

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**EXPOSIÇÃO À PICADA DE *LUTZOMYIA* SPP. E À
LEISHMANIA SPP. EM INDIVÍDUOS DE ÁREA
ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO
BRASIL**

Karina Yukie Hirata

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EXPOSIÇÃO À PICADA DE *LUTZOMYIA* SPP. E À
LEISHMANIA SPP. EM INDIVÍDUOS DE ÁREA
ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO
BRASIL**

Karina Yukie Hirata

Orientadora: Prof^a. Associado Mary Marcondes

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária –
Unesp, Campus de Araçatuba,
como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor
em Ciência Animal
(Fisiopatologia Médica e
Cirúrgica)

ARAÇATUBA – SP

2018

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Hirata, Karina Yukie

H668e

Exposição à picada de Lutzomyia SPP. E À Leishmania SPP.
em indivíduos de área endêmica para leishmaniose visceral no
Brasil / Karina Yukie Hirata.

Araçatuba: [s.n], 2018.
63 f. il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientadora: Profa. Associada Mary Marcondes

1. Anticorpos. 2. Imunidade Humoral. 3. Reação em Cadeia
da Polimerase em Tempo Real. 4. Saliva. 5. Sorologia. I. T.

CDD 616.9364

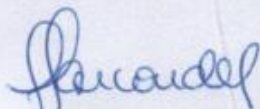
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Exposição à picada de *Lutzomyia* spp. e à *Leishmania* spp. em indivíduos de área endêmica para leishmaniose visceral no Brasil

AUTORA: KARINA YUKIE HIRATA

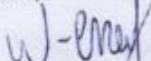
ORIENTADORA: MARY MARCONDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:



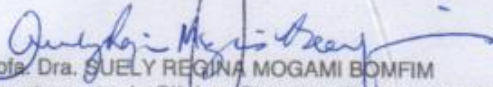
Prof. Dra. MARY MARCONDES

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



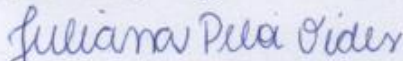
Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



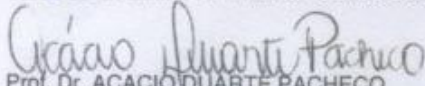
Prof. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Prof. Dra. JULIANA PELOI VIDES

Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba



Prof. Dr. ACÁCIO DUARTE PACHECO

Departamento de Ciências da Natureza / Centro de Ciências Biológicas e da Natureza - Universidade Federal do Acre

Araçatuba, 17 de julho de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KARINA YUKIE HIRATA – nascida em 25 de maio de 1987 na cidade de Taubaté – SP. Médica Veterinária graduada pela Universidade Estadual Paulista - FMVA - Unesp, Campus de Araçatuba, no ano de 2010. Participou do Programa de Residência Médico-Veterinária da mesma instituição, com ênfase em Clínica Médica de Pequenos Animais, no período de fevereiro de 2011 a janeiro de 2013. Mestre em Ciência Animal no ano de 2015 pela mesma instituição. Em agosto de 2015 ingressou no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA, Campus de Araçatuba, na área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, sob orientação da Professora Associado Mary Marcondes. Foi bolsista CAPES no período de agosto de 2015 a agosto de 2017. Atualmente é docente colaboradora das disciplinas de Clínica Médica Veterinária e Semiologia Veterinária da Universidade Estadual do Norte do Paraná.

EPÍGRAFE

*“Não é o quanto fazemos, mas quanto
amor colocamos naquilo que fazemos.”*

(Madre Teresa de Calcutá)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Célia e Tamotsu, pelo
apoio incondicional, por todo o amor e
incentivo. Obrigada por tudo.*

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao final de uma etapa, é muito boa a sensação de poder agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram e me inspiraram, profissionalmente e pessoalmente, a crescer, aprender e melhorar. Obrigada por tudo.

Agradeço à minha orientadora, Mary Marcondes, pela dedicação, paciência e por todo o ensinamento desde a graduação. Obrigada por encontrar tempo para compartilhar seus conhecimentos, pelos conselhos, pela confiança e por tornar esse trabalho possível. Obrigada pela oportunidade de conviver e aprender tanto com você durante o mestrado e o doutorado. Sua força, determinação e dedicação profissional são admiráveis. Você é minha grande inspiração!

Ao meu pai, Tamotsu, por me ensinar que a felicidade somente é alcançada quando fazemos aquilo que amamos. Obrigada por ser minha maior inspiração e por dar condições para que eu pudesse buscar meus sonhos. Eu amo você!

À minha mãe, Célia, por todo o amor, pelo apoio incondicional e por sempre se fazer presente. Obrigada por sempre ter as palavras certas nos momentos certos. Você é meu porto seguro, eu amo você!

À minha irmã, Jéssica, que mesmo com a distância e a correria do dia-a-dia, está sempre me apoiando em cada passo. Obrigada por todo o amor e por me dar a certeza de que é você que sempre estará ali para tudo. Eu amo você!

