNDICE B - Termo de Consentimento para menores de 18 anos atendidos na Fundação SESP.	79
APÊNDICE C - Termo de Consentimento para menores de 18 anos atendidos na busca ativa dos casos.	82
APÊNDICE D - Termo de Consentimento para maiores de 18 anos atendidos na busca ativa dos casos.	85
APÊNDICE E - Termo de Consentimento para as residências onde as armadilhas para coleta dos insetos são instaladas.	88
APÊNDICE F - Questionário utilizado para realização do inquérito epidemiológico	91
ANEXO A - Mapas de distribuição do volume de chuva para o Brasil,	93

referente ao mês de novembro e dezembro de 2007.

ANEXO B - Mapas de distribuição do volume de chuva para o Brasil, 94
referente ao mês de junho, novembro e dezembro de 2008.

ANEXO C - Mapas de distribuição do volume de chuva para o Brasil, 96
referente ao mês de março, abril, maio e junho de 2009.

ANEXO D - Parecer do Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos 98

ANEXO E - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais 99

ANEXO F - Termo aditivo da Comissão de Ética no Uso de Animais 100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, transmitidos por diferentes espécies de flebotomíneos. A doença se apresenta basicamente de duas formas clínicas: a leishmaniose visceral ou calazar e a leishmaniose tegumentar, que diferem nas manifestações clínicas, agentes etiológicos, insetos vetores e reservatórios envolvidos em diferentes ciclos de transmissão (LAINSON; SHAW, 2005; MARZOCHI; SCHUBACH; MARZOCHI, 1999).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose cujos reservatórios do parasita são mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas). O homem adquire a infecção ao entrar em contato com áreas florestais onde existem a enzootia. Diversos fatores, tais como os processos migratórios, urbanizações desordenadas, além de fatores de risco individuais como co-infecção com HIV, tem contribuído para a expansão da doença (BASANO; CAMARGO, 2004).

A doença apresenta uma variedade em manifestações clínicas que dependem da espécie do parasita e da resposta imune do hospedeiro, tendo como aspectos clínicos desde formas inaparentes, com lesões discretas de pele com tendência à cura espontânea, a ulcerações múltiplas ou lesões mucosas de curso lento e difícil tratamento (MEDEIROS; ROSELINO, 1999).

A leishmaniose sob a forma tegumentar americana é uma doença autóctone das Américas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a enfermidade é um grave problema de saúde pública, estando entre as seis doenças infecto-parasitárias mais importantes do continente americano (BRASIL, 2007). No mundo, noventa por cento dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. A sua distribuição nas Américas se estende desde o extremo Sul dos Estados Unidos, no estado do Texas, ao Norte da Argentina, excetuando o Uruguai e o Chile (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

Nas últimas décadas, se tem observado um aumento da incidência em todas as regiões do Brasil, com um registro anual de cerca de 35.000 casos, ocupando o segundo lugar entre as protozooses transmitidas por vetores no país, superada apenas pela malária (AZULAY; AZULAY, 2004). Há casos humanos confirmados em todos os estados brasileiros e um surpreendente crescimento ao longo do tempo na incidência acumulada, que passou de 10,45 casos/100.000 indivíduos em 1985, para 18,63 casos/100.000 indivíduos no ano 2000 (OLIVEIRA et al., 2004). Os registros de coeficientes mais elevados ocorreram nos anos de 1994 e 1995 que atingiram, respectivamente, os níveis de 22,83 e 22,94 casos/100.000 habitantes. A média entre 1985 e 2005 foi de 18,5 casos para cada 100.000 habitantes. Estatísticas oficiais demonstram o registro de picos de transmissão da doença a cada cinco anos, desde 1985 (BRASIL, 2007).

A região Norte concentra o maior número de casos da doença, seguida pela região Nordeste, que no ano de 2005 notificou 29% (8.071) dos casos do país, com elevada distribuição nos estados do Maranhão, Bahia e Ceará. Na Bahia, em particular, foi registrado 23% do total notificado no mesmo período, mostrando a sua importância como região endêmica (COSTA et al., 1998; SANTOS et al., 2000). No ano de 2009 esse estado registrou 4.058 casos da doença, o que correspondeu quase que à metade do total de registros do Nordeste no ano de 2005. Na Bahia a enfermidade é conhecida desde o início do século XIX, período correspondente à expansão da cultura de cacau na região sul do estado (FOLLADOR et al., 1999). De acordo com os registros da Secretaria Municipal de Saúde, Ilhéus é endêmico para a doença, registrando casos humanos em áreas urbana e rural. O coeficiente de detecção da doença para cada 100.000 habitantes, entre os anos 2000 e 2006, oscilou consideravelmente, registrando uma média de 31,67 casos/100.000 habitantes.

1.2 Transmissão

1.2.1 Ciclo biológico de parasitas do gênero *Leishmania*

As leishmanioses são causadas por protozoários unicelulares, intracelulares obrigatórios do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), flagelados digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, pertencentes ao gênero *Leishmania*. Estes parasitas apresentam ao longo do ciclo de vida duas formas distintas: amastigota e promastigota. A primeira, ovalada, e sem flagelo aparente, exclusiva do hospedeiro vertebrado e geralmente encontrada no interior de macrófagos e de outras células fagocíticas; e a segunda, flagelada, é encontrada no trato intestinal do inseto vetor, tanto livre no lúmen do intestino, como ligada pelo flagelo à cutícula intestinal (Figura 1) (PESSOA; MARTINS, 1988).

A transmissão da *Leishmania* pelo flebótomo se dá através da picada desses insetos, onde há o regurgitamento do sangue pré-ingerido, no ato do repasto seguinte. Schlein, Jacobson e Messer (1992) acreditam que esse processo ocorre porque as leishmanias produzem uma enzima quitinolítica que provoca o descolamento do revestimento da válvula da cárdia e a degeneração gradual da válvula e de estruturas próximas. Em estudo posterior ficou evidenciada a produção de um gel (mucina) produzido por leishmanias presentes no intestino médio torácico do inseto, posteriormente identificado como um proteofosfoglicano filamentosos (fPPG). A presença do gel aliada à do parasita seriam suficientes para alterar o funcionamento da válvula, deixando-a aberta por mais tempo, aumentando o refluxo dos promastigotas presentes nos intestinos médio e anterior. Isso justificaria a necessidade de o inseto buscar outros hospedeiros para realização do repasto sanguíneo, já que ele não seria capaz de se nutrir adequadamente numa única fonte alimentar (ROGERS et al., 2004).

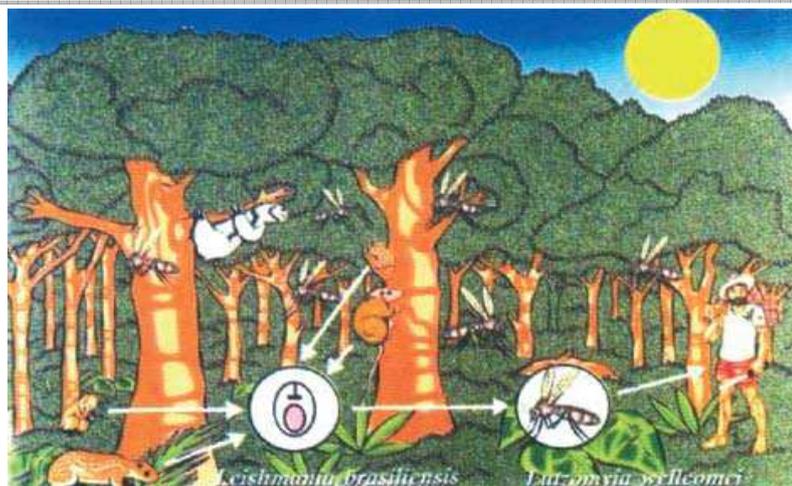


Figura 1 - Ciclo de transmissão da *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* entre *Lutzomyia wellcomei* e roedores silvestres na Amazônia brasileira.
Fonte: Brasil (2007).

No mundo, cerca de 20 espécies de leishmanias, são consideradas capazes de causar a doença em humanos, e pelo menos 13 dessas são descritas nas Américas. Das espécies associadas com a doença humana no Brasil, são conhecidas sete, todas pertencentes aos sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia*. A *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* é a principal espécie encontrada em território nacional e associada também à forma mais grave da doença, a leishmaniose mucosa (BRASIL, 2007).

Devido à diversidade de espécies, é importante a identificação dos parasitas e a determinação do ciclo de transmissão de acordo com sua distribuição geográfica. Esse conhecimento é importante não apenas para um melhor entendimento da epidemiologia e estudos biológicos básicos que auxiliam na determinação da unidade taxonômica, mas também para que seja adotado o tratamento adequado aos pacientes, uma vez que certos parasitas podem causar manifestações clínicas graves (FRANKE et al., 1990).

O período de incubação da doença varia de duas semanas a dois meses. A infecção é caracterizada pelo parasitismo das células do SFM, apresentando-se sob as formas cutânea (LC), cutâneo-difusa (LCD) e mucosa (LM). A primeira pode apresentar lesões localizadas, podendo ocorrer como lesão única ou múltipla, geralmente no local da picada do flebotômio. As lesões se apresentam ulceradas com fundo granulomatoso e bordas infiltradas, com tendência à cura espontânea (BRASIL, 2007); também pode ocorrer sob a forma disseminada; essa forma clínica, provavelmente ocorre por disseminação hematogênica ou linfática do

parasita, e se caracteriza por apresentar lesões numerosas, pequenas, ulceradas e distantes do local da picada, respondendo bem ao tratamento (REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), forma rara da doença, apresenta manifestações mais graves, ocorrendo em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, evoluindo de uma lesão que não responde ao tratamento à formação de placas infiltradas e múltiplas nodulações não ulcerativas. Essa forma clínica da doença é causada pela *L. amazonensis*, sendo de tratamento difícil ou ineficiente (BRASIL, 2007).

A forma mucosa é caracterizada pela severidade que acomete as cartilagens e mucosas, em especial as regiões oro-respiratórias. As lesões mucosas podem surgir no local da picada ou se manifestar após meses ou anos da lesão primária de LTA na pele. Essa forma clínica de LTA pode mutilar o indivíduo; em geral requer um tratamento mais prolongado (BRASIL, 2007).

1.2.2 Vetores

As leishmanioses acompanham a distribuição do inseto vetor, pertencente à subfamília *Phlebotominae*, que pode ser encontrado praticamente em todo o mundo, desde os trópicos até as regiões de inverno relativamente intenso. Nas Américas as espécies envolvidas na transmissão pertencem ao gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), que são insetos holometábolos, com fêmeas que realizam a hematofagia em hospedeiros vertebrados, havendo espécies mais “ecléticas” do que outras no que concerne às preferências alimentares. Este gênero, por sua vez, possui mais de 430 espécies, e mais de 30 delas têm sido registradas como vetores das leishmanioses, com uma extensa distribuição na América do Sul (AGUILAR et al., 1998; YOUNG; DUNCAN, 1994). As espécies envolvidas na transmissão das leishmanioses são, em geral, aquelas que têm a maior densidade populacional na área endêmica em estudo (MARTINEZ-ORTEGA, 1986).

De acordo com a distribuição das diversas espécies de flebotomíneos envolvidos na transmissão, a LTA assume características epidemiológicas distintas no Brasil. Pereira e Hoch (1990) constataram a prevalência da *Lutzomyia whitmani*

na localidade de Três Braços, Bahia, sendo essa espécie possivelmente relacionada com a transmissão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nessa localidade. A *Lutzomyia intermedia* também está presente nesta região como provável vetor da doença.

A distribuição e densidade dos flebotomíneos é afetada por fatores diversos, em especial em resposta às alterações antrópicas sofridas pelo ambiente (FERRO et al., 1997). A ocupação do espaço pelo homem determina de maneira especialmente aguda a distribuição e densidade de populações de *L. whitmani*, que encontram nos criadouros de animais em peridomicílio de casas rurais ou de periferia urbana um ambiente bastante propício para seu desenvolvimento. Desta forma, as densidades desta espécie de flebotomíneo em áreas ocupadas pelo homem costumam ser, muitas vezes, maiores do que as observadas em área silvestre (MARZOCHI; SCHUBACH; MARZOCHI, 1999; YOUNG; DUNCAN, 1994).

1.2.3 Reservatórios

Os animais reservatórios variam conforme a espécie de *Leishmania* que eles albergam. Existem estabelecidos parâmetros que devem ser observados para incriminar um animal como hospedeiro reservatório: a superposição da distribuição geográfica e temporal dos reservatórios e vetores; garantia de sobrevivência do reservatório na tentativa de assegurar a transmissão do parasita, não devendo causar patogenicidade ao mesmo; deve haver na área uma proporção elevada de animais infectados; manutenção do parasita no sangue ou na pele para garantir a transmissão ao flebotomíneo; e a espécie de parasita encontrada tanto no reservatório quanto no hospedeiro humano deve ser a mesma (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1990). Há situações em que um animal infectado consegue transmitir a infecção ao vetor, mas não é capaz de manter o ciclo indefinidamente, sendo considerado como reservatório secundário (SHAW, 1988).

Animais silvestres (edentados, marsupiais e roedores) e domesticados (gatos, cães e eqüídeos) já foram encontrados infectados por *Leishmania* spp. Estudos realizados na Zona da Mata sul de Pernambuco, relataram a presença de *Bolomys lasiurus*, *Rattus rattus* e *Nectomys squamipes* naturalmente infectados por *L. (V.)*

braziliensis. Esse parasita foi isolado em meio de cultivo e caracterizado por isoenzimas; também foi feita a confirmação através da detecção de DNA, pela técnica do PCR, sugerindo a participação destes animais silvestres como reservatórios primários no ciclo de transmissão da doença na região (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; BRITO et al., 2009).

O papel do cão como reservatório doméstico ainda não é consenso, sendo muito discutido, e sem evidências concretas. Há hipóteses que colocam o cão na condição de reservatório, para incriminá-lo como parte do ciclo de transmissão (CUNHA; LIMA; POMPEU, 2006; FALQUETO et al., 1991; SANTOS et al., 2005).

1.3 Padrões de transmissão

A LTA é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres, onde o homem é um hospedeiro ocasional por estar em contato com a floresta (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). Entretanto tem sido comum a observação de mudanças no padrão de transmissão. Em função disso, Valim (1993) sugeriu três perfis epidemiológicos no Brasil: um silvestre, localizado na região Amazônica e no Centro-Oeste brasileiro, no qual a transmissão ocorre em focos naturais, em ecossistemas florestais; um segundo padrão, também em focos naturais com ciclo silvestre, mantido em áreas florestais preservadas, em áreas de produção agrícola tradicional, como ocorre no Nordeste, nos estados do Ceará, Bahia e na região Sudeste, em Minas Gerais e no Rio de Janeiro; e um terceiro padrão, cuja ocorrência tem sido observada nas periferias de áreas urbanas.

1.4 Diagnóstico da LTA

O diagnóstico da LTA é realizado através de um conjunto de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Em áreas endêmicas apresenta limitações, sendo rotineiramente realizado apenas pelos aspectos clínicos e epidemiológicos. O diagnóstico laboratorial se baseia na demonstração do parasita e em provas

imunológicas (BRITO et al., 2000). As técnicas moleculares, amplamente utilizadas em laboratórios de pesquisa, são alternativas importantes pela sensibilidade e especificidade apresentadas.

No diagnóstico clínico-epidemiológico, tanto no caso de lesões cutâneas quanto mucosas, é necessário uma investigação acerca da procedência do paciente, se de área endêmica ou não, sua ocupação e hábitos de adentrar a mata. Em adicional, em casos de lesões mucosas, é importante questioná-lo sobre a presença de cicatrizes primárias compatíveis com a LTA, avaliar a presença de lesões pelo corpo e se foram submetidos a tratamentos anteriores para a doença (MARZOCHI, 1992). É necessário avaliar a característica da lesão apresentada pelo paciente, associada à anamnese. O diagnóstico diferencial deve ser levado em consideração, já que há semelhança com demais lesões de natureza dérmica, causadas por traumas, bactérias ou fungos. Algumas doenças que fazem diagnóstico diferencial com LTA são: esporotricose, piodermite, tuberculose cutânea, úlcera traumática, úlcera por deficiência vascular, cromoblastomicose e paracoccidiodomicose, dentre outras (BRASIL, 2007).

O diagnóstico parasitológico pode ser feito através da pesquisa direta que detecta formas amastigotas do parasita à microscopia óptica. É rápido, de baixo custo e fácil execução, mas possui baixa sensibilidade (40 a 60%), sendo necessária a realização em lesões recentes (MARZOCHI, 1992). Alternativamente pode ser realizada a cultura “*in vitro*”, a partir de material colhido por aspirado de lesão e/ou biópsia, com sensibilidade variável em torno de 50%. Essa metodologia diagnóstica é mais restrita aos centros de pesquisa e necessita de pessoal qualificado para sua execução (WALTON; SHAW; LAINSON, 1977).

No diagnóstico imunológico, a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* é feita, em geral, através dos testes de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), cuja sensibilidade tem como limite o nível de fluorescência que é detectada pelo olho humano, amplificando o sinal e aumentando a sensibilidade; e do Ensaio Imunoenzimático (ELISA), que pode alcançar altos níveis de precisão, considerando as pequenas quantidades de antígenos e anticorpos que podem ser detectadas (BADARÓ; REED, 2001). A RIFI é utilizada na detecção de anticorpos circulantes específicos contra *Leishmania* sp. Em geral, não tem sido eficiente no diagnóstico da leishmaniose cutânea, devido aos baixos níveis de anticorpos (BRYCESON, 1970). O teste de ELISA apresenta grande importância no diagnóstico de lesões extensas,

múltiplas e no diagnóstico precoce de lesões mucosas, e apresenta sensibilidade em torno de 67%. A utilização do teste de Western blot é outra possibilidade diagnóstica, que apresenta uma sensibilidade de 91 % e especificidade superior à RIFI e ao ELISA. Esses testes apresentam como limitação reações cruzadas com os tripanosomatídeos, especialmente com o *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de chagas, e a *Leishmania chagasi*, agente da leishmaniose visceral, de modo que, a recomendação é utilizá-los como complementos a outras metodologias diagnósticas (BADARÓ; REED, 2001; BRITO et al., 2000).

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM), conhecida como teste de hipersensibilidade tardia, também é bastante útil em estudos de prevalência da infecção da doença (BRITO et al., 2000; REIS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2002). É um dos testes mais utilizados no imunodiagnóstico, devido à sua sensibilidade e especificidade, apresentando-se positiva na maioria dos casos de LTA. Contudo, pode ser negativa nos casos de lesões recentes (até seis semanas) e na forma cutâneo-difusa, mas possui significativa sensibilidade nas formas cutânea e mucosa (MENDONÇA et al., 1988). Em lesões ulceradas causadas pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a sensibilidade e especificidade variam em torno de 90%. É freqüente encontrar reatividade a esta prova em população de área de alta endemicidade. Apesar das limitações deste teste, em especial, por não distinguir infecções passadas das recentes, pode ser de valia nos casos em que os parasitas são escassos nas lesões e no diagnóstico de visitantes em áreas endêmicas (KAR, 1995).

Diante das limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais, verificou-se a necessidade de se desenvolver uma ferramenta que fosse capaz de promover um diagnóstico acurado. Nos últimos anos os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em diversas amostras clínicas, isolados de cultura, bem como *pools* de flebotomíneos, havendo destaque para a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) (MICHALSKY et al., 2002). A alta sensibilidade e especificidade, a possibilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, podendo detectar um número baixo de parasitas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (IKONOMOPOULOS et al., 2003). Essa técnica molecular

cada vez mais utiliza como alvo de estudo o DNA mitocondrial (kDNA), localizado na base do flagelo do parasita (BORST; HOEIJMAKERS, 1979); isso é possível porque o kDNA dos tripanosomatídeos possui uma região altamente conservada, o que lhes é característico, cujas variações entre os pares de bases permitem identificar os parasitas em nível de gênero, subgênero e espécie (RODRIGUEZ et al., 1994)

1.5 Tratamento

Apesar da existência de outros quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes. Há dois tipos deles que podem ser utilizados, conforme recomendação da OMS, que são o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio; esse último não é comercializado no Brasil. O Glucantime, no entanto, é a droga de primeira escolha no país. A recomendação da OMS é que a dosagem da droga seja calculada para cada paciente, levando em consideração a massa corpórea do mesmo ($\text{Sb}^{5+}/\text{Kg}/\text{dia}$), sob a observação de não se aplicar doses diárias superiores a 15 mL. As vias de administração do medicamento podem ser intramuscular ou endovenosa, com a recomendação de aplicação lenta e de repouso após a medicação. Nas situações em que o paciente apresenta resistência ao tratamento ou na impossibilidade do mesmo, é recomendável a administração da anfotericina B, droga de segunda escolha, aplicada em ambiente hospitalar, dada a sua toxicidade (BRASIL, 2007).

1.6 Perspectivas de controle

As medidas de controle aplicadas em áreas endêmicas devem levar em consideração características particulares locais. O conhecimento da dinâmica de transmissão da LTA nesses ambientes pode definir a estratégia a ser adotada. O conhecimento da fauna vetora, fonte alimentar, densidade populacional, grau de zoonose e antropofilia, infecção natural e tipo de transmissão (domiciliar, peridomiciliar

ou florestal), podem contribuir para medidas eficazes (MARZOCHI, 1992). É recomendável a adoção de metodologias capazes de identificar espécies parasitárias ali presentes, podendo reduzir o impacto das leishmanioses, especialmente entre as populações carentes.

As iniciativas no desenvolvimento de vacinas também constituem importante avanço para o controle. Não há nenhuma regulamentada no Brasil para uso clínico, seja para imunoprofilaxia ou imunoterapia. Os resultados que vêm sendo obtidos em estudos são promissores, podendo ser aplicados como um procedimento terapêutico alternativo, especialmente nos casos em que o tratamento convencional não é indicado (MAYRINK et al., 2006).

Entre as inovações terapêuticas, pode ser citada a filosseptina, peptídeo isolado da secreção cutânea de pererecas do gênero *Phyllomedusa*. Sua eficiência já foi demonstrada contra fungos e bactérias, e os estudos avançam com resultados laboratoriais significativos tanto para *Leishmania* quanto para o *Plasmodium*. A expectativa, no entanto, é observar o comportamento da filosseptina em cobaias infectados com *Leishmania* (KÜCKELHAUS et al., 2007).

1.7 Justificativa

Esse trabalho se justifica pela necessidade de estabelecer o padrão de transmissão da LTA no município de Ilhéus, Bahia, através da identificação de vetores e das espécies de parasitas envolvidos no ciclo de transmissão.

Espera-se, assim, contribuir na elaboração e execução de medidas efetivas de vigilância epidemiológica nesta região e conseqüente redução na incidência de casos humanos. Para isso, buscou-se reunir dados que auxiliassem no esclarecimento acerca do perfil da enfermidade nas áreas urbana e rural de Ilhéus, objetivando, nesse contexto, caracterizar a transmissão da LTA nas áreas estudadas.

1.8 Objetivos

1.8.1 Geral

Caracterizar o padrão de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Ilhéus, Bahia.

1.8.2 Específicos

- a) Descrever o padrão de ocorrência da LTA entre os anos 2000 e 2006, em Ilhéus, BA;
- b) Avaliar o risco de infecção dos casos notificados da doença, a partir da busca ativa;
- c) Verificar a prevalência da infecção e doença na população humana atendida no Centro de Atenção Especializada (CAE III), da Secretaria Municipal de Saúde;
- d) Identificar a fauna de flebotomíneos na região;
- e) Identificar a *Leishmania* spp. a partir de isolados de amostras de pacientes com lesões suspeitas de LTA;
- f) Contribuir com os serviços de saúde do município através de informações ecoepidemiológicas para a atenção, controle e prevenção da LTA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo

Realizou-se um estudo descritivo, retrospectivo e de análise observacional. Iniciou-se com o estudo retrospectivo, para esclarecer as características da LTA na região. Foi realizado um levantamento das fichas de notificação de LTA do período compreendido entre 2000 e 2006, de informações entomológicas e delimitação das áreas de estudo. Em seguida foi realizada a busca ativa de casos nas áreas urbana e rural com aplicação de questionários, do teste de Intradermorreação de Montenegro e coleta de amostras para o teste de reação de imunofluorescência indireta.

A mesma metodologia foi aplicada nos pacientes atendidos no posto de saúde no período de agosto/2007 a setembro/2009. Adicionalmente, nestes pacientes, foram feitos o exame direto e punção aspirativa em bordas de lesões para a inoculação em hamster (*Mesocricetus auratus*), na tentativa de isolamento do parasito e identificação da espécie através da PCR.

Foi realizada uma pesquisa entomológica com coleta de flebotomíneos em áreas urbana e rural, e exposição de animais sentinelas (hamsters) nas áreas de coleta de flebotomíneos, com posterior análise molecular de pools de flebotomíneos, e de hamsters sentinelas.

2.2 Área de estudo

O município de Ilhéus (14° 50' latitude sul e 39° 06' longitude oeste) está situado na Zona da Mata do estado da Bahia, a 462Km de Salvador, capital do estado (Figura 2). A área possui remanescentes de floresta primária, uma temperatura média anual de 28°C e ampla cobertura voltada para o cultivo do cacau, com clima tropical quente, alta pluviosidade anual (1500-2000mm) e altitude média de 52m, numa área total de 1.841Km² (Figura 3). A população está estimada em

220.144 habitantes. Ilhéus é uma cidade litorânea que se limita ao sul com o município de Una, ao norte com Itacaré e a oeste com Itabuna, com a qual constitui a microrregião sul do estado (SOBRE..., 2009). O cultivo do cacau ainda é a principal fonte agrícola de economia na região, mas na área urbana estão instaladas importantes indústrias e há vários serviços relacionados ao turismo (IBGE, 2009).

O estudo foi realizado em duas áreas: uma localidade rural (Santo Antonio) e um bairro da área urbana (Teotônio Vilela), que distam cerca de 20Km e 4Km do centro da cidade, respectivamente, onde foram notificados casos humanos da doença e a presença de flebotômíneos (Figuras 4, 5 e 6).

Para a escolha das duas áreas, foram levadas em consideração a cobertura vegetal, presença de insetos flebotômíneos e casos humanos. Em se tratando deste último, no entanto, para escolha da área rural a ser trabalhada, foi necessário colher informações no posto de saúde da pretensa localidade, já que as fichas de notificação do município não dispunham da informação acerca da origem rural do paciente.

A busca ativa, bem como a coleta de flebotômíneos, foi realizada no Teotônio Vilela, bairro da área urbana, e na localidade do Santo Antonio, área rural.



Figura 2 - Localização do município de Ilhéus na região sul do estado da Bahia.
Fonte: Bahia (2009).

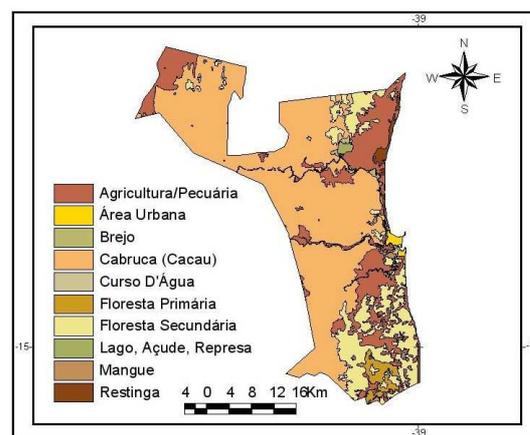


Figura 3 - Mapa de uso do solo do município de Ilhéus, BA.

Fonte: Gentilmente cedido pelo geógrafo Julien Marius Reis Thévenin.



Figura 4 - Vista da área lateral do bairro urbano Teotônio Vilela, Ilhéus, BA.

Fonte: Acervo pessoal.



Figura 5 - Imagem por satélite das áreas central, sul e rural (oeste) do município de Ilhéus, BA.

Fonte: Google earth.



Figura 6 - Rua principal da localidade rural do Santo Antonio, Ilhéus, BA.

Fonte: Acervo pessoal.

2.3 População humana

2.3.1 Busca ativa de casos

Foram avaliadas as fichas de notificações dos 491 casos humanos registrados no período de 2000 a 2006, considerando os resultados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Foram checados os endereços constantes nas fichas de notificações através de busca ativa, no período de Abril a Julho de 2003 e Abril a Outubro de 2006.

Em outro momento foi realizada uma busca ativa dos casos com o diagnóstico de LTA nas localidades selecionadas (34 do Teotônio Vilela e 12 do Santo Antonio); além disso, foram estudados familiares e vizinhos que residem num entorno de 200m de distância dos casos notificados de LTA, visando avaliar o risco de infecção nesses ambientes.

Fizeram parte do estudo indivíduos de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias, e residentes nas duas localidades, sendo submetidos à aplicação de um questionário. A amostra foi constituída de 224 indivíduos, dos quais 147 eram procedentes da área rural (Santo Antonio) e 77 da área urbana (Teotônio Vilela).

2.3.2 Pacientes atendidos em Posto de Saúde

Foi realizado o acompanhamento dos pacientes portadores de lesões ativas sugestivas de leishmaniose que buscaram atendimento no CAE III, no período de Agosto/2007 a Setembro/2009. Dos 234 indivíduos, 131 aceitaram participar da pesquisa, desses 49 eram procedentes da área rural e 82 da área urbana.

2.4 Exames parasitológicos

2.4.1 Pesquisa direta

O exame direto foi realizado após assepsia, com o auxílio de bisturi. Com o material obtido foi feito o esfregaço em lâminas de vidro, fixadas com álcool metílico e corados pelo Giemsa. A visualização de formas amastigotas do parasito foi feita no microscópio óptico com objetiva de 100x.

2.4.2 Punção aspirativa

Foram obtidas amostras de borda de lesões humanas através de aspirado, com utilização de seringa de 1mL, contendo 0,3mL de solução salina, para posterior aplicação via peritoneal em hamsters (*Mesocricetus auratus*) (Figura 7), visando o isolamento de *Leishmania*.



Figura 7 - Aspirado de lesão leishmaniótica de paciente atendido no CAE III, Ilhéus/BA.
Fonte: Acervo pessoal.

2.4.3 Cultura “*in vitro*”

Fragmentos de baços de animais inoculados com material humano, através de punções aspirativas, e de hamsters sentinelas foram mantidas em meio de cultivo Agar Sangue Base. As culturas foram examinadas a cada cinco dias, visando confirmar o isolamento do parasito (WALTON; SHAW; LAINSON, 1977).

2.5 Exames imunológicos

2.5.1 Teste Intradérmico de Montenegro (IDRM)

Os indivíduos foram submetidos à IDRM, com a inoculação de 0,1 mL do antígeno de *Leishmania*, preparado de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa de referência OMS MHOM/BR /73/PH8), na concentração de 40µg/mL de nitrogênio protéico, produzido pela Unidade do Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos do Paraná (CPPI/SESI/PR), de acordo com as instruções do fabricante. O inóculo foi realizado na face do antebraço direito, via subcutânea. A leitura do teste se deu após 48 ou 72 horas, através do método da caneta esferográfica (SOKAL, 1975), considerando-se positiva a endureção resultante de tamanho igual ou superior a 5mm (Figura 8).



Figura 8 - Leitura de reação positiva para o teste Intradérmico de Montenegro em indivíduo da área rural do município de Ilhéus, BA.

Fonte: Acervo pessoal.

2.5.2 Teste de Imunofluorescência Indireta

Amostras de soro de pacientes da busca ativa foram testadas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, através do kit de Imunofluorescência Indireta produzido por Biomanguinhos/ FIOCRUZ, de acordo com as instruções do fornecedor. As amostras foram consideradas positivas quando os títulos correspondentes à diluição foram iguais ou superiores a 1:40.

Por razões de ordem operacional, a análise das amostras dos pacientes atendidos no CAE III foram realizadas no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Foram utilizados antígenos de *L. chagasi*, formas promastigotas crescidas em Meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium 16400) suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos (penicilina e esptreptomicina) e hemina. O título do conjugado (Sigma IgG total) foi de 1:32 e a diluição do soro inicial foi de 1:40 como recomenda o Ministério da Saúde.

2.6 Pesquisa entomológica

2.6.1 Captura de flebotomíneos

As capturas foram realizadas nas localidades de estudo durante o período de Agosto/2007 a Setembro/2009, com duração de dois dias em cada área, a cada mês. Os insetos foram capturados no intra, peri e extradomicílio, com armadilhas luminosas do tipo CDC, em cada ambiente, instaladas às 18:00h a 1,5m de altura do solo, e retiradas às 06:00h do dia seguinte (Figura 9). Foram utilizados capturadores manuais tipo Castro, na tentativa de coletar um número maior de fêmeas para dissecação, que foram mantidas vivas para o procedimento (Figura 10). Os flebotomíneos foram transportados em gaiolas de náilon mantidas em sacos plásticos, contendo chumaços de algodão embebidos em água para manter a temperatura e umidade, mantidas em caixa de poliestireno (isopor) e levadas para o

laboratório do Núcleo de Entomologia da 6ª Dires, Ilhéus, BA. Em seguida os exemplares foram devidamente armazenados em álcool 70%, clarificados em KOH e montados em Berlese para identificação através da sistemática de Young e Duncan (1994), além de armazenamento em pools para posterior análise molecular. A dissecação das fêmeas foi baseada na técnica utilizada por Arias e Freitas (1978).



Figura 9 - Instalação de armadilha do tipo CDC em galinheiro da área rural de Ilhéus, BA. Fonte: Acervo pessoal.



Figura 10 - Coleta de insetos flebotomíneos com a utilização de capturador manual de Castro na área rural de Ilhéus, BA. Fonte: Acervo pessoal.

2.6.2 Exposição de animais sentinelas

Um hamster sentinela, foi exposto por noite de coleta, em gaiola do tipo ratoeira, estrategicamente instalada a 1,5m de altura do solo, nos locais de maior densidade de captura de flebotomíneos, para uma possível infecção natural (Figura 11). Esses animais foram acompanhados por cerca de nove meses e eutanasiados em câmara de CO₂. Amostras de baço foram inoculadas em meio de cultivo Agar Sangue Base para isolamento de *Leishmania*, como descrito por Walton, Shaw e Lainson (1977). Adicionalmente, foi realizado o exame parasitológico direto por microscopia óptica de imprint de baço e esfregaço de sangue de fragmento de fígado.



Figura 11 - Exposição de hamster sentinela à picada de insetos flebotomíneos na área rural de Ilhéus, BA.

Fonte: Acervo próprio.

2.7 Método molecular

2.7.1 Extração e purificação de DNA

Foram realizadas extrações de DNA genômico de 126 amostras de fragmentos de baços de hamsters, e 50 amostras de pools de 20 exemplares de flebotomíneos. O protocolo de extração de DNA seguiu a recomendação do fabricante (Illustra™, tissue & cells genomicPrep Mini Spin kit, 28-9042-75). A concentração final de DNA de cada amostra foi quantificada através de espectrofotômetro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotec). Na análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizados primers específicos para o subgênero *Viannia*, utilizando como alvo a região do mini-círculo do kDNA, de acordo com De Bruijn e Barker (1992), os quais amplificam um fragmento de 750 pb: B1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3').

2.7.2 PCR específica para o subgênero *Viannia*

A mistura básica de reação foi constituída de 4µL de tampão de PCR (10X) + MgCl₂ (25 mM); 2,5µ da solução de dNTPs (2mM cada); 5µL do par de primers (10 pmoles/µL – B1 e B2, subgênero *Viannia*); 0,5µL de Taq polimerase (5 U/mL); e água q.s.p. 23 µL. A essa mistura foram adicionados 2µL da amostra a ser analisada, totalizando 25 µL.

O material foi submetido às seguintes etapas de amplificação: um ciclo de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos (94°C por 30 seg., 65°C por 1 min. e 72°C por 1 min). Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989).

2.8 Análise estatística dos resultados

As variáveis estudadas foram: sexo, faixa etária, tempo de residência, teste diagnóstico e passagem pela área rural daqueles residentes em área urbana. Foi realizada uma análise descritiva dos resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas ou gráficos, incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mínimo, máximo, média e desvio padrão. A análise comparativa das variáveis qualitativas foi realizada através do teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher. Todas as conclusões foram tomadas em nível de significância de 5%.

2.9 Considerações éticas

Para as capturas dos insetos em domicílio, os responsáveis pelas residências, desde que maiores de idade, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), bem como os maiores de idade foram submetidos à avaliação epidemiológica (Apêndices A, D e E); da mesma forma, concordaram em

conceder informações através de questionário e material biológico para a pesquisa (Apêndice F). Aqueles menores de idade tiveram a permissão do responsável (Apêndices B e C). Esse estudo foi desenvolvido seguindo as normas que regulamentam pesquisas com seres humanos, aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães, unidade FIOCRUZ – PE, conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde/MS (Apêndice J). Por fazer parte do programa nº P.0174-03 e estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo COBEA, teve a permissão da Comissão de Ética em Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA – FIOCRUZ) (Apêndices K e L).

3 RESULTADOS

3.1 Notificação dos casos humanos de Ita no período de 2000 a 2006

Um total de 491 notificações de casos humanos foi registrado entre os anos 2000 e 2006, onde 97,35% corresponderam à forma cutânea da doença, e 2,65% à forma mucosa. Na análise dos prontuários disponíveis referentes a esse período, 112 casos foram registrados como de procedência rural e 379 de origem urbana, com um quantitativo anual demonstrado na tabela 1. Apenas 13,12% das residências foram localizadas na busca ativa realizada em área urbana, já que os dados referentes à área rural não permitiram a busca.

Tabela 1 - Distribuição anual de casos humanos de Leishmaniose Tegumentar Americana notificados nas áreas urbana e rural de Ilhéus, BA, proporção de casos, população e coeficiente de detecção, nos anos 2000 a 2006.

CASOS HUMANOS						
ANOS	Urbano		Rural		POPULAÇÃO	COEFICIENTE DE DETECÇÃO
	N	%	N	%		
2000	39	10,3%	18	16,1%	222.127	25,7
2001	75	19,8%	19	17,0%	221.654	42,4
2002	108	28,5%	09	8,0%	221.786	52,8
2003	77	20,3%	18	16,1%	221.627	42,9
2004	70	18,5%	22	19,6%	221.294	41,6
2005	05	1,3%	15	13,4%	221.110	9,1
2006	05	1,3%	11	9,8%	220.932	7,2
TOTAL	379	100,0	112	100,0	-	-

Fonte: Vigilância Epidemiológica, Ilhéus, BA.

As fichas de notificação apresentavam campos incompletos, notadamente aqueles referentes ao endereço do paciente. Dos casos registrados, os pacientes foram submetidos à avaliação clínico-laboratorial, através da IDRM e/ou à avaliação clínico-epidemiológica.

Considerando as informações a partir da avaliação das fichas e a localização das residências, bem como a cobertura vegetal e registro da presença de flebotomíneos, decidiu-se por realizar a busca ativa no bairro Teotônio Vilela (área urbana), um dos mais populosos de Ilhéus, que apresentou o segundo maior número de casos de LTA no período entre 2000 e 2006; e na localidade do Santo Antonio (área rural).

3.2 Busca ativa dos casos notificados de LTA

Para realização da busca ativa na área rural foram investigados 12 indivíduos, cujos nomes e endereços foram cedidos pelo serviço de saúde local, acompanhados desde 2002, quando da implantação do PSF (Posto de Saúde da Família). Desses, seis pacientes foram estudados. Os demais, dois não foram encontrados, três mudaram de residência para outra localidade e um faleceu de causa desconhecida. Na área urbana foram investigados 29, mas estudados 05 indivíduos; os demais 24 não foram localizados porque as informações das fichas de notificação não eram claras.

O total de indivíduos submetidos ao estudo, em áreas rural e urbana, foi de 224 pessoas, entre casos humanos registrados, familiares e vizinhos residentes num entorno de 200m. Na área rural, 147 deles concordaram em participar da pesquisa. A maior proporção de indivíduos estudados estava nas faixas etárias entre 11 e 20 anos (Gráfico 1). Apesar dos seis registros de casos humanos mencionados pelo PSF local, 27 indivíduos se declararam como casos para LTA, sem que necessariamente houvesse a confirmação municipal. Entre eles 59,25% possuíam cicatrizes cutâneas compatíveis com a doença. Destes, apenas 4,08% obtiveram resultados positivos simultâneos em ambos os testes (IDRM e RIFI).

Na área urbana, 77 pessoas foram submetidas ao estudo. A maior proporção de indivíduos estudados estava nas faixas etárias entre 11 e 20 anos (Gráfico 2). Entre esses, 05 eram casos notificados e assim se declararam em resposta ao questionário. Todos apresentavam cicatrizes de LTA e se mostraram positivos simultaneamente aos dois testes (IDRM e RIFI).

Todos os duzentos e vinte e quatro (224) indivíduos concordaram em

responder ao questionário e permitiram a coleta de amostra de sangue para a realização da RIFI. Daqueles submetidos a esse teste e que reagiram ao mesmo, 17,01% eram de procedência rural e 20,78% da urbana (Tabela 2).

Do total daqueles estudados, duzentos e dezenove (219) concordaram em ser submetidos à IDRM, dos quais 18,06% apresentaram positividade e eram residentes da área rural, enquanto 14,67% dos positivos eram da área urbana. Quando foram comparados os resultados da IDRM e da RIFI, entre os indivíduos das áreas rural e urbana, não houve diferença estatística significativa (Tabela 2).

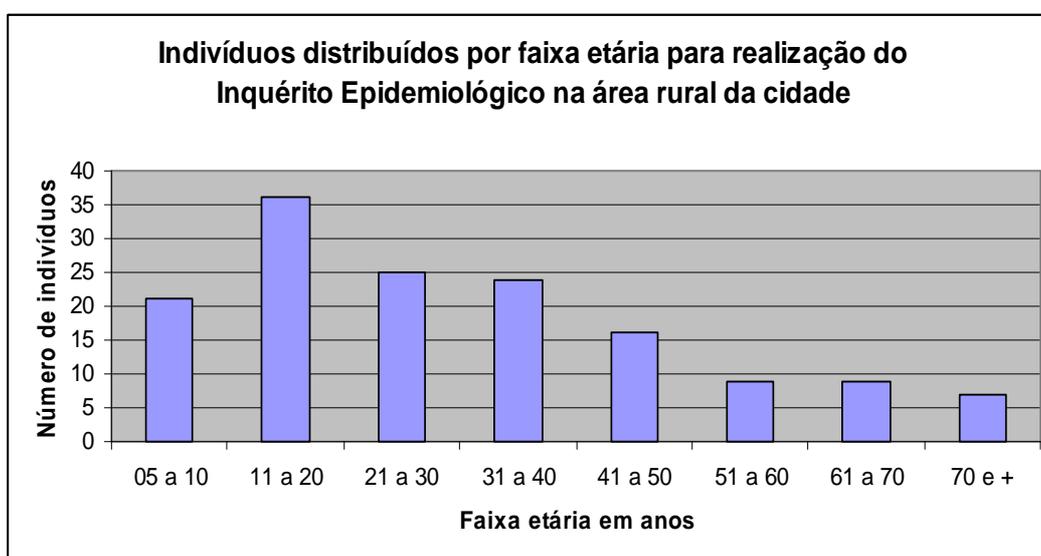


Gráfico 1 – Distribuição dos indivíduos de diferentes faixas etárias que concordaram em participar do inquérito epidemiológico na área rural do município de Ilhéus, BA.

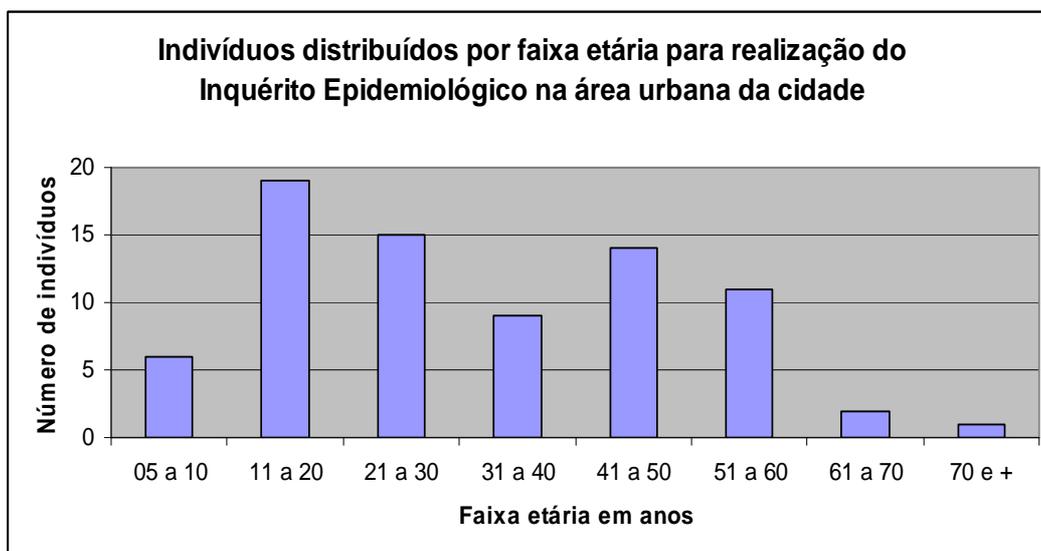


Gráfico 2 – Distribuição dos indivíduos de diferentes faixas etárias que concordaram em participar do inquérito epidemiológico na área urbana do município de Ilhéus, BA.

Tabela 2 - Distribuição dos resultados da Intradermoreação de Montenegro e Imunofluorescência indireta entre os indivíduos residentes nas áreas urbana e rural de Ilhéus, Bahia.

Teste	Área de residência				p-valor
	Rural		Urbano		
	N	%	N	%	
IDRM					
Negativo	118 (144)	81,94	64 (75)	85,33	0,6562
Positivo	26 (144)	18,06	11 (75)	14,67	
RIFI					
Negativo	122 (147)	82,99	61 (77)	79,22	0,6090
Positivo	25 (147)	17,01	16 (77)	20,78	

Ao comparar os resultados dos testes de IDRM e RIFI entre indivíduos dos sexos masculino e feminino, foi observado que também não houve diferença significativa nesse universo amostral (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre sexos e o resultado da Intradermoreação de Montenegro e Imunofluorescência indireta entre os indivíduos residentes nas áreas urbana e rural de Ilhéus, Bahia.

Sexo	IDRM				RIFI			
	Negativo		Positivo		Negativo		Positivo	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Feminino	108 (182)	59,34	19 (37)	51,35	111 (183)	60,66	20 (41)	48,78
Masculino	74 (182)	40,66	18 (37)	48,65	72 (183)	39,34	21 (41)	51,22

Aqueles residentes em área urbana foram questionados quanto à visita à área rural por período igual ou superior a um dia. Entre os 77 entrevistados, onze apresentaram positividade pela IDRM, e, entre estes últimos, sete admitiram que freqüentaram a área rural. Houve diferença estatística significativa comparando os resultados positivo e negativo através desse teste, ao contrário do que foi verificado com os resultados das amostras com o teste da RIFI (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição de indivíduos residentes em área urbana, submetidos à Intradermoreção de Montenegro e à Reação de Imunofluorescência Indireta quanto ao deslocamento para área rural em Ilhéus, Bahia.

<u>Contato com a área rural</u>	<u>IDRM</u>				<u>p-valor</u>
	<u>Positivo</u>		<u>Negativo</u>		
	<u>N</u>	<u>%</u>	<u>N</u>	<u>%</u>	
Sim	7 (11)	63,64	0 (64)	0,00	< 0,0001
Não	4 (11)	36,36	64 (64)	100,00	
<u>Contato com a área rural</u>	<u>RIFI</u>				<u>p-valor</u>
	<u>Positivo</u>		<u>Negativo</u>		
	<u>N</u>	<u>%</u>	<u>N</u>	<u>%</u>	
Sim	3 (16)	18,75	4 (61)	6,56	0,1523
Não	13 (16)	81,25	57 (61)	93,44	

3.3 Pacientes submetidos aos testes diagnósticos no CAE III

Duzentos e trinta e quatro (234) indivíduos foram encaminhados ao laboratório do CAE III, com lesões sugestivas de LTA; destes, 131 concordaram em participar da pesquisa. Houve 44% (58) de positividade para pelo menos um dos testes realizados. Notou-se que 71% (93) possuíam lesões ativas nos membros inferiores e 16% (21) possuíam cicatrizes compatíveis com a doença; entre estes últimos, todos positivaram para pelo menos um dos testes realizados. O sexo masculino foi o mais acometido, respondendo com 67,2% e, entre o sexo feminino, 32,8% (Gráfico 3). Os que constavam como originários da área urbana constituíram 58,6%; mas, entre estes, 79,4% (27) visitaram a área rural por período igual ou superior a um dia.

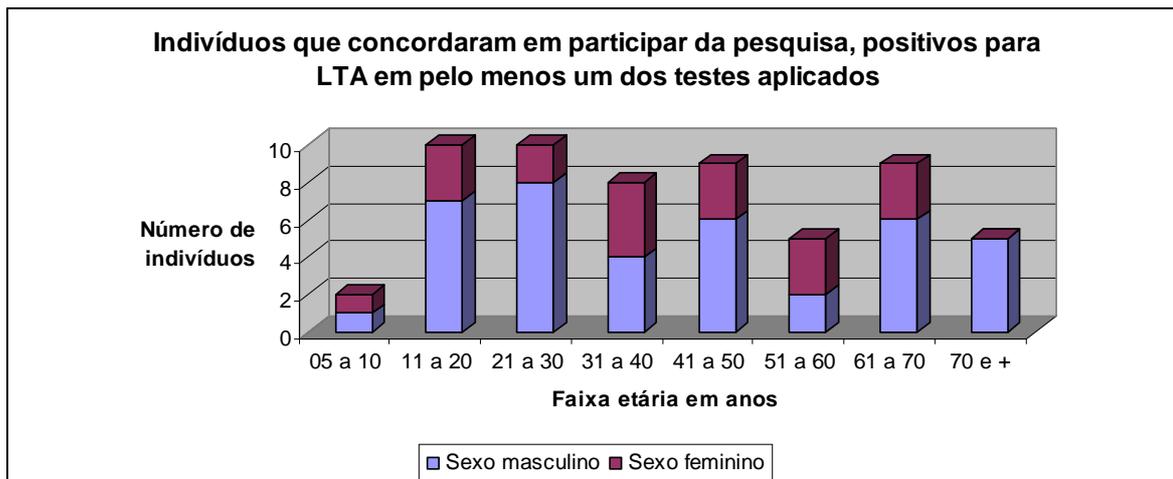


Gráfico 3 – Distribuição dos indivíduos de diferentes faixas etárias, separados por sexo, que concordaram em participar da pesquisa e que foram considerados positivos para LTA por pelo menos um dos testes (IDRM, RIFI e exame direto)

Entre agosto de 2007 e setembro de 2009, o município de Ilhéus notificou 134 casos de LTA. Do total de casos notificados, 43,3% (58) concordaram em participar da pesquisa. Maior número de casos foi registrado no sexo masculino e em maiores de 11 anos de idade (Gráfico 4). Nesse grupo de pesquisados, 46,5% (27) residiam na área urbana, onde 77,7% (21) foram positivos em pelo menos um dos testes realizados e, ainda entre estes últimos, a porcentagem dos que visitaram a área rural foi de 81% (17).

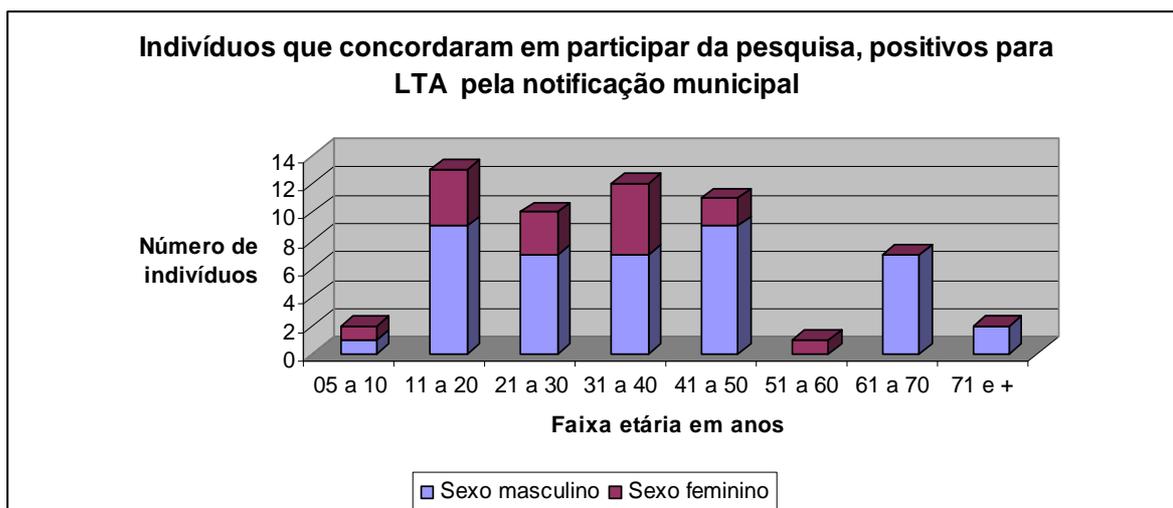


Gráfico 4 – Distribuição dos indivíduos de diferentes faixas etárias, separados por sexo, que concordaram em participar da pesquisa e que foram considerados positivos para LTA através de notificação do município de Ilhéus, BA, no período de Agosto de 2007 a Setembro de 2009.

Do total dos 131 indivíduos pesquisados no CAE III, considerando cada teste realizado (IDRM, RIFI e Exame direto) em separado, constatou-se que a IDRM apresentou os maiores índices de positividade. Nessa situação, 96 indivíduos concordaram em se submeter à IDRM, com 46,9% de positividade; ao passo que 105 e 121 realizaram a RIFI e o exame direto, com 22,9% e 24,8% de positividade, respectivamente (Gráfico 5). A realização dos três testes simultaneamente se deu em 53,4% (70) dos indivíduos, com positividade simultânea de 11,42% (08).

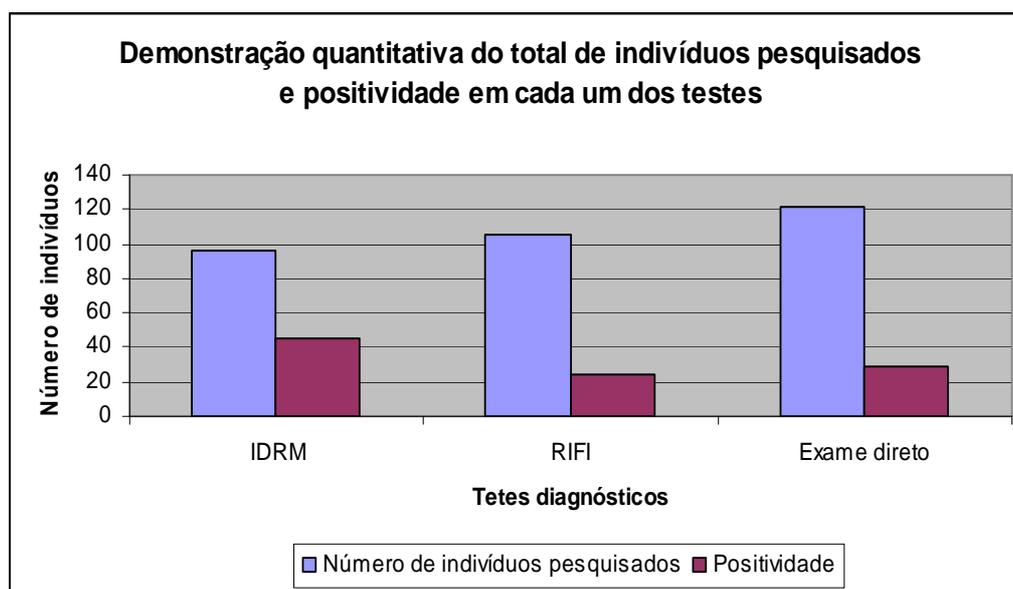


Gráfico 5 - Indivíduos pesquisados quanto à positividade nos testes de IDRM, RIFI, e Exame direto, atendidos no posto de saúde do CAE III do município de Ilhéus, BA, no período de Agosto de 2007 a Setembro de 2009.

Considerando as áreas em separado, a área urbana concentrou 62,6% (82) da população de estudo com ocupações diversas e média de idade de 41,5 anos, 61% (50) do sexo masculino e 39% (32) do sexo feminino. O tempo médio de residência foi de 15,56 anos e, entre os 47 (57,3%) indivíduos que declararam visita à área rural, 27 (57,44%) foram positivos para pelo menos um dos testes. Considerando o total da área urbana, 21,25% (10) já tinham registro de notificação prévia da LTA, dois dos quais sem passagem rural.

Entre os 35 indivíduos que afirmaram não ter estado em área rural, 20% (07) apresentaram pelo menos um dos testes positivos, dos quais dois declararam-se reincidentes da doença. Ambos foram notificados como casos autóctones de leishmaniose pelo município, mas apenas um deles positivou na IDRM, exame direto e RIFI, simultaneamente; o segundo caso, entretanto, negativou na IDRM e no

exame direto, e não concedeu permissão para coleta do soro para o procedimento da RIFI (Tabelas 5 e 6).

A população de estudo residente na área rural se constituiu de 37,4% (49), 40,8% (20) dos quais eram trabalhadores rurais, sendo 40% (08) deles positivos para pelo menos um dos testes aplicados. A média foi de 38,4 anos de idade, 61,2% (30) do sexo masculino e 38,8% (19) do sexo feminino. O tempo médio de residência foi de 19,4 anos, onde 22,45% declararam reincidência para a enfermidade, três dos quais positivaram para pelo menos um dos testes realizados (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Distribuição das variáveis de indivíduos residentes nas duas áreas estudo, considerando a idade, renda expressa em salário mínimo, tempo de residência expresso em dias e resultado da IDR. M.

VARIÁVEIS	N	Min	Max	Media	Desvio
Idade (anos)	129	5	91	40,3	20,4
Renda (R\$)	110	0,22	8	1,5	1,3
Tempo de Residência (dias)	129	7	22630	6138,97	5718,31

Tabela 6 - Distribuição das variáveis de indivíduos residentes em áreas urbana e rural, considerando a residência, casos já anteriormente notificados como leishmaniose, casos notificados pelo município, resultado RIFI e resultado do exame direto.

VARIÁVEIS	N	%
(continua)		
Residência		
Rural	49	37,4
Urbana	82	62,6
Visita à área rural		
Não	35	42,7
Sim	47	57,3
Casos anteriormente notificados como leishmaniose		
Não	110	84,0
Sim	21	16,0
Notificação do município no período de estudo		
Não	73	55,7
Sim	58	44,3

Tabela 6 - Distribuição das variáveis de indivíduos residentes em áreas urbana e rural, considerando a residência, casos já anteriormente notificados como leishmaniose, casos notificados pelo município, resultado RIFI e resultado do exame direto.

VARIÁVEIS	(conclusão)	
	N	%
Resultado IDR		
Negativo	51	53,1
Positivo	45	46,9
Resultado RIFI		
Negativo	81	77,1
Positivo	24	22,9
Exame direto		
Negativo	91	75,2
Positivo	30	24,8

Na análise do quantitativo de casos de LTA notificados anualmente no município desde o ano 2000 até o término das atividades dessa pesquisa em Setembro de 2009, foi possível demonstrar, através do gráfico 6, a variação das notificações.

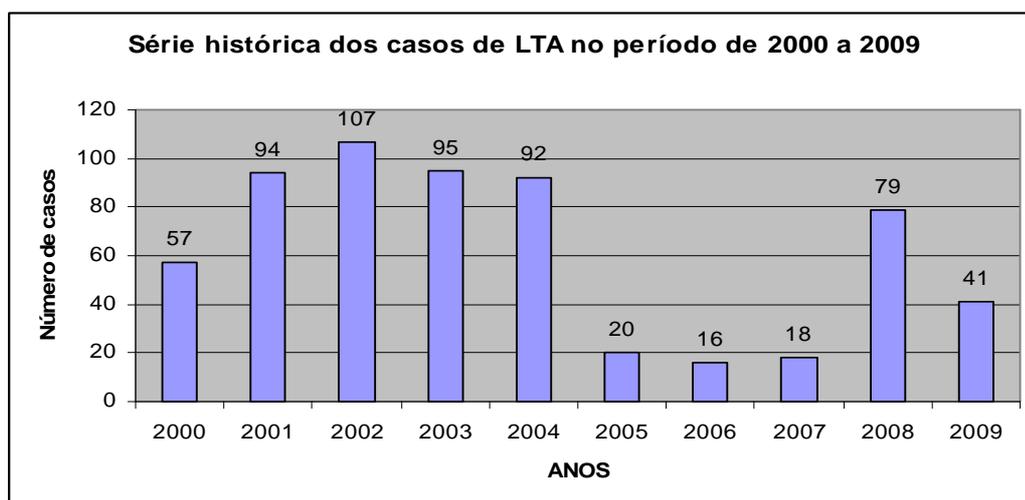


Gráfico 6 - Distribuição anual de casos humanos notificados no período compreendido entre Janeiro de 2000 e Setembro de 2009 no município de Ilhéus, BA.

3.4 Isolamento de *leishmania*

Cento e vinte e seis fragmentos de baços de animais inoculados com material de hamsters sentinelas (42) e amostras clínicas de pacientes (84), representadas por punções aspirativas, foram utilizadas para o isolamento de *Leishmania*. Dos inoculados com amostras de pacientes, um apresentou ascite e hepatoesplenomegalia, sendo imediatamente eutanasiado quatro meses após o inóculo; e um outro hamster apresentou lesão ulcerativa na genitália, sendo eutanasiado aos três meses e meio da data do inóculo. A tentativa de isolamento do parasito em meio de cultivo NNN e o exame microscópico direto em imprints de baço e esfregaço de sangue de fragmento de fígado foram negativos. Foi realizada biópsia da lesão ulcerada de um deles e também mantida em meio de cultivo. Nenhum dos 42 hamsters sentinelas apresentou positividade nos testes parasitológicos. No entanto, foi possível observar formas amastigotas presentes em três das 84 amostras de animais inoculados com material humano através de esfregaço, dois residentes da área rural e um da área urbana, mas com passagem pela área rural do município. O quantitativo referente aos hamsters sentinelas se justifica pela impossibilidade da realização de algumas idas ao campo, em virtude da dificuldade de acesso às localidades (Anexos A, B, C) e à fuga de alguns desses animais.

3.5 Diagnóstico molecular

3.5.1 Concentração de DNA genômico

A extração de DNA genômico a partir dos pools de amostras de tecido de insetos flebotomíneos e das vísceras de hamsters revelou, respectivamente, uma média de 1,04 e 5,74 µg desse ácido nucléico (gráficos 7 e 8).

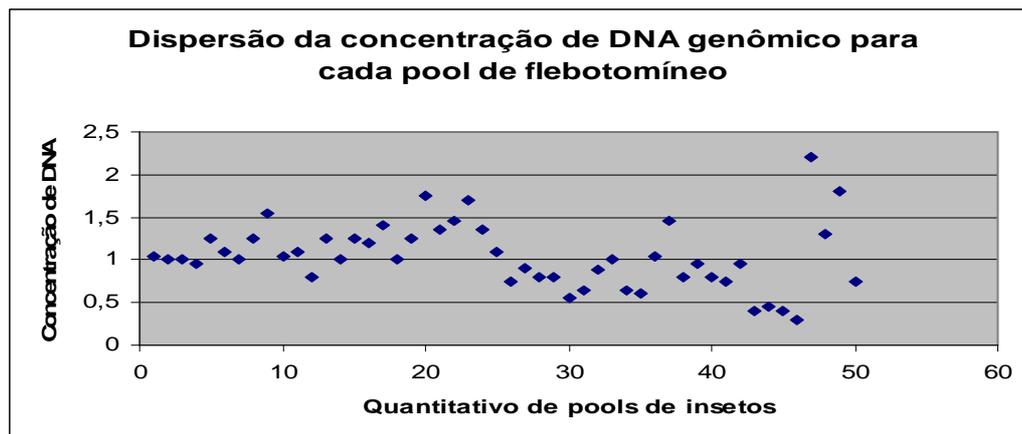


Gráfico 7 - Concentração de DNA genômico extraído de pools de insetos flebotomíneos coletados na área rural do município de Ilhéus, BA.

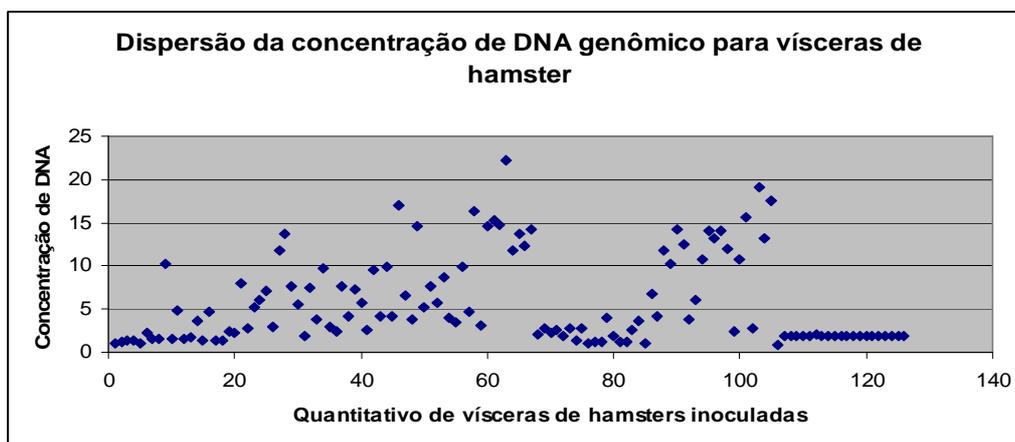


Gráfico 8 - Concentração de DNA genômico extraído de vísceras de hamsters inoculados com material puncionado de pacientes atendidos no CAE III, Ilhéus, BA.

3.5.2 Determinação do limiar de detecção de DNA para o subgênero *Viannia* baseada na abordagem por PCR

A sensibilidade do diagnóstico foi testada através da técnica de PCR. O limiar de detecção de DNA da PCR específica para *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/-2903) no presente estudo foi de 1 pg, gerando produtos de amplificação de 750 pb, com seta indicativa na figura 12.

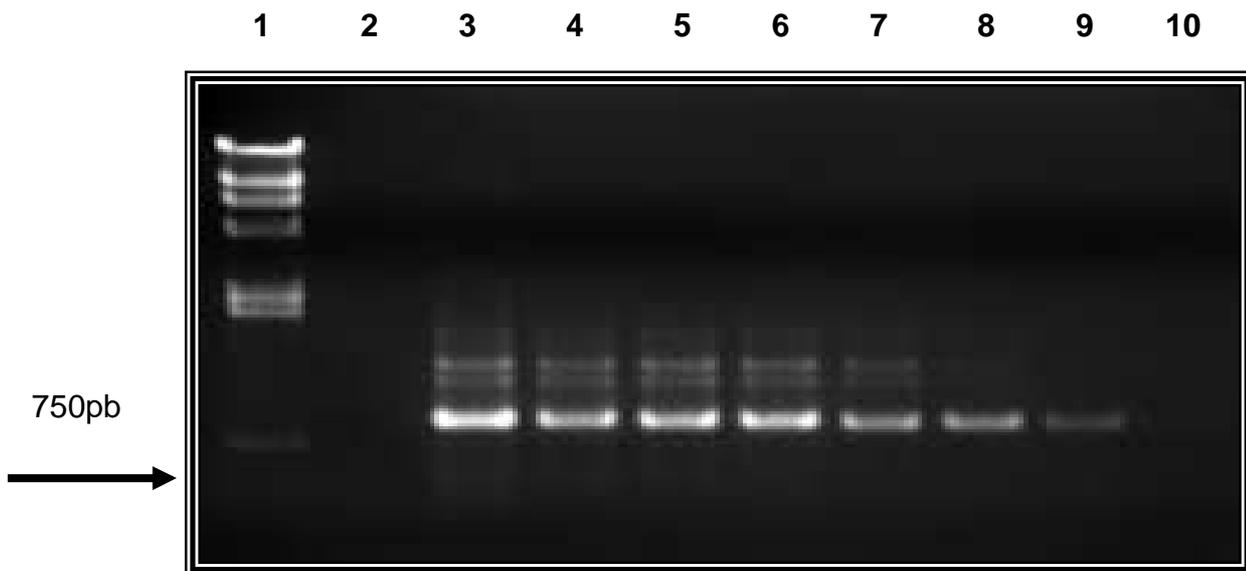


Figura 12 - Limiar de detecção utilizando primers específicos para o subgênero *Viannia*: 1. Marcador de peso molecular λ + Hind III (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0; 2 0,56 kb); 2. Controle negativo; 3 – 10. Amostras de cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em diluições decrescentes: 920ng, 100ng a 10^{-4} ng de DNA.

3.5.3 Eletroforese em gel de agarose a 1% para revelação dos produtos amplificados na reação de PCR

Foram analisados 50 pools de amostras de tecido de insetos flebotomíneos e 126 vísceras de hamsters (42 sentinelas e 84 de material humano). Nenhum pool de flebotomíneo apresentou perfil de bandas na análise eletroforética; entretanto, duas das 84 amostras de hamsters, ambas de punção aspirativa de pacientes oriundos da área rural do município, uma das quais positiva ao esfregaço hepático, foram compatíveis com LTA. Vide seta indicativa para banda positiva na Figura 13.

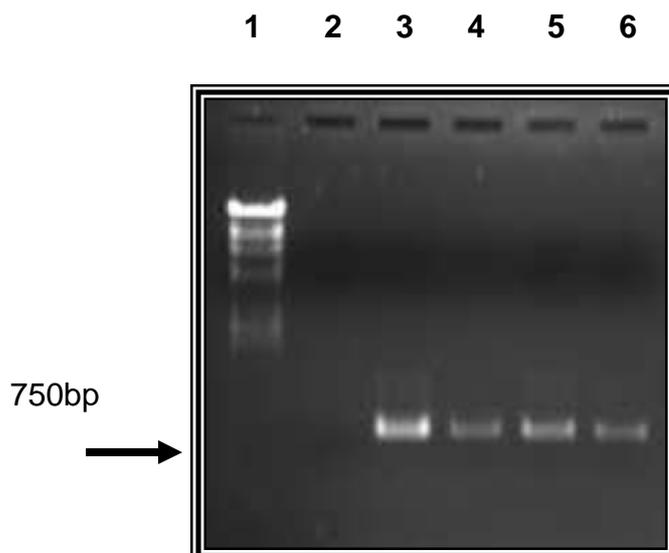


Figura 13 - Eletroforese em gel de Agarose a 1% corada com brometo de etídio, revelando os produtos de amplificação via PCR, na pesquisa de parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia*. 1. Marcador de peso molecular λ + Hind III (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0; 2 0,56 kb); 2. Controle negativo; 3. Controle positivo forte (1ng); 4. Controle positivo fraco (10^{-4} ng); 5 e 6. Amostras positivas para parasitos do subgênero *Viannia*.

3.6 Fauna flebotomínea nas áreas de coleta

No período de Julho de 2007 a Setembro de 2009 foram capturadas 18 espécies de flebotomíneos nas áreas de estudo do município de Ilhéus, nos ambientes intra, peri e extradomiciliares (Tabelas 7 a 11). Foram identificados 6.439 exemplares na área rural e 14 na área urbana, com o auxílio de capturadores do tipo CDC; contudo, nenhum exemplar foi encontrado no intradomicílio da área urbana. Adicionalmente, 1528 fêmeas foram capturadas com armadilhas tipo tubo de Castro e dissecadas, mas nenhuma apresentou positividade para parasitos do gênero *Leishmania*. Face ao reduzido número de exemplares capturados na área urbana da cidade, não houve dissecação de fêmeas oriundas desse ambiente.

As médias máximas de umidade relativa do ar foram de 81% em área rural e de 82% em área urbana. As temperaturas tiveram as suas médias máximas em 26,5% e 27%, respectivamente. O volume de chuva dos meses em que as coletas não foram realizadas está expresso nos mapas dos anexos de A, B e C, com as respectivas setas indicando a localização do município de Ilhéus, BA (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2009).

Tabela 7 - Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados no extradomicílio da área urbana do município de Ilhéus (♂= machos; ♀= fêmeas).

Espécies	2007		2008		2009		TOTAL
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	-	-	-	02	02	01	05
<i>Lutzomyia fischeri</i>	-	-	-	-	02	-	02
<i>Lutzomyia viannamartinsi</i>	-	-	-	-	01	01	02
<i>Lutzomyia longispina</i>	-	-	-	-	01	-	01
Total	00	00	00	02	06	02	10

Tabela 8 - Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados no peridomicílio da área urbana do município de Ilhéus (♂= machos; ♀= fêmeas).

Espécie	2007		2008		2009		TOTAL
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	-	-	01	-	02	01	04
Total	00	00	01	00	02	01	04

Tabela 9 - Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados no extradomicílio da área rural do Santo Antonio, Ilhéus, BA. (♂= machos; ♀= fêmeas).

Espécies	2007		2008		2009		TOTAL
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Lutzomyia whitmani</i>	164	197	148	183	739	814	2.245
<i>Lutzomyia fischeri</i>	126	152	59	94	178	153	762
<i>Lutzomyia choti</i>	13	18	18	24	24	31	128
<i>Lutzomyia migonei</i>	11	09	14	12	18	14	78
<i>Lutzomyia davisii</i>	09	-	14	-	09	04	36
<i>Lutzomyia longispina</i>	-	-	06	04	02	03	15
<i>Lutzomyia salesi</i>	01	-	01	01	04	07	14
<i>Lutzomyia lutziana</i>	01	01	-	04	02	03	11
<i>Lutzomyia barretoii</i>	01	02	-	03	01	02	09
<i>Lutzomyia shannoni</i>	-	01	-	01	-	02	04
<i>Lutzomyia yuilli yuilli</i>	-	-	-	-	-	04	04
<i>Lutzomyia lanei</i>	01	-	-	-	01	-	02
<i>Lutzomyia pessoai</i>	-	-	01	-	01	-	02
<i>Lutzomyia edwardsi</i>	-	-	-	01	-	-	01
<i>Lutzomyia missionensis</i>	-	-	-	-	-	01	01
<i>Lutzomyia oswaldoi</i>	-	-	01	-	-	-	01
Total	327	380	262	327	979	1.038	3.313

Tabela 10 - Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados no peridomicílio da área rural do Santo Antonio, Ilhéus, BA. (♂= machos; ♀= fêmeas).

Espécies	2007		2008		2009		TOTAL
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Lutzomyia whitmani</i>	25	43	142	138	459	815	1.622
<i>Lutzomyia fischeri</i>	249	272	124	51	237	164	1.097
<i>Lutzomyia choti</i>	43	19	36	23	88	47	256
Total	317	334	302	212	784	1.026	2.975

Tabela 11 - Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados no intradomicílio da área rural do Santo Antonio, Ilhéus, BA. (♂= machos; ♀= fêmeas).

Espécies	2007		2008		2009		TOTAL
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Lutzomyia fischeri</i>	16	04	12	07	19	14	72
<i>Lutzomyia choti</i>	07	13	11	09	09	17	66
<i>Lutzomyia whitmani</i>	04	-	02	-	06	01	13
Total	27	17	25	16	34	32	151

4 DISCUSSÃO

O problema da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil perdura há tempos e ganhou maiores proporções na década de 1940, onde fatores como construção de rodovias e desenvolvimento da agricultura influenciaram os movimentos migratórios (BARRETO, 1967). Vale ressaltar o perigo representado pelos desmatamentos desordenados e ruralização das periferias de cidades em áreas endêmicas. Ademais, movimentos migratórios ligados à cultura itinerante e industrial extrativista também contribuíram para uma maior dispersão dessa endemia, tendo em vista o movimento constante entre trabalhadores, cuja rotina era viajar pelo Brasil. De fato, na extensa área de Mata Atlântica do município de Ilhéus, onde estão fixadas as fazendas de cacau (*Theobroma cacao*), antes doadas pelo governo, na tentativa de fazer emergir a economia no começo do século XX, é possível que o estabelecimento dos imigrantes tenha sido essencial para dispersão da enfermidade e manutenção em definitivo do ciclo biológico da leishmaniose, já que se fazia presente em ambiente antes reservadamente silvestre. A economia foi impulsionada com a chegada de pessoas vindas de toda parte do Brasil às expensas do aumento de forma surpreendente da população, transformando o aspecto da região (HEINE, 2003).

A LTA é conhecida em Ilhéus desde o início do século XIX (FOLLADOR et al., 1999). A partir de então, casos humanos são rotineiramente notificados, contribuindo significativamente com os registros do estado da Bahia. No ano de 1994, conforme informações do serviço municipal de saúde, o município apresentou um surto de 894 casos da doença em área urbana, o que causou maior atenção e preocupação para com a enfermidade (CARVALHO et al., 2006). Esse, no entanto, é o único registro de surto de que se tem notícia na cidade.

É possível notar em regiões endêmicas de leishmaniose tegumentar, em áreas onde circula a *L. (V) braziliensis*, uma maior prevalência da forma cutânea da doença sobre a forma mucosa, a exemplo do que foi constatado em Ilhéus, no período de 2000 a 2006. De acordo com Barretto et al. (1981), em estudo realizado na localidade de Três Braços, região da Mata Atlântica do sul do estado da Bahia, foi identificada uma maior proporção de casos da forma cutânea (67,1%), seguida da forma mucosa (32,9%). Outra pesquisa, realizada em Canoa, cidade de Santo

Amaro na Bahia, a ocorrência de lesões cutâneas foi de 79,3%, e as lesões mucosas seguiram os padrões anteriores, apresentando menores proporções (17,2%). Adicionalmente, referem-se à aparição da forma disseminada, com apenas um caso, revelando uma proporção de 3,4%, associada à lesão mucosa (FOLLADOR et al.,1999).

Com o objetivo de conhecer perfis epidemiológicos da LTA em diferentes regiões, são necessários estudos de caracterização para o esclarecimento do ciclo de transmissão em regiões endêmicas. Para isso, deve-se conhecer a fauna flebotomínea local, o(s) possível(s) reservatório(s), espécie(s) de *Leishmania* circulante(s) e endemicidade local com monitoramento de casos humanos (BRASIL, 2007).

A utilização de métodos de busca de indivíduos é amplamente utilizado pelos serviços de saúde para diferentes enfermidades. A busca ativa de casos humanos se caracteriza como uma forma de descoberta de novos casos, baseando-se na visita de técnicos às residências e no encaminhamento dos casos suspeitos aos profissionais de saúde. As técnicas ativas permitem não só visitas às áreas suspeitas com regularidade, como também monitora os possíveis problemas que possam ocorrer na localidade (BRASIL, 2007). Some-se a isso, a possibilidade de avaliar informações epidemiológicas, funcionando como elemento inicial esclarecedor quanto à origem/endereço de um paciente. O achado de apenas 13,12% das residências dos casos notificados em área urbana entre os anos 2000 e 2006 em Ilhéus, apontam “fragilidade das informações” contidas nas fichas do sistema de agravos de notificação compulsória (SINAN) de pacientes. É possível, com base no exposto, que pacientes oriundos de área rural informassem endereço urbano de algum familiar ou fictício; ou indivíduos de outros municípios se apresentassem como naturais de Ilhéus, já que no passado, em período anterior ao ano de 2004, apenas a estes era prestado atendimento. “Hoje, é obrigatório o atendimento a todo e qualquer cidadão que busque o serviço, dando-lhe a tranqüilidade em informar o município de origem e salvaguardado o direito de ser atendido”¹ (informação verbal). Por outro lado, há também a possibilidade de ter adquirido a doença em outra área na qual tenha pernoitado, por exemplo, e não relatado no momento do inquérito epidemiológico; além disso, também há a

¹ Palavras de Kas, Souza.

possibilidade de preenchimento inadequado das fichas de notificação por parte do profissional do serviço de saúde local.

Essas questões colocam em dúvida as notificações de 1994, bem como a origem urbana dos casos desde então; e isso motivou essa pesquisa, onde ficou constatado, de fato, que as fichas de notificação dos casos não eram adequadamente preenchidas, face ao desencontro de informações, corroborada na busca dos casos. De modo semelhante, difícil foi precisar a localidade rural em que os indivíduos residiam, já que no campo destinado para tal informação, esse dado não estava disponível, constando apenas a denominação “rural”.

D’Ávila et al. (2004) relataram divergências entre seu estudo e dados dos prontuários referentes ao achado de lesões ulcerosas de pacientes que deram entrada no Laboratório de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, São Paulo, entre os anos de 1995 e 2000. Eles se referiram a uma “desconexão” de informações, onde os prontuários revelaram uma porcentagem de 80% de lesões ulcerosas; mas, através da análise das lâminas, a proporção encontrada foi superior (90%). Dessa forma, sugerem ter havido uma caracterização clínica inadequada, possivelmente com a presença de crostas sobre as lesões, podendo ter mascarado a visualização das úlceras.

Em relação às notificações de casos humanos registrados no município de Ilhéus, Santana (2003) sustenta a idéia de um ciclo urbano de transmissão, com resultados que sugerem a ocorrência de dois padrões de transmissão: um caracterizado pela exposição ao vetor em ambientes naturais; e o outro, um padrão intermediário, com a exposição ao vetor na periferia da cidade, próxima à área de vegetação abundante no entorno da área de mata residual. Entretanto suas conclusões se basearam na evidência do surto de 1994 e na avaliação das fichas de notificação do ano 2001. Em análise minuciosa desses mesmos documentos e através da realização de busca ativa, constatou-se a divergência e duplicidade de dados.

Baseado nos estudos que tratam da LTA em Ilhéus e na análise dos relatórios do Núcleo de Entomologia da 6ª Dires/BA, constatou-se a ausência de espécie de flebotomíneo vetor na área urbana da cidade, verificando-se nas estações de coleta apenas a espécie *Lutzomyia cortelezzii*, em trabalhos realizados de Dezembro/2003 a Maio/2004, em bairros centrais e nos periféricos que formam o “cinturão” da cidade. Essa espécie já foi descrita em demais áreas urbanas do Brasil, sem

evidência de capacidade vetorial (OLIVEIRA et al., 2003). Além disso, a baixa densidade com que foi assinalada em Ilhéus não atende aos parâmetros de espécie vetora, envolvida no ciclo de transmissão da doença no município.

Desde 1985 no Brasil, tem-se verificado uma tendência no aumento dos registros de LTA, observando-se picos a cada cinco anos. No período de 1985 a 2005 o número médio anual de casos autóctones foi 28.568, e o coeficiente de detecção médio foi de 18,5 casos para cada 100.000 habitantes. A hipótese predominante atribuída a tal evidência é que este fenômeno foi possível dada a solidificação da implantação das ações de vigilância e controle da LTA no país (BRASIL, 2007). Os dados referentes ao município de Ilhéus expressos na Tabela 1 e no Gráfico 6 se complementam e corroboram o panorama nacional.

Em Ilhéus, os casos em geral são notificados levando em consideração a avaliação clínico-epidemiológica ou a clínico-laboratorial com a utilização da IDRM. A avaliação clínica, isoladamente, já se constituiu em único critério diagnóstico. Isso, possivelmente, pode ter gerado resultados falso-positivos em anos anteriores a 2004. Adicionalmente, é importante mencionar que, também no passado, alguns pacientes foram submetidos à IDRM duas ou mais vezes num período inferior ao mínimo recomendado, que são seis meses. Mas há de se considerar que a partir do ano 2004, com a inclusão de novos profissionais da área da saúde e/ou a interação destes com aqueles com mais tempo nas funções ligadas à endemia, houve melhoria na qualidade do serviço no município; notou-se mais rigor e qualidade no preenchimento das fichas de notificação e maior importância do diagnóstico laboratorial.

Em referência à busca ativa de casos humanos, realizada no Teotônio Vilela (área urbana) e no Santo Antonio (área rural), houve predominância da infecção no sexo feminino, apesar de não haver diferença significativa da susceptibilidade à infecção entre os sexos masculino e feminino. Esses dados estão em concordância com pesquisa realizada em cidades colombianas acerca do comportamento da LTA entre gêneros (VELEZ et al., 2001). Em estudo realizado na Zona da Mata de Pernambuco, foi verificada a importante prevalência e a força da infecção em todos os grupos etários, independente do sexo (BRANDÃO-FILHO et. al., 1999). Por outro lado, um estudo com a população do povoado de Canoa em Santo Amaro, Bahia, não foi demonstrada diferença estatística em ambos os gêneros, destacando, no

entanto, o grupo infantil como o mais susceptível à infecção (FOLLADOR et al., 1999).

O teste de IDRM é um dos mais utilizados no imunodiagnóstico, adequado para inquéritos epidemiológicos (KAR, 1995). A importância dos resultados positivos obtidos neste estudo através da IDRM em indivíduos das áreas rural e urbana demonstra que os mesmos tiveram contato com o parasito. Apesar desse teste não distinguir as infecções passadas das presentes, tem maior utilidade quando os parasitos são escassos nas lesões e no diagnóstico de visitantes após retorno de áreas endêmicas (MARZOCHI, 1992). Já os testes sorológicos de RIFI, ELISA e Western blot, baseados na pesquisa de anticorpos circulantes, têm sido utilizados como complemento nas metodologias diagnósticas. No entanto, podem ocorrer reações cruzadas com outras infecções. Estes métodos apresentam como grande vantagem o caráter menos invasivo (MONROY-OSTRIA et al., 1997).

O diagnóstico sorológico através da RIFI em pacientes com LTA apresenta um baixo nível de anticorpos circulantes, embora indivíduos com lesões múltiplas e/ou mucosas possam favorecer um aumento na resposta imune humoral (PISSINATE, 2006). Os achados com a RIFI estão em concordância com os outros estudos das formas cutâneas de LTA. Apesar de amplamente utilizada, a RIFI não tem se mostrado apropriada para os casos de LTA, pois além de não correlacionarem os níveis de anticorpos com o estágio da doença, podem apresentar reações cruzadas, principalmente com leishmaniose visceral e doença de Chagas (BRITO et al., 2000).

Os indivíduos que participaram desse estudo e que responderam aos testes de IDRM e/ou RIFI, têm idade média de 30 anos e constitui grupo populacional em idade produtiva, especialmente aqueles que exercem atividades rurais, caracterizando a enfermidade como de ordem ocupacional. Nesse aspecto, excluem-se os residentes da área urbana, uma vez que tendo se infectado em área rural, a doença se caracterizou como da ordem acidental, conforme declararam, e não pela urbanização da doença. Em outro estudo realizado em área endêmica da região cacauieira do estado da Bahia, foi demonstrado que há uma provável transmissão em ambientes do intra, peri e extradomicílio, considerada também ocupacional e presente em toda a região estudada (COSTA et al., 1988).

O tempo médio de residência sugere a origem rural dos casos. Em se tratando da área urbana, no entanto, em face das evidências da ausência de um

ciclo de transmissão, o tempo de residência não é fator determinante para garantir a existência de casos autóctones. Contudo, apenas demonstra o período em que os participantes desse estudo residiram no município, podendo os mesmos terem tido contato com a área rural em algum momento e, conseqüentemente, foram infectados.

Em relação aos indivíduos residentes em área urbana que declararam o não deslocamento para área rural, a informação parece não apresentar consistência, uma vez que os mesmos não afirmaram categoricamente. Aliado a isso, o fato de que os limites entre as duas áreas são tênues, o que pode gerar dúvidas por parte dos entrevistados quanto à estada em área rural. Entretanto, independente do local de contaminação, os resultados mostram que os indivíduos que residem na área urbana são tão vulneráveis à infecção quanto aqueles residentes em área rural.

Nos atendimentos realizados no Centro de Atenção Especializada III, foram coletadas informações quanto à localização de lesões leishmanióticas, uma vez que sugerem a parte mais exposta do corpo do indivíduo à picada do inseto (D'ÁVILA et al., 2004). Nesta pesquisa, 71% das lesões se localizaram nos membros inferiores. D'Ávila et al. (2004) obtiveram como resultado uma proporção menor (60%) e, ainda assim, isso só foi possível porque eles somaram membros inferiores e superiores, embora tenham estudado um grupo amostral menor.

Em análise retrospectiva realizada em 4.464 fichas de notificações de crianças de 0 a 5 anos de idade, em Corte de Pedra, Presidente Tancredo Neves, BA, área endêmica de LTA, foram demonstradas que a localização das lesões ocorreu, essencialmente, acima da cintura, sugerindo um provável padrão de transmissão intra ou peridomiciliar, a julgar pelo horário de maior exposição da parte superior do corpo desses indivíduos em seus leitos, em coincidência com a atividade endofágica dos insetos (AMPUERO; MACÊDO; MARSDEN, 2006).

Os pacientes atendidos no CAE III também foram questionados quanto a presença de cicatrizes compatíveis com LTA. Ficou evidenciada uma proporção de 16% deles com cicatrizes distribuídas pelo corpo. Os nossos resultados têm proporções quantitativas próximas às obtidas por Barretto et al. (1981) na região de Três Braços, sudeste do estado da Bahia. Eles obtiveram 18,8% (161) de indivíduos portadores de lesões cicatriciais sugestivas de LTA. Em outro estudo que tratou dos aspectos epidemiológicos da LTA, em Varzelândia, MG, Nunes et al. (2006) observaram cicatrizes cutâneas sugestivas da doença em 25,4% (297) do grupo

pesquisado, mencionando que estas lesões, quando bem caracterizadas, podem servir como marcador clínico-epidemiológico da enfermidade, mais sensível e concordante com os testes sorológicos do que a IDR, embora outras condições como traumatismos, queimaduras e piodermite etc possam deixar cicatrizes semelhantes. Por outro lado, a ausência de cicatrizes não afasta a suspeita clínica de acometimento por LTA.

Em avaliação dos resultados dos testes dos indivíduos submetidos a esse estudo no CAE III, percebeu-se que a maior incidência entre aqueles considerados positivos foi no sexo masculino e nas faixas etárias referentes aos adultos. As positivities encontradas por Silveira et al. (1999) e Curti et al. (2009) foram superiores quando comparadas com nosso estudo (67,3% e 62,3%, respectivamente), mas há de se considerar que eles analisaram dados de uma população maior, com 1.418 e 1.656 indivíduos, respectivamente. Em adicional, dados do Ministério da Saúde evidenciaram que 74% dos casos da doença ocorrem entre homens e que a maioria da população afetada é adulta (BRASIL, 2007).

Entre os indivíduos notificados pelo município, que participaram do nosso estudo e residentes em área urbana, ficou constatada passagem em área rural pela maioria deles. Não é incomum a notificação de casos de LTA de procedência urbana que, após pesquisa epidemiológica, fica constatada a infectividade em área rural. Curti et al. (2009) observaram na região Noroeste do estado do Paraná que apesar do maior número de casos de LTA ter ocorrido entre indivíduos que residiam em área urbana, a enfermidade foi adquirida em atividades de lazer como caça, pesca ou acampamento.

A realização dos testes de IDR, RIFI e exame direto naqueles atendidos no CAE III, pôde ser avaliada em concomitante, e avaliada a positividade também simultânea a essas metodologias. Levando em consideração o fato de que os pacientes tiveram a liberdade de realizar ou não um ou outro teste diagnóstico, isso gerou uma tabela com alguns dos resultados em “branco”, o que comprometeu o comparativo entre os testes; mas foi possível demonstrar, através de gráfico, o número de pesquisados e positividade para cada teste individual. Silveira et al. (1999) realizaram pesquisa semelhante em Maringá, PR, comparando quatro metodologias diagnósticas, incluindo as três acima citadas, considerando, inclusive, como positivos aqueles indivíduos que tinham reagido a, pelo menos, um dos testes.

Excetuando os resultados obtidos com a IDRM, a RIFI e o exame direto tiveram uma concordância proporcional numérica. Nunes et al. (2006) obtiveram resultados próximos ao utilizarem os teste de RIFI e ELISA (13,1% e 17,5%, respectivamente); mas ressaltam que os resultados devem ser interpretados com cautela, já que podem positivar em pacientes com lesões ativas, podem indicar infecção recente sem que haja lesões ou ser a consequência de reinfecções subclínicas.

A área urbana concentrou a maior população de estudo. As diferentes ocupações como estudante, motorista, marisqueira etc, não apontaram risco de exposição à infecção para LTA; mas é possível que entre os pesquisados oriundos da área rural, esta atividade represente maior risco de infecção. É necessário considerar que a ocupação do indivíduo funciona como um dos elementos para avaliar o risco de exposição à picada do vetor. A idade revela a faixa etária mais acometida e ajuda a interferir nas ações de controle. Da mesma forma, quando é possível fazer inferências quanto ao sexo mais acometido, pode-se relacionar com os hábitos e demais variáveis que permitem entender o ciclo de transmissão. A análise do tempo de residência em área endêmica é crucial para avaliar o tempo de exposição do indivíduo com o risco de contágio. Há situações em que a população amostral de uma área estudada não permite análises mais conclusivas, servindo, no entanto, como objeto de conjecturas, como é o caso da análise dos 58 indivíduos notificados pelo município, que concordaram em participar do nosso estudo.

A variação na notificação de casos observada no município a cada cinco anos reflete uma tendência nacional. Nesse contexto, foi verificada a variação quinquenal dos casos de LTA em Ilhéus. É discutível se a queda nas notificações a partir do ano 2004 – que coincide com a incorporação de um novo corpo médico, biomédico e de enfermeiros – e o aumento no ano 2008 – que coincide com o início das atividades dessa pesquisa, em contribuição na realização do diagnóstico – é fruto da oscilação característica esperada para a enfermidade ou reflexo das mudanças introduzidas nesse período.

É válido salientar que nenhum dos hamsters sentinelas apresentou positividade para parasitos do gênero *Leishmania* através da técnica de PCR ou material mantido em meio de cultivo, ou através do *imprint* de baço e esfregaço de material hepático. Guerra et al. (2006) realizaram inoculação em hamsters, só que a partir de material coletado de três gambás (*Didelphis marsupialis*), mas não

obtiveram sucesso, apresentando os resultados das culturas dos animais negativos, sem desenvolvimento de lesões em hamsters e com histopatologia sem sinais de infecção. Em pesquisa realizada em Imbu, município de Vicência, PE, Araújo et al. (2009) também não lograram êxito no isolamento de parasitos nas 306 amostras analisadas. Neitzke et al. (2008) também não obtiveram sucesso quando inocularam flagelados do trato gastrointestinal de *L. whitmani*, pois o hamster não desenvolveu lesão durante o seu acompanhamento, nem mesmo houve desenvolvimento de *Leishmania* em meio de cultivo com gânglios poplíteos e baço do animal. Porém, na utilização de sentinelas, Dorval (2006) encontrou dois dos 36 hamsters com lesões sugestivas de LT, constatando a infecção por *Leishmania amazonensis*. Já em Amaraji, PE, três hamsters sentinelas desenvolveram a LTA; a doença foi comprovada através da manutenção dos parasitos em meio de cultivo (BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

A presença de formas amastigotas em lâminas preparadas de esfregaços hepáticos de hamsters inoculados com amostras biológicas de pacientes corresponde a apenas 3,57% de positividade; contudo, comprova a infecção nesses animais e, sobretudo, a presença de um tripanosomatídeo circulante no município, revelando dado de importância epidemiológica. Os achados de Andrade et al. (2009) revelaram importância no cenário da LTA na Zona da Mata Norte de Pernambuco. Os autores analisaram 23 biópsias e punções aspirativas de lesões de pacientes, e obtiveram sete isolados identificados como *L. (Viannia) braziliensis*.

Diferentes metodologias são aplicadas para estudar a infecção natural de flebotomíneos por parasitos do gênero *Leishmania*. A mais utilizada é a dissecação intestinal desses dípteros. Perez et al. (2007) ressaltam que essa técnica é menos produtiva devido a baixa infecção nesses insetos, e ainda mencionam a possibilidade de criopreservar exemplares, com a vantagem de poder trabalhá-los no futuro; além disso, a possibilidade de se trabalhar pools de até 24 insetos, homogeneizando os conteúdos estomacais e inoculando em hamsters, com possível isolamento do parasito.

Em Itaguaí, RJ, foco de leishmaniose cutânea, foram dissecados 1.232 exemplares de flebotomíneos para observação de infecção natural. Todos apresentaram resultados negativos (AGUIAR et al., 1996). Em pesquisa realizada em duas áreas do estado do Amazonas, na dissecação de 1.440 exemplares pertencentes à espécie *L. umbratilis*, foi demonstrada uma taxa de infecção de

1,66% e 0,42%, equivalentes, respectivamente, a 12 e 3 fêmeas infectadas em cada localidade; isso evidencia os reduzidos valores de infecção natural nesses insetos, mesmo em áreas altamente endêmicas para leishmaniose (PINHEIRO et al., 2008). Estudo similar foi realizado em Amaraji, PE, onde foi identificado um exemplar de *L. whitmani* com infecção natural, e isolado pelo método clássico como *L. braziliensis*; isso reforça os argumentos que a incluem no ciclo de transmissão na região, única espécie incriminada até o momento no estado (BRANDÃO-FILHO, 2003).

Estudos acerca da taxa de infecção, utilizando como ferramenta a técnica de PCR, também são utilizadas. Oliveira-Pereira et al. (2006) pesquisaram na Amazônia maranhense, município de Buriticupu, 50 pools de cada 10 exemplares da espécie *L. whitmani*, e obtiveram 0,4% de positividade. Em Axixá, MA, município com os maiores níveis de doentes do estado, o índice de infecção também foi de 0,4% das 1.000 fêmeas pesquisadas; nesse caso, os autores sugerem que essa porcentagem de positividade seja suficiente para a manutenção da endemicidade da doença, tendo em vista as características epidemiológicas locais (MENDES-JUNIOR et al., 2008).

Neitzke et al. (2008), em estudo realizado em três municípios do estado do Paraná, onde há registros de casos humanos de LTA, propuseram-se a dissecar o intestino de 2.487 fêmeas, das quais 1.230 foram submetidas à PCR. Pelo método da dissecação, foi detectada uma fêmea de *L. whitmani* com infecção natural, mas não houve positividade para parasitos do gênero *Leishmania* através da PCR aplicada às fêmeas coletadas. De forma semelhante, na região do município de Três Braços, Zona da Mata da Bahia, onde também se situa o município de Ilhéus, um exemplar de *L. whitmani* foi encontrado naturalmente infectado e categoricamente incriminado como vetor de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, única espécie associada à LTA nesta região, mas apresentando formas clínicas múltiplas, nas quais se verifica a leishmaniose cutânea localizada e a disseminada, mas também a forma de espúndia ou leishmaniose mucosa, a mais grave da LTA (HOCH et al., 1986).

Em Ilhéus não foi possível avaliar as taxas de infecção nas dissecações estomacais das 1.528 fêmeas flebotomíneas, contudo foram utilizados 50 pools desses insetos para realização da técnica de PCR, mas não houve positividade com essa metodologia aplicada. A justificativa para esse resultado pode estar pautada na argumentação de Pinheiro et al. (2008), em que fazem referência aos baixos índices

de detecção, mesmo em áreas endêmicas. Em complemento, Neitzke et al. (2008), atentam para o fato de que ainda que os requisitos de incriminação vetorial não tenham sido atendidos, não se deve negligenciar o potencial vetorial de espécie(s) presente(s) em área(s) endêmica(s).

Na análise da concentração de DNA extraído tanto de insetos flebotomíneos quanto de vísceras de hamsters, os resultados foram satisfatórios. A média de concentração de ambas foi 1,04 e 5,74 µg, respectivamente. No entanto, é possível a obtenção de concentrações maiores, desde que simples adaptações sejam aplicadas à metodologia, além de níveis de pureza com qualidade superior ao recomendado² (em fase de elaboração).

Calado (2005), pesquisando polimorfismos no gênero *Anopheles*, avaliou a qualidade do DNA extraído desses insetos, verificada em gel de agarose 1%, com concentração determinada em espectrofotômetro. As extrações tiveram rendimento médio de 2,5µg de DNA por amostra, com variação de 0,5-5µg. Na extração de DNA dos insetos, trabalhamos amostras distribuídas em pools, ao contrário de Calado (2005) que trabalhou amostras individualmente. Apesar dessa diferença, a concentração de DNA na nossa pesquisa esteve na faixa de variação conseguida por ele, devendo-se considerar que insetos flebotomíneos são extremamente pequenos quando comparados com culicídeos, tendo em média cerca de 2-3mm de comprimento.

Foi considerado o limite mínimo de detecção a maior diluição que ainda resultava em uma banda de DNA visível no gel de agarose. O limiar de detecção de DNA determinado por PCR específica para *L. (Viannia) braziliensis* foi de 1pg. Rodrigues (2000) obteve a mesma quantidade aplicada à PCR gênero específica; mas, no mesmo estudo, garantiu a obtenção de 10fg de DNA aplicado ao subgênero *Viannia* de fragmento de biópsia de lesão humana. Machado (2004) obtiveram os mesmos quantitativos de Rodrigues (2000) quanto ao limiar de detecção para PCR gênero e subgênero específicos. É necessário considerar que as reações de PCR podem variar quanto à qualidade da reprodutibilidade dos seus amplicons, ainda que analisando as mesmas amostras, não sendo recomendado estabelecer rigorosamente uma quantidade mínima de DNA a ser detectável.

² Carvalho, dados não publicados.

Foi verificado que duas amostras de hamsters foram positivas através da técnica de PCR específico para o subgênero *Viannia* entre as 84 de material colhido de punções aspirativas de pacientes. A tarefa de isolar parasitos em hamsters e fazer reproduzir seqüências de DNA de interesse através da PCR não é tarefa fácil; poucos são os grupos no Brasil que conseguem esse feito. Maria S. Andrade et al. (2005, 2009), em estudos na Zona da Mata de Pernambuco, conseguiram o isolamento em meio de cultivo de material de biópsia e de punção aspirativa, utilizando o hamster como veículo; mas a identificação da espécie de *Leishmania* numa e n'outra pesquisa se deu através de reações com anticorpos monoclonais e perfil eletroforético de isoenzimas. Araújo et al. (2009), na localidade de Imbú, Vicência, Pernambuco, conseguiram 15 amostras positivas entre as 306 pesquisadas através de PCR específico para o subgênero *Viannia*. Nesse caso, em específico, a análise foi feita diretamente de fígado, baço e orelha de animais silvestres. Bruno B. Andrade et al. (2005), em trabalho realizado em portadores de LTA na Bahia, obtiveram 100% de positividade quando aplicaram a metodologia de PCR dirigida à *Leishmania braziliensis*. No entanto, o material biológico utilizado para a pesquisa foi biópsia de pele do paciente.

A baixa positividade através da PCR em nosso estudo foi limitada talvez pela dificuldade em se manter parasitos em hamsters no laboratório. Mas há de se considerar que foi possível identificá-los em nível de subgênero, objetivo desse trabalho, provando a circulação do parasito em área de transmissão do município.

Considerando os dados entomológicos, o município de Ilhéus apresenta grande variedade na fauna de flebotomíneos; foram 18 as espécies identificadas. Apesar de ser comum o mapeamento desses dípteros em áreas de transmissão, é a primeira vez que uma pesquisa se propõe a trabalhar, em paralelo, a diversidade da fauna nas áreas urbana e rural desse município. Em Timóteo, Minas Gerais, a variedade desses insetos foi relatada por Andrade-Filho (1997), onde instalaram sete armadilhas na área urbana da cidade, duas das quais próximas à área de mata de um parque estadual, conseguindo contabilizar 20 espécies de flebotomíneos, com predominância da *L. whitmani*. Da mesma forma, em pesquisa na área urbana da cidade de Bonito, Rio Grande do Sul, a diversidade flebotomínea foi objeto de estudo, relatando 12 diferentes espécies (NUNES et al., 2008).

Na área urbana da cidade de Ilhéus, o achado de espécies cujas capacidades vetoriais não são comprovadas, aliado à baixa densidade desses

exemplares, reforça a hipótese de que não há um ciclo de transmissão estabelecido nesse ambiente (CARVALHO et al., 2005). No entanto, há uma variedade importante de espécies na área rural do município, que pode estar associada aos casos humanos notificados, característica de um ciclo zoonótico de transmissão.

A *L. cortelezzii* já foi descrita em buracos de árvores na Bahia (FORATTINI, 1973) e está presente nos ambientes peri e extradomiciliares da área urbana de Ilhéus em baixa densidade; essa constatação foi confirmada em outro estudo, em que essa espécie foi notificada como sendo o seu primeiro relato naquela área. À época, foi o único flebotomíneo coletado em pesquisa realizada em sete bairros. Em estudos na área urbana de Maringá, Paraná (TEODORO et al., 1998), estes insetos responderam por apenas 0.03% do total registrado. Já em estudo também em área urbana, entre os meses de fevereiro de 1999 e fevereiro de 2000, na Cidade de Corumbá, Mato Grosso do Sul, foi notificada a presença desse flebotomíneo entre outras 27 espécies capturadas, respondendo por 3,4% do achado, com 42 exemplares coletados (OLIVEIRA et al., 2003). No Brasil não há relatos de incriminação desta espécie na transmissão da doença, embora já tenha sido encontrada naturalmente infectada com *Leishmania chagasi*, agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana, através da análise por PCR (CARVALHO et al., 2008). Ao contrário, no norte da Argentina, há a suspeita de que a mesma seja responsável pelo aparecimento de casos humanos de LTA, em função de a sua presença coincidir com a faixa de distribuição da doença neste país e, sobretudo, por ter sido observada no ambiente domiciliar, alimentando-se de sangue humano, mas também pela associação com animais silvestres (FORATTINI, 1973).

Entre as demais espécies descritas na área urbana de Ilhéus (*L. fischeri*, *L. longispina* e *L. viannamartinsi*), todas coletadas no extradomicílio, em zona limítrofe com área de mata, a densidade conjunta foi ainda menor quando comparada com *L. cortelezzii*. Nenhuma das três possui registro vetorial. Acredita-se, no entanto, que *L. fischeri* seja dotada desse potencial, mesmo não tendo sido encontrada infectada com *Leishmania*, já que ela possui uma forte relação com o habitat humano. Além disso, sua importante antropofilia leva a incriminá-la como vetor secundário (SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, 2005).

No presente estudo, ressalta-se que ainda que dotada de tal capacidade, a sua densidade não permitiria o estabelecimento de uma relação no ciclo de transmissão da LTA na área urbana da cidade. Essa argumentação difere quando se

compara esses dados com a área rural, cuja densidade dessa espécie foi relativamente elevada.

Em geral, as espécies que participam da transmissão da doença são aquelas que têm a maior densidade populacional na área endêmica em estudo (MARTINEZ-ORTEGA, 1986). Em nosso trabalho na área rural, entre os exemplares identificados, as espécies *L. whitmani* e *L. fischeri* foram predominantes, presentes no intra, peri e extradomicílio. Neste sentido, apresentam evidências indiretas de que sejam as responsáveis pela transmissão nesse ambiente. Em estudo realizado na localidade de Três Braços, Bahia, ficou constatada a alta prevalência da *L. whitmani*, estando comprovadamente relacionada com a transmissão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (HOCH et al., 1986). Em se tratando da *L. fischeri*, a argumentação de que estaria envolvida no ciclo de transmissão da área rural foi exposta anteriormente, quando mencionada a sua ocorrência na área urbana, tendo, portanto, uma possível participação secundária na transmissão.

A espécie *L. choti* se mostrou presente no intra, peri e extradomicílio da área rural. Esse flebotomíneo já foi notificado como único presente na área urbana do município de Una, Bahia, onde casos de leishmaniose tegumentar são registrados (CARVALHO et al., 2009). Em pesquisa realizada em unidade de treinamento militar na Zona da Mata do estado de Pernambuco, suspeita-se a sua participação no ciclo de transmissão, face à predominância em relação a demais espécies encontradas (BRANDÃO-FILHO et al., 1998). Entretanto, não há registros da incriminação dessa espécie como vetor da LTA. Porém, em algumas situações, mesmo em baixa densidade, acredita-se que o ciclo de transmissão seja mantido levando em consideração o potencial vetorial de uma espécie, embora associado ao conhecido envolvimento na transmissão da doença, fato constatado no município de Bonito, MS, onde fazem referência à *L. whitmani* (NUNES et al., 2008).

L. migonei foi encontrada apenas em ambiente extradomiciliar, sendo a quarta espécie mais coletada. Já em Viana, área endêmica do estado do Espírito Santo, essa espécie teria uma participação auxiliar na transmissão da LTA em ambiente domiciliar, numa área onde *L. intermedia* seria a principal vetora (FALQUETO, 1997). As demais 12 espécies identificadas (*L. davisii*, *L. longispina*, *L. salesi*, *L. lutziana*, *L. barretoii*, *L. shannoni*, *L. yuilli yuilli*, *L. lanei*, *L. pessoai*, *L. edwardsi*, *L. missionensis* e *L. oswaldoi*) na área rural de Ilhéus corresponderam a 9,33% das capturas, sem qualquer indício de envolvimento em transmissão.

A densidade de distribuição dos flebotomos é fortemente afetada por fatores climáticos, alterações do microambiente - que determina os criadouros - disponibilidade de sangue para o repasto das fêmeas, competição com outras espécies e vários outros fatores direta ou indiretamente ligados às alterações antrópicas do ambiente (FERRO et al., 1997). Hoje, o impacto sobre o meio ambiente em nível global, seja pela presença humana ou resultado de um acontecimento cíclico sobre o planeta, é responsável por importantes mudanças sobre a dinâmica de doenças transmitidas por insetos (ARAIA, 2009). A ocupação do espaço pelo homem tende a determinar uma pressão ecológica de modo especialmente agudo, levando à distribuição de populações de *L. whitmani*, em geral em plantações e em abrigos de animais no peridomicílio, do que em ambientes silvestres (MARZOCHI; SCHUBACH; MARZOCHI, 1999; YOUNG; DUNCAN, 1994). De fato, em Itaguaí, houve uma crescente devastação da área de floresta e a expansão cafeeira, sendo substituída pela cultura de banana, onde, em paralelo, os habitantes constroem suas casas. Isso levou à diminuição da fauna flebotomínea e de animais silvestres, porém elevou a densidade de *L. intermedia*, vetor da LTA na área, nos ambientes intra e peridomiciliar, garantida graças à estreita relação alimentar com o homem, animais domésticos e sinantrópicos (AGUIAR et al., 1996). Seguindo a tendência de que áreas modificadas estão associadas com o desequilíbrio ambiental, podendo agravar quadros endêmicos numa dada região, sugere-se que a enfermidade em Ilhéus venha a alcançar níveis preocupantes, já que os ambientes foram e vêm sendo progressivamente modificados pelo homem para a manutenção de atividades agrárias, construção de novas moradias, inserção de atividades portuárias e construção de um novo aeroporto, com a proposta de devastação de extensa cobertura vegetal.

5 CONCLUSÕES

- a) A LTA em Ilhéus respeitou um padrão cíclico, com intervalo médio de cerca de cinco anos, considerando o aumento e diminuição no número de casos;
- b) É necessário uma maior atenção na notificação de casos pelo município, uma vez que não houve concordância de 100% entre os casos notificados e os avaliados neste estudo;
- c) O acometimento por LTA em indivíduos residentes em área urbana não permite concluir a existência de ciclo de transmissão nessa localidade;
- d) Foi identificada *Leishmania* do subgênero *Viannia* pela técnica de PCR, configurando a primeira constatação da presença desse parasito no município de Ilhéus;
- e) Os resultados encontrados apontam a região como uma importante zona endêmica para a LTA em área rural;
- f) A *L. whitmani* se mostrou como provável vetor primário na área rural, e *L. fischeri* teria um papel secundário no ciclo de transmissão, considerando a densidade desses flebotomíneos;
- g) Esse trabalho possibilitou um melhor conhecimento da dinâmica de transmissão da LTA e poderá auxiliar na elaboração e execução de medidas efetivas de vigilância epidemiológica nesta região.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. M. et al. Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I – A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Caderno de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 195-206, 1996.

AGUILAR, C. M. et al. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 15-16, 1998.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. História, ciência, saúde - manguinhos, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 853-882, 2003.

AMPUERO, J.; MACÊDO, V.; MARSDEN, P. Características clínicas da leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 22-26, 2006.

ANDRADE, B. B. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. Gazeta médica da Bahia, Salvador, v. 75, n. 1, p. 75-82, 2005.

ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 38, p. 229-233, 2005.

ANDRADE, M. S. et al. Novo surto de leishmaniose tegumentar americana em área de treinamento militar na Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 42, n. 5, p. 594-596, 2009.

ANDRADE-FILHO, J. D. et al. Sand flies in Timóteo, Minas Gerais, Brazil. Cadernos de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 767-770, 1997.

ARAIA, E. Refugiados ambientais: as primeiras vítimas do aquecimento global. Revista planeta, São Paulo, p. 36-41, ago. 2009.

ARAÚJO, A. I. F. et al. Detecção de infecção natural por *Leishmania* spp em roedores silvestres capturados em área endêmica de Pernambuco, Brasil. In:

JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9., 2009, Recife. Anais. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0143-1.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2010.

ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. Sobre os vetores da Leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil. II. Incidência de flagelados em flebótomos silváticos. Acta amazônica, Manaus, v. 8, p. 387-396, 1978.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. Dermatologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BAHIA. Disponível em: <http://www.a-bahia.com/diretorio/index.php?cat_id=492>. Acesso em: 23 fev. 2009.

BARRETO, M. P. Movimentos migratórios e sua importância na epidemiologia de doenças parasitárias no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 1, n. 3, p. 91-102, 1967.

BARRETTO, A. C. et al. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia. I. Leishmaniose Humana. Boletín de la oficina sanitaria panamericana, Washington, DC, v. 90 n. 5, p. 415-424, 1981.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Revista brasileira de epidemiologia, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BORST, P.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Kinetoplast DNA - Review. Plasmid, New York, n. 2, p. 20-40, 1979.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 31, n. 6, p. 575-578, 1998.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. Transactions Royal Society and Tropical Medicine and Hygiene, United Kingdom, v. 93, p. 488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene, United Kingdon, v. 93, p. 291-296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana: normas e manuais técnicos. Brasília, DF, 2007.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of potentially diagnostic leishmania braziliensis antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot ananalysis. Clinical and diagnostic laboratory immunology, Washington, DC, v. 7, n. 2, p. 318-321, 2000.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of Leishmania (Viannia) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. Tropical medicine and international health, Nijmegen, v. 20, p. 16-32, 2009.

BRYCESON, A. D. M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Treatment. III. Immunological studies. IV. Pathogenesis in DCL. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 64, p. 369-374, 1970.

CALADO, D. C. Polimorfismos em *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 detectados através de marcadores moleculares (rapd e rflp) e comparação com *anopheles bellator* dyar & knab, 1906 e *anopheles homunculus* komp, 1937 (diptera, culicidae, anophelinae). 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CARVALHO, G. M. et al. Naturally infected Lutzomyia sand flies in a Leishmania-endemic area of Brazil. Vector borne zoonotic disease, New York, v. 8, n. 3, p. 407-414, 2008.

CARVALHO, S. M. S. et al. Primeiro relato de *Lutzomyia cortelezzii* (Brètes, 1923) na cidade de Ilhéus, BA. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 38, n. 5, p. 442-443, 2005.

CARVALHO, S. M. S. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana na Cidade de Ilhéus - BA. Revista Laes - Haes, São Paulo, v. 3, p. 128-130, 2006.

CARVALHO, S. M. S. et al. Registro da fauna flebotomínea em área de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Una, BA. Revista Laes-Haes, São Paulo, v. 177, p. 67-69, 2009.

COSTA, J. M. L. et al. Procedência de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana nas áreas endêmicas de Três Braços e Corte de Pedra- Estado da Bahia- Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 21, p. 145-149, 1988.

COSTA, J. M. L. et al. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 31, p. 279-288, 1998.

CUNHA, J. C. L.; LIMA, J. W. O.; POMPEU, M. M. L. Transmissão domiciliar de leishmaniose tegumentar e associação entre leishmaniose humana e canina, durante uma epidemia na Serra de Baturité, no estado do Ceará, Brasil. Revista brasileira de epidemiologia, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 425-435, 2006.

CURTI, M. C. M. et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 51-56, 2009.

D'ÁVILA, S. C. G. P. et al. Estudo retrospectivo dos casos de leishmaniose tegumentar americana diagnosticados no laboratório de patologia do Hospital de Base da FAMERP nos anos de 1995-2000, com enfoque clínico e anatomopatológico. Arquivos de ciências da saúde, São José do Rio Preto, v. 11, n. 2, 2004.

DE BRUIJN, M.; BARKER, D. C. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta tropica, Basel, v. 52, p. 45-58, 1992.

DORVAL, M. E. M. C. Estudos epidemiológicos em área de leishmaniose tegumentar no município de Bela Vista, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. 2006. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FALQUETO, A. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 30, n. 6, p. 531-532, 1997.

FALQUETO, A. et al. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for

humans. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 86, p. 499-500, 1991.

BADARÓ, R.; REED, S. G. Leishmanioses. In: FERREIRA, W.; ÁVILA, S. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 255-262.

FERRO, C. et al. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. Journal of medical entomology, Lanham, v. 34, n. 6, p. 719-728, 1997.

FOLLADOR, I. et al. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 32, n. 5, p. 497-503, 1999.

FORATTINI, O. P. Entomologia médica. São Paulo: Edgard Blücher: Ed. Universidade de São Paulo, 1973. v. 4.

FRANKE, E. D. et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. Annals of internal medicine, Philadelphia, v. 113, p. 934-940, 1990.

GUERRA, J. A. O. et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. Cadernos de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, p. 2319-2327, 2006.

HEINE, M. L. Passeio por São Jorge dos Ilhéus. 4. ed. Itabuna: Gráfica Agora, 2003.

HOCH, A. et al. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from phlebotomines in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 81, supl., p. 63, 1986.

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Veterinary parasitology, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

IBGE. Cidades. Ilhéus-BA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 20 abr. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (BRASIL). Mapas de condições registradas. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/html/clima.php?lnk=/sim/mapas/mapas3.php>>. Acesso em: 14 jul. 2009.

KAR, K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. Critical reviews in microbiology, Boca Raton, v. 21, p. 123-52, 1995.

KÜCKELHAUS,, S. et al. Atividade anti-*Plasmodium falciparum* da filosseptina-1, um peptídeo antimicrobiano da secreção cutânea da *Phyllomedusa hipochondrialis* (Amphibia). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 40, supl. 2, p. 112, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed.). Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 10th ed. London: Hodder Arnold, 2005. v. 5, p. 313-349.

MACHADO, P. E. Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular na detecção de leishmania spp. em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no estado de santa Catarina. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MARTINEZ-ORTEGA, E. Biología de los flebotomos ibericos (Diptera: Psychodidae) em condiciones naturales. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma, v. 22, n. 1, p. 73-78, 1986.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. Jornal brasileiro de medicina, Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais, 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 39-64.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 39, p. 14-21, 2006.

MEDEIROS, A. C. R.; ROSELINO, A. M. F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. Anais brasileiros em dermatologia, Rio de Janeiro, v. 74, p. 329-336, 1999.

- MENDES-JÚNIOR, J. F. et al. Taxa de infecção natural de *Lutzomyia whitmani* (psychodidae) por *leishmania* em área endêmica de leishmaniose tegumentar no maranhão, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. Anais. Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p. 16-19.
- MENDONÇA, S. C. et al. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 83, p. 347-355, 1988.
- MICHALSKY, E. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 44, p. 255-259, 2002.
- MONROY-OSTRIA, A. et al. Seroepidemiological studies of Cutaneous Leishmaniasis in the Campeche state of Mexico. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, n. 1, p. 21-26, 1997.
- NEITZKE, H. C. et al. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 41, n. 1, p. 17-22, 2008.
- NUNES, A. G. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. Caderno de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 6, p. 1343-1347, 2006.
- NUNES, V. L. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista brasileira de entomologia, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 446-451, 2008.
- OLIVEIRA, A. G. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. Caderno de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 933-944, 2003.
- OLIVEIRA, C. C. G. et al. Changing epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. Acta tropica, Basel, v. 90, p. 155-162, 2004.
- OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. et al. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* SP na Amazônia

maranhense. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 39, n. 6, p. 540-543, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Essential leishmaniasis maps. Geneva, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/>. Acesso em: 20 mar. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Lutte contre les Leishmanioses. Geneva, 1990. (Serie of reports techniques).

PEREIRA, I. R.; HOCH, A. *Lutzomyia intermedia* as a suspected vector of *Leishmania Viannia brasiliensis* in Bahia State, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 23, n. 4, p. 235, 1990.

PEREZ, J. E. et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 655-658, 2007.

PESSOA, S.; MARTINS, A. V. Gênero *Leishmania*: *Leishmania donovani* leishmaniose visceral ou calazar. In: REY, L. Parasitologia médica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 67-77.

PINHEIRO, F. G.; LUZ; S. L. B.; FRANCO, A. M. R. Infecção natural por Tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. Acta amazônica, Manaus, v. 38, n. 1, p. 165-172, 2008.

PISSINATE, J. F. Desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, por citometria de fluxo no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

REIS, L. C. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 41, n.5, p. 439-43, 2008.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. Lancet infectious diseases, London, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RODRIGUES, E. H. G. Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. 2000. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2000.

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

RODRIGUEZ, N. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v. 32, p. 2246-2252, 1994.

ROGERS, M. E. et al. Transmission of Cutaneous Leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature, London, v. 450, p. 463-467, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTANA, M. N. S. Perfil dos casos de leishmaniose tegumentar americana, na zona urbana de Ilhéus-Bahia: aspectos sócio-demográficos e ambientais. 2003. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2003.

SANTOS, G. P. L. et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 38, n. 2, p. 161-166, 2005.

SANTOS, J. B. et al. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. Caderno de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 701-708, 2000.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, Washington, DC, v. 89 n. 20, p. 9944-9948, 1992.

SHAW, J. J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situation and their importance in the epidemiology of the disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 83, p. 486-490, 1988.

SILVEIRA, T. G. V. et al. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 32, p. 413-23, 1999.

SOBRE Ilhéus. Disponível em: <<http://citybrazil.uol.com.br/ba/ilheus/index.php>>. Acesso em: 15 mar. 2009.

SOKAL, J. E. Measurement of delayed skin-test responses. New england journal of medicine, Boston, v. 293, p. 501-502, 1975.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (Brasil). Informes Técnicos Institucionais. Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande de São Paulo. Revista de saúde pública, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 137-138, 2005.

TEODORO, U. et al. Flebotomíno coletados em matas silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, Sul do Brasil. Estudo Preliminar. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 31, p. 517-522, 1998.

VALIM, C. Transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Ceará. Características da transmissão em diferentes formações paisagísticas com particular referência ao local de transmissão para o homem. 1993. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1993.

VELEZ, I. D. et al. Leishmaniosis cutânea en Colombia y género. Caderno de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 171-180. 2001.

WALTON, B. C.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. Journal of parasitology, Lawrence, v. 63, p. 1118-1119, 1977.

YOUNG, D.; DUNCAN, M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville: Memoirs of the American Entomological Institute, 1994.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento para maiores de 18 anos atendidos na Fundação SESP



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESPECÍFICO PARA MAIORES DE 18 ANOS – SESP

Projeto: “Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana e flebotomíneos envolvidos na transmissão, no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia”.

Pelo presente termo de consentimento, o Sr(a) está sendo convidado a manifestar, voluntariamente, a sua concordância em participar do estudo acima citado. A sua participação nessa pesquisa consiste em responder ao questionário de investigação epidemiológica, realização de exame clínico, coleta (retirada) de 5mL (uma colher de sopa) de sangue da veia do braço, permitir fotografar a lesão (ferida), escarificação da lesão (coleta de material do local da ferida para realização do diagnóstico parasitológico que consiste em passar levemente o bisturi, sem que isso cause qualquer dor, na borda da lesão para pegar os parasitas), aspirado de lesão (pegar um pouco de material que está na borda da ferida com uma seringa) e aplicação do Teste Intradérmico de Montenegro (injeção), onde será injetado 0,1mL do antígeno no antebraço, comprometendo-se em retornar no período compreendido entre 48 e 72h para leitura do resultado. É possível, a depender da reação à injeção, que haja a formação de uma pápula (mancha vermelha) no local da injeção, isso faz parte do resultado do teste, não deverá haver preocupação nesse sentido. Não há riscos há destacar na sua participação, pois os procedimentos relatados são rotineiros no diagnóstico da leishmaniose tegumentar e não há registros de complicações.



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



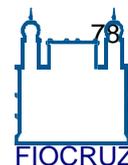
AGGEU MAGALHÃES

Sua participação não é obrigatória e, caso não queira participar, isso não trará nenhum constrangimento ou prejuízo nem em relação aos pesquisadores, nem a mais ninguém. A qualquer momento da pesquisa, o Sr(a) poderá desistir de participar e poderá retirar o seu consentimento. Esclarecemos que a instituição responsável por este trabalho e onde o mesmo está sendo realizado é o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Unidade FIOCRUZ/PE, localizado à Avenida Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50.670-420, Recife/PE.

As informações obtidas poderão ser apresentadas em eventos científicos, como congressos, seminários e outras atividades acadêmicas, ficando, no entanto, resguardada a sua identidade de participante. Essa pesquisa tem como objetivo entender melhor essa doença na região, contribuindo em futuras estratégias de controle, em benefício de pessoas sob o risco de contraí-la.

Aqui, o incentivamos a pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, sobre qualquer questão relacionada à sua participação no estudo, e a cada uma destas questões lhe garantimos o esclarecimento. Além disso, o Sr(a) terá garantido o atendimento médico da rede municipal de saúde, sendo tratado e acompanhado até que fique curado, o que já acontece no atendimento de rotina municipal.

Diante do que foi colocado, na certeza de que a sua privacidade será garantida quando das publicações científicas originadas deste estudo, solicitamos a sua assinatura de concordância ao termo aqui lido.



AGGEU MAGALHÃES

Estou certo dos esclarecimentos. As implicações relacionadas à minha participação neste estudo foram bem esclarecidas pela equipe responsável. A minha participação é voluntária, estando formalizada através da assinatura deste termo em duas vias, sendo uma retida por mim e a outra pela pesquisadora. Poderei deixar de participar a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo à minha pessoa.

Nome completo

Assinatura

Local e data,-----, ---- de -----200---

Contatos com telefones da cidade de Ilhéus:

Sílvia Maria Santos Carvalho (Bióloga responsável pela pesquisa): (73) 3680-5268

Flamélia Carla Silva Oliveira (Biomédica, funcionária do laboratório da Fundação SESP/Ilhéus): (73) 9981-2960

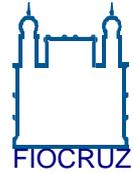
Sílvia Maria Santos Carvalho

APÊNDICE B - Termo de Consentimento para menores de 18 anos atendidos na Fundação SESP.



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESPECÍFICO PARA CRIANÇAS MENORES DE 18 ANOS - SESP

Projeto: “Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana e flebotomíneos envolvidos na transmissão, no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia”.

Pelo presente termo de consentimento, você está sendo convidado a manifestar, voluntariamente, a sua concordância em participar do estudo acima citado, desde que conste, nesse documento, a assinatura do seu responsável, acompanhada do nº de documento de identificação (RG, CPF, etc). A sua participação nessa pesquisa consiste em responder ao questionário de investigação epidemiológica, realização de exame clínico, coleta (retirada) de 5mL (uma colher de sopa) de sangue da veia do braço, permitir fotografar a lesão (ferida), escarificação da lesão (coleta de material do local da ferida para realização do diagnóstico parasitológico que consiste em passar levemente o bisturi, sem que isso cause qualquer dor, na borda da lesão para pegar os parasitas), aspirado de lesão (pegar um pouco de material que está na borda da ferida com uma seringa) e aplicação do Teste Intradérmico de Montenegro (injeção), onde será injetado 0,1mL do antígeno no antebraço, comprometendo-se em retornar no período compreendido entre 48 e 72h (dois ou três dias) para leitura do resultado. É possível, a depender da reação à injeção, que haja a formação de uma pápula (mancha vermelha) no local da injeção, isso faz parte do resultado do teste, não deverá haver preocupação nesse sentido. Não há riscos há destacar na sua participação, pois os procedimentos relatados são rotineiros no diagnóstico da leishmaniose tegumentar e não há registros de complicações.



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

Sua participação não é obrigatória e, caso não queira participar, isso não trará nenhum constrangimento ou prejuízo nem em relação aos pesquisadores, nem a mais ninguém. A qualquer momento da pesquisa, o Sr(a) poderá desistir de participar e poderá retirar o seu consentimento. Esclarecemos que a instituição responsável por este trabalho e onde o mesmo está sendo realizado é o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Unidade FIOCRUZ/PE, localizado à Avenida Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50.670-420, Recife/PE.

As informações obtidas poderão ser apresentadas em eventos científicos, como congressos, seminários e outras atividades acadêmicas, ficando, no entanto, resguardada a sua identidade de participante. Essa pesquisa tem como objetivo entender melhor essa doença na região, contribuindo em futuras estratégias de controle, em benefício de pessoas sob o risco de contraí-la.

Aqui, o incentivamos a pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, sobre qualquer questão relacionada à sua participação no estudo, e a cada uma destas questões lhe garantimos o esclarecimento. Além disso, o Sr(a) terá garantido o atendimento médico da rede municipal de saúde, sendo tratado e acompanhado até que fique curado, o que já acontece no atendimento de rotina municipal.

Diante do que foi colocado, na certeza de que a sua privacidade será garantida quando das publicações científicas originadas deste estudo, solicitamos a sua assinatura de concordância ao termo aqui lido.



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

Eu, responsável pelo menor, estou certo dos esclarecimentos. As implicações relacionadas à sua participação neste estudo foram bem esclarecidas pela equipe responsável. A sua participação é voluntária, estando formalizada através da assinatura deste termo em duas vias, sendo uma retida por mim e a outra pela pesquisadora. Caso desejemos, o menor poderá deixar de participar a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo à sua pessoa.

Nome completo do menor de idade

Nome completo do responsável

Nº do documento de identificação

Assinatura do responsável

Local e data,-----, ---- de -----200---

Sílvia Maria Santos Carvalho (Bióloga responsável pela pesquisa): (73) 3680-5268

Flamélia Carla Silva Oliveira (Biomédica, funcionária do laboratório da Fundação SESP/Ilhéus): (73) 9981-2960

Sílvia Maria Santos Carvalho

APÊNDICE C - Termo de Consentimento para menores de 18 anos atendidos na busca ativa dos casos.



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESPECÍFICO PARA SUJEITOS DA BUSCA ATIVA E AQUELES QUE VIVEM AO SEU ENTORNO, MENORES DE 18 ANOS

Projeto: “Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana e flebotomíneos envolvidos na transmissão, no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia”.

Pelo presente termo de consentimento, você está sendo convidado a manifestar, voluntariamente, que concorda em participar do estudo acima citado, desde que conste nesse documento, a assinatura do seu responsável, acompanhada do nº de documento de identificação (RG, CPF, etc). A sua participação nessa pesquisa consiste em responder ao questionário de investigação epidemiológica, coleta (retirada) de 5 mL (uma colher de sopa) de sangue e aplicação do Teste Intradérmico de Montenegro (injeção), com inoculação de 0,1mL do antígeno no antebraço, comprometendo-se em nos receber em sua residência daqui a 48h para leitura do resultado. É possível, a depender da reação à injeção, que haja a formação de uma pápula (mancha vermelha) no local onde foi aplicado, isso faz parte da interpretação do resultado da pesquisa – não deverá haver preocupação nesse sentido. Não há riscos há destacar na sua participação, pois os procedimentos relatados são rotineiros no diagnóstico da leishmaniose tegumentar e não há registros de complicações.

Sua participação não é obrigatória e, caso não queira participar, isso não lhe trará nenhum constrangimento ou prejuízo nem em relação aos pesquisadores, nem a mais ninguém. A qualquer momento da pesquisa o Sr(a) poderá retirar o seu consentimento. Esclarecemos que a instituição responsável por este trabalho e onde



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

o mesmo está sendo realizado é o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Unidade FIOCRUZ/PE, localizado à Avenida Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50.670-420, Recife/PE.

As informações obtidas poderão ser apresentadas em eventos científicos, como congressos, seminários e outras atividades acadêmicas, ficando, no entanto, resguardada a sua identidade de participante. Essa pesquisa tem como objetivo entender melhor essa doença na região, contribuindo em futuras estratégias de controle, em benefício de pessoas sob o risco de contraí-la.

Aqui, o incentivamos a pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, sobre qualquer questão relacionada à sua participação no estudo, e a cada uma destas questões lhe garantimos o esclarecimento. Além disso, o Sr(a) terá garantido o atendimento médico da rede municipal de saúde, sendo tratado e acompanhado até que fique curado, o que já acontece no atendimento de rotina municipal.

Diante do que foi colocado, na certeza de que a sua privacidade será garantida quando das publicações científicas originadas deste estudo, solicitamos a sua assinatura de concordância ao termo aqui lido.



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

Eu, responsável pelo menor, estou certo dos esclarecimentos. As implicações relacionadas à sua participação neste estudo foram bem esclarecidas pela equipe responsável. A sua participação é voluntária, estando formalizada através da assinatura deste termo em duas vias, sendo uma retida por mim e a outra pela pesquisadora. Caso desejemos, o menor poderá deixar de participar a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo à sua pessoa.

Nome completo do menor de idade

Nome completo do responsável

Nº do documento de identificação

Assinatura do responsável

Local e data,-----, ---- de -----200---

Contatos com telefones da cidade de Ilhéus:

Sílvia Maria Santos Carvalho (Bióloga responsável pela pesquisa): (73) 3680-5268

Flamélia Carla Silva Oliveira (Biomédica, funcionária do laboratório da Fundação SESP/Ilhéus): (73) 9981-2960

Sílvia Maria Santos Carvalho

APÊNDICE D - Termo de Consentimento para maiores de 18 anos atendidos na busca ativa dos casos.



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**ESPECÍFICO PARA SUJEITOS DA BUSCA ATIVA E AQUELES QUE
VIVEM AO SEU ENTORNO**

Projeto: “Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana e flebotomíneos envolvidos na transmissão, no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia”.

Pelo presente termo de consentimento, o Sr(a) está sendo convidado a manifestar, voluntariamente, que concorda em participar do estudo acima citado. A sua participação nessa pesquisa consiste em responder ao questionário de investigação epidemiológica, coleta (retirada) de 5 mL (uma colher de sopa) de sangue da veia do braço e aplicação do Teste Intradérmico de Montenegro (injeção), com inoculação de 0,1mL do antígeno no antebraço, comprometendo-se em nos receber em sua residência daqui a 48h para leitura do resultado. É possível, a depender da reação à injeção, que haja a formação de uma pápula (mancha vermelha) no local onde foi aplicado, isso faz parte da interpretação do resultado da pesquisa – não deverá haver preocupação nesse sentido. Não há riscos há destacar na sua participação, pois os procedimentos relatados são rotineiros no diagnóstico da leishmaniose tegumentar e não há registros de complicações.

Sua participação não é obrigatória e, caso não queira participar, isso não lhe trará nenhum constrangimento ou prejuízo nem em relação aos pesquisadores, nem a mais ninguém. A qualquer momento da pesquisa o Sr(a) poderá desistir de participar e poderá retirar o seu consentimento. Esclarecemos que a instituição responsável por este trabalho, e onde o mesmo está sendo realizado, é o Centro de



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



AGGEU MAGALHÃES

Pesquisas Aggeu Magalhães, Unidade FIOCRUZ/PE, localizado à Avenida Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50.670-420, Recife/PE.

As informações obtidas poderão ser apresentadas em eventos científicos, como congressos, seminários e outras atividades acadêmicas, ficando, no entanto, resguardada a sua identidade de participante. Essa pesquisa tem como objetivo entender melhor essa doença na região, contribuindo em futuras estratégias de controle, em benefício de pessoas sob o risco de contraí-la.

Aqui, o incentivamos a pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, sobre qualquer questão relacionada à sua participação no estudo, e a cada uma destas questões lhe garantimos o esclarecimento. Além disso, o Sr(a) terá garantido o atendimento médico da rede municipal de saúde, sendo tratado e acompanhado até que fique curado, o que já acontece no atendimento de rotina municipal.

Diante do que foi colocado, na certeza de que a sua privacidade será garantida quando das publicações científicas originadas deste estudo, solicitamos a sua assinatura de concordância ao termo aqui lido.



AGGEU MAGALHÃES

Estou certo dos esclarecimentos. As implicações relacionadas à minha participação neste estudo foram bem esclarecidas pela equipe responsável. A minha participação é voluntária, estando formalizada através da assinatura deste termo em duas vias, sendo uma retida por mim e a outra pela pesquisadora. Poderei deixar de participar a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo à minha pessoa.

Nome completo

Assinatura

Local e data,-----, ---- de -----200---

Contatos com telefones da cidade de Ilhéus:

Sílvia Maria Santos Carvalho (Bióloga responsável pela pesquisa): (73) 3680-5268

Flamélia Carla Silva Oliveira (Biomédica, funcionária do laboratório da Fundação SESP/Ilhéus): (73) 9981-2960

Sílvia Maria Santos Carvalho

APÊNDICE E - Termo de Consentimento para as residências onde as armadilhas para coleta dos insetos são instaladas.



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESPECÍFICO PARA AS COLETAS DE FLEBOTOMÍNEOS NAS RESIDÊNCIAS

Projeto: “Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana e flebotomíneos envolvidos na transmissão, no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia”.

Pelo presente termo de consentimento, o Sr(a) está sendo convidado a manifestar, voluntariamente, que concorda em participar do estudo acima citado. A sua participação nessa pesquisa consiste em permitir o nosso acesso à sua residência para que possamos capturar, das 18:00h as 20:00h, nas paredes da casa, os insetos (mosquitos) que procuramos; e colocar uma armadilha que também ajudará na coleta. Ela fica armada durante 12h, contadas a partir das 18:00h, sendo retirada às 06:00h do dia seguinte, quando retornaremos para pegá-la. Da mesma forma, colocaremos uma gaiola (ratoeira) com um hamster (pequeno roedor, ratinho) em local onde crianças não tenham acesso, preferivelmente no quintal da sua casa, para que ele possa ser picado por esses insetos. No mesmo horário marcado para pegar de volta a armadilha do inseto, pegaremos o animal.

Sua participação não é obrigatória e, caso não queira participar, isso não trará nenhum constrangimento ou prejuízo nem em relação aos pesquisadores, nem a mais ninguém. A qualquer momento da pesquisa, o Sr(a) poderá desistir de



AGGEU MAGALHÃES

participar e poderá retirar o seu consentimento. Esclarecemos que a instituição responsável por este trabalho e onde o mesmo está sendo realizado é o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Unidade FIOCRUZ/PE, localizado à Avenida Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50.670-420, Recife/PE.

Esse procedimento não oferece riscos à sua residência. As informações obtidas poderão ser apresentadas em eventos científicos, como congressos, seminários e outras atividades acadêmicas, ficando, no entanto, resguardada a sua identidade de participante. Essa pesquisa tem como objetivo entender melhor essa doença na região, contribuindo para um melhor entendimento e em futuras estratégias de controle, em benefício de pessoas sob o risco de contrair essa doença que é transmitida pelo mosquito que estamos tentando capturar.

Aqui, o incentivamos a pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, sobre qualquer questão relacionada à sua participação no estudo, e a cada uma destas questões lhe garantimos o esclarecimento.

Diante do que foi colocado, na certeza de que a sua privacidade será garantida quando das publicações científicas originadas deste estudo, solicitamos a sua assinatura de concordância ao termo aqui lido.



AGGEU MAGALHÃES

Estou certo dos esclarecimentos. As implicações relacionadas à minha participação neste estudo foram bem esclarecidas pela equipe responsável. A minha participação é voluntária, estando formalizada através da assinatura deste termo em duas vias, sendo uma retida por mim e a outra pela pesquisadora. Poderei deixar de participar a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo à minha pessoa.

Nome completo

Assinatura

Local e data,-----, ---- de -----200---

Contatos com telefones da cidade de Ilhéus:

Sílvia Maria Santos Carvalho (Bióloga responsável pela pesquisa): (73) 3680-5268

Flamélia Carla Silva Oliveira (Biomédica, funcionária do laboratório da Fundação SESP/Ilhéus): (73) 9981-2960

Sílvia Maria Santos Carvalho

APÊNDICE F - Questionário utilizado para realização do inquérito epidemiológico.



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

QUESTIONÁRIO – HUMANO

Questionário número: _____

A) Dados sobre o paciente

1. Bairro: _____ 2. Código Bairro: _____
 3. Nome: _____
 4. Endereço: _____

 5. Telefone: _____
 6. Idade: _____ anos _____ meses 7. Sexo: masculino feminino
 8. Local de nascimento: _____ município _____ UF
 área urbana área rural
 9. Escolaridade: não se aplica analfabeto _____ anos de estudo
 10. Ocupação/Profissão: _____
 11. Renda familiar: _____ em salário(s) mínimo(s)
 12. Tempo de residência no domicílio: _____ anos _____ meses
 13. Local de residência anterior: _____ . Tempo: _____ anos
 _____ meses
 não se aplica

B) Dados sobre a moradia:

14. Tipo de construção: alvenaria com reboco alvenaria sem reboco
 pau a pique barro e coberto de sapé
 15. Abastecimento público de água: Sim (EMBASA) Não
 Se **não**, qual: poço/cisterna poço artesiano fonte/mina/nascente
 água mineral rio/ribeirão/córrego outros: _____

16. Canalização interna: Sim

Não

17. Acondicionamento: Caixa d'água Outros _____
 Latão Tampada (o) Não tampada (o)
 18. Esgotamento sanitário: rede publica fossa rio/ribeirão/córrego
 céu aberto
 19. Destino do lixo: coleta publica rio/ribeirão/córrego queima
 enterra céu aberto

C) Dados epidemiológicos (reservatório e vetor)

20. Distância do local de residência do mar: _____ metros
 21. Possui cão doméstico: Sim Não Questionário: _____
 22. Moradia próxima de mata: Sim Não
 23. Moradia próxima à plantações: Sim Não
 Se **sim**: bananal outros _____
 24. Presença de abrigo para animais no peridomicílio: Sim Não
 Se sim, qual animal: _____
 25. Conhece o inseto que transmite a leishmaniose: Sim Não
 26. Identificação correta do inseto a partir dos exemplares apresentados: Sim Não

27. Uso de mosquiteiros ou outro tipo de proteção contra mosquitos: Sim Não

28. Presença de flebotomíneos: Sim Não

Se **sim**: extradomicílio peridomicílio intradomicílio

29. Espécie flebotomínea encontrada: _____

30. O paciente viajou no último ano para fora do município: Sim Não

Se **sim**, qual o local: _____

31. O paciente frequenta área rural do município: Sim Não

Se **sim**, qual o local: _____

Se **sim**, qual a frequência: _____

Se **sim**, qual o objetivo: pescaria passeio/lazer trabalho caça

32. Pernoite nos locais anteriores: Sim Não

D) Dados clínicos

33. Presença de lesões para leishmaniose: Sim Não

34. Presença de cicatrizes compatíveis com leishmaniose: Sim Não

35. Já foi diagnosticado para LTA alguma vez: Sim Não

Se **sim**, data do primeiro diagnóstico positivo para LTA: ____/____/____

Se **sim**, tipo de diagnóstico: parasitológico direto IDRM histopatologia

Outro _____

36. Fez tratamento: Sim Não

37. Concluiu o tratamento: Sim Não

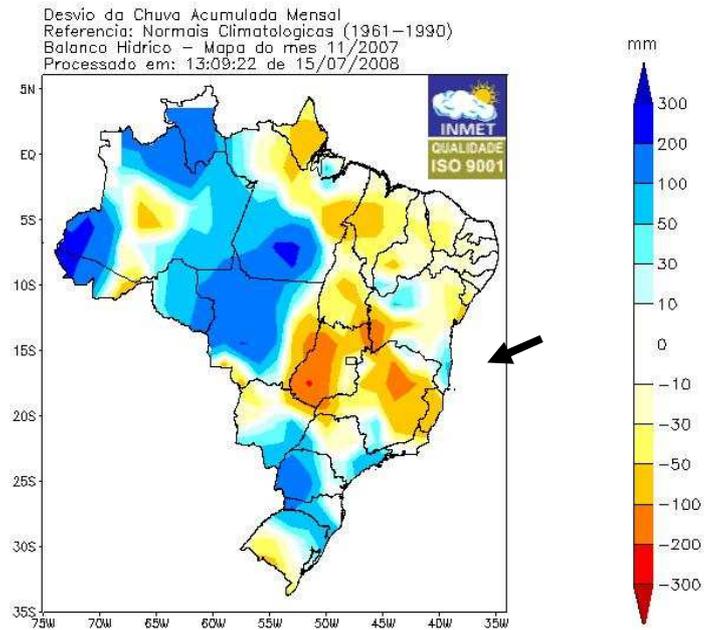
38. Resultado da IDRM atual:

Em 48 horas: Positivo Negativo

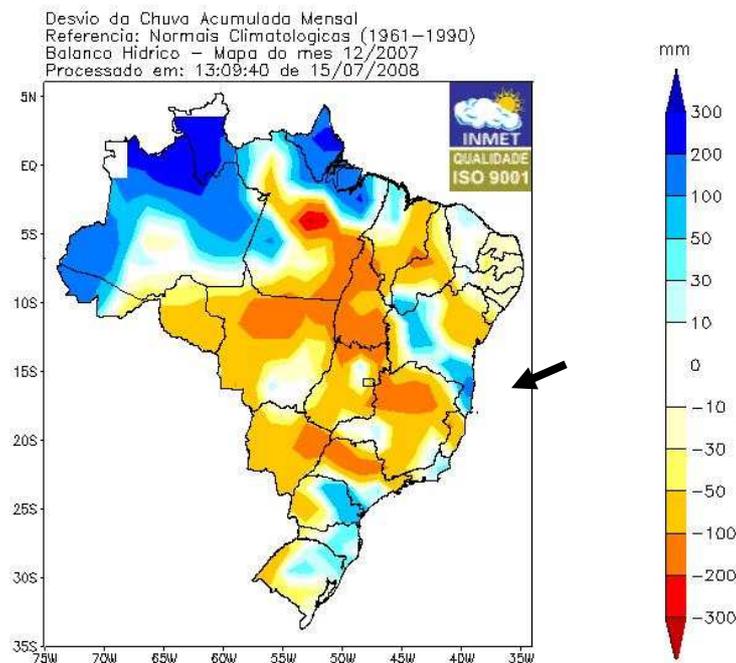
Em 72 horas: Positivo Negativo

Resultado final: Positivo Negativo

ANEXO A - Mapas de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de novembro e dezembro de 2007.

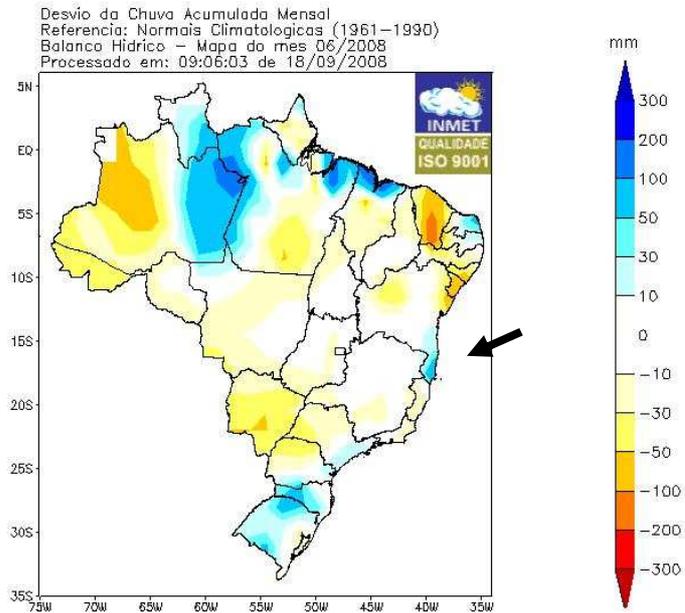


Mapa 1 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de novembro de 2007. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.

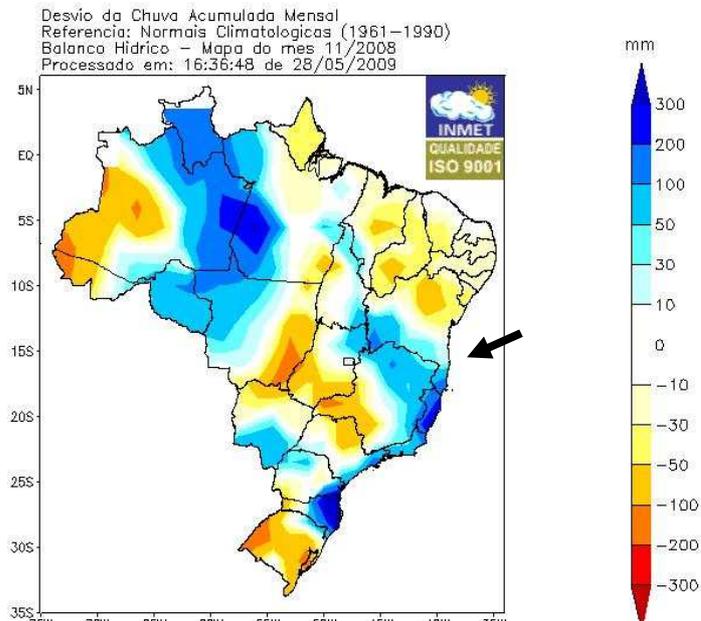


Mapa 2 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de Dezembro de 2007. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.

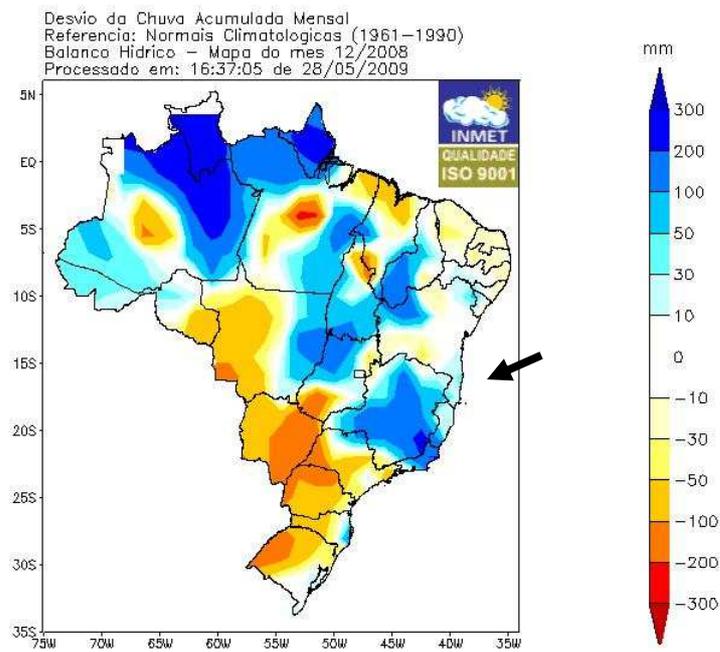
ANEXO B - Mapas de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de junho e novembro e dezembro de 2008.



Mapa 3 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de junho de 2008. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.

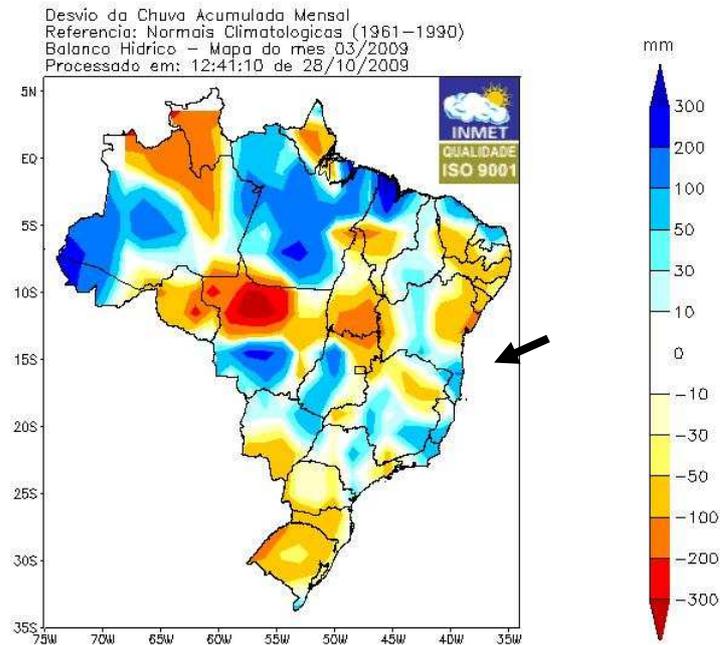


Mapa 4 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de Novembro de 2008. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.

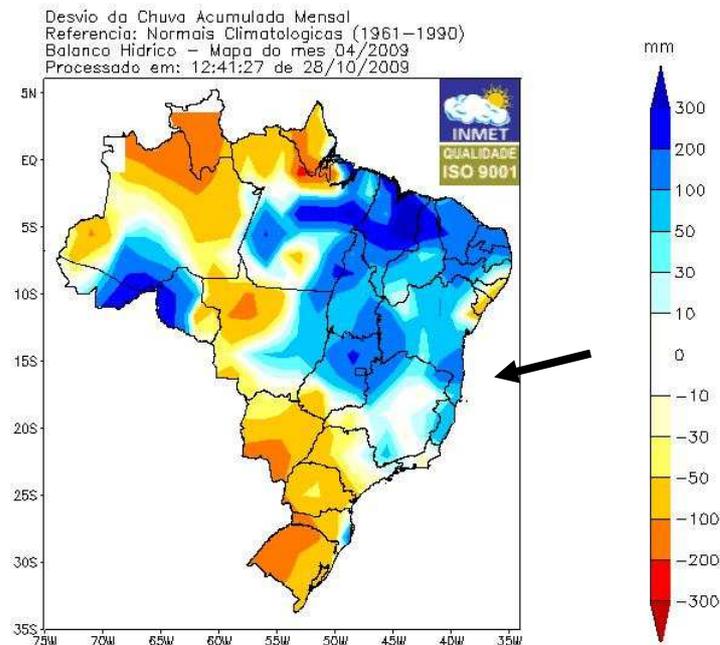


Mapa 5 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de Dezembro de 2008. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.

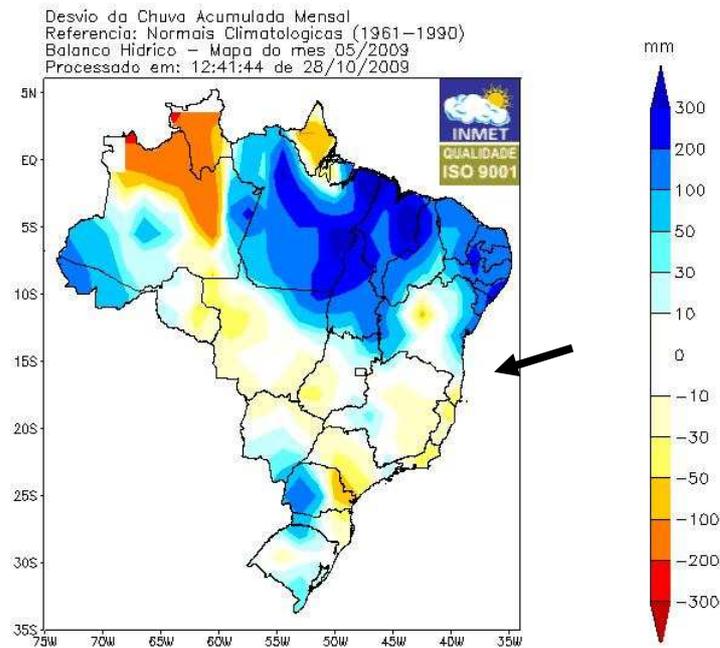
ANEXO C - Mapas de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de março, abril, maio e junho de 2009.



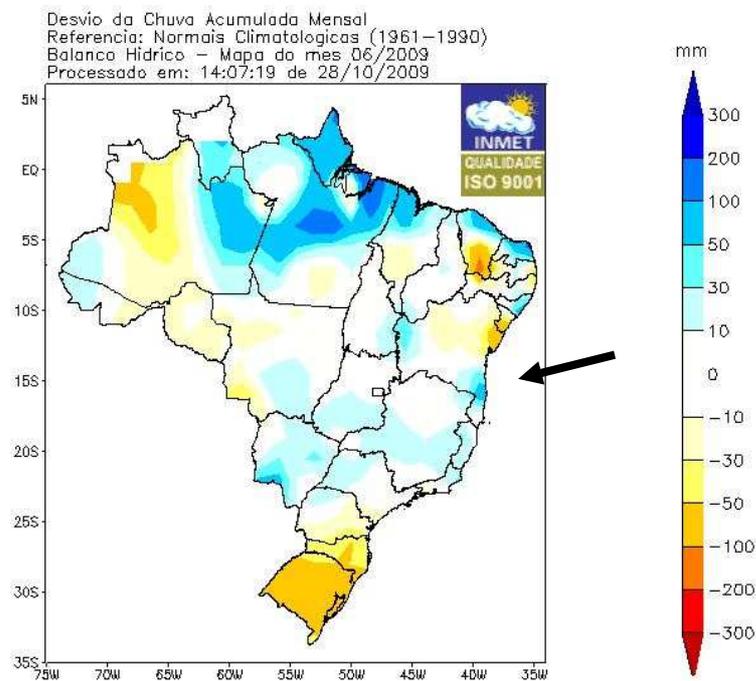
Mapa 6 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de março de 2009. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.



Mapa 7 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de abril de 2009. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.



Mapa 8 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de maio de 2009. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.



Mapa 9 - Mapa de distribuição do volume de chuva para o Brasil, referente ao mês de junho de 2009. À direita, o litoral da Bahia com a seta indicando a localização do município de Ilhéus.

ANEXO D - Parecer do Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos

Título do Projeto: Prevalência da leishmaniose tegumentar americana e flebotomíneos envolvidos na transmissão no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia

Pesquisador responsável: Silvia Maria Santos Carvalho

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 05/06/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 40/07

Registro no CAAE: 0040.0.095.000-07

PARECER Nº 055/2007

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 14 de novembro de 2010. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Ressalta-se que foi aprovada a parte humana, mas em relação à ética animal há necessidade de adequação no comitê específico (CEUA).

Recife, 14 de novembro de 2007.

Dr. Zulmira de Medeiros
Bióloga
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:**Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 14/11/2008.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO E - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

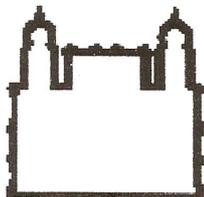
CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº **P.0174-03**, intitulado **"Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão"** sob a responsabilidade da **Dr(a). Sinval Pinto Brandão Filho, CPqAM - Fiocruz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ)** em 25/04/05.

Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 25 de Abril de 2008.

Rio de Janeiro, 28 de Abril de 2005.


Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ

ANEXO F - Termo aditivo da Comissão de Ética no Uso de Animais

**MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ**

TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DE LICENÇA Nº L-056/05

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – em atenção à solicitação do Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, autoriza o presente Aditivo que altera a vigência desta licença, referente ao Protocolo intitulado: “Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão”.

Ressaltamos que a nova data de validade desta licença é 25 de outubro de 2009.

Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2009.


Drª. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