Àqueles que se foram ao longo dessa caminhada, mas que, cada um em seu momento, me ensinou e me inspirou. Vó Ondina, Guto e Eros, o incentivo de cada um de vocês foi essencial para que eu pudesse chegar até aqui, e todo o amor e ensinamentos estarão para sempre guardados no coração.

Aos amigos queridos, Aline, Flávia, Juliana, Livia, Jaqueline, Acácio, Fabiana, Daniel, Rafael. Obrigada pela amizade, por serem sinônimo de paz, alegria e dias leves, por fazerem de Araçatuba um verdadeiro lar. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grata por tudo o que vivi ao lado de vocês e por ter encontrado cada um em minha vida. Eu amo vocês!

Aos queridos amigos de Bandeirantes, Emília, Petrônio, Thais e Chico, por me acolherem com tanto carinho e pela compreensão pelas ausências para que eu pudesse concluir essa etapa. Muito obrigada!

Ao professor Wagner Luis Ferreira, por ter despertado meu interesse pela clínica médica de pequenos animais ainda na graduação. Agradeço por todo o ensinamento, pela orientação durante a residência e pela oportunidade de conviver com uma pessoa tão íntegra durante esses anos. O senhor é um profissional admirável e uma grande inspiração!

Às professoras Cárís Maroni Nunes e Kátia Denise Saraiva Bresciani, pelas contribuições na banca do exame geral de qualificação, por todo o aprendizado e pela oportunidade de ter sido aluna de vocês.

Aos professores Cárís Maroni Nunes, Marcelo Vasconcelos Meireles e Valéria Marçal Félix de Lima, por cederem seus laboratórios e equipamentos para processamento das amostras deste experimento.

Aos pacientes atendidos no hospital e que se dispuseram a participar deste estudo, agradeço pela confiança em nossa equipe.

Ao médico Edenilson Borges de Oliveira Sobrinho e aos enfermeiros do hospital, pela coleta e armazenamento das amostras.

À Lais Rigon, pelo auxílio no processamento das amostras de PCR, pela dedicação, organização e cuidado durante sua iniciação científica.

À professora Márcia Dalastra Laurenti, por fornecer a cultura de *Leishmania infantum* (LIM50/FMUSP) e pelo processamento dos testes de ELISA. Agradeço também pela disponibilidade, paciência e explicações sempre muito esclarecedoras.

Ao professor Yuri Tani Utsunomyia, pela disponibilidade e colaboração para realização das análises estatísticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA - UNESP), por disponibilizar os meios necessários para desenvolvimento do projeto de pesquisa, por todo o aprendizado oferecido desde a graduação até o doutorado, e por ter sido minha casa nos últimos 12 anos, pela qual tenho muito carinho e carrego um orgulho imenso.

E por último, porém não menos importante, à Deus, por me auxiliar nas melhores escolhas, por nunca deixar que eu perca a fé, e por sempre me aproximar de pessoas maravilhosas.

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO 1	17
1.1. Considerações gerais	17
1.2. Referências	27
2. CAPÍTULO 2	39
2.1. Exposição à picada de <i>Lutzomyia</i> spp. e à <i>Leishmania</i> spp. em indivíduos de área endêmica para leishmaniose visceral no Brasil	39
2.1.1. Resumo	39
2.1.2. Abstract	41
2.1.3. Introdução	42
2.1.4. Material e Métodos	44
2.1.4.1. Delineamento experimental	44
2.1.4.2. ELISA para pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp.	46
2.1.4.3. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-saliva de <i>Lutzomyia</i> spp.....	47
2.1.4.4. PCR em tempo real	48
2.1.4.4.1. Extração de DNA	48
2.1.4.4.2. Amplificação de fragmento de DNA de <i>Leishmania</i> spp.	49
2.1.4.5. Análise estatística	49
2.1.5. Resultados	50
2.1.6. Discussão	53
2.1.7. Conclusão	58
2.1.8. Referências	58

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

Ct – ciclo limiar (“threshold cycle”)

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – ensaio imunoenzimático indireto

et al. – e colaboradores

EUA – Estados Unidos

FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

gp63 - gene da glicoproteína 63

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IDR – intradermorreação

IgG – imunoglobulina G

ITS - região do espaçador interno transcrito

kDNA – DNA do cinetoplasto

km - quilômetros

LIM - Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas

LJM11 - proteína recombinante salivar de *Lutzomyia longipalpis* 11

LJM17 - proteína recombinante salivar de *Lutzomyia longipalpis* 17

LV – leishmaniose visceral

LVC – leishmaniose visceral canina

µg - micrograma

µL - microlitro

M – molar

mL – mililitro

ng – nanograma

nM – nanomolar

p – probabilidade

PA – Pará

pb – pares de base

PBS – tampão fosfato salina

PBS-T – tampão fosfato salina acrescido de Tween

PCR – reação em cadeia da polimerase

PCR-RFLP - reação em cadeia da polimerase-polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição

pH – potencial hidrogeniônico

qPCR – PCR em tempo real quantitativo

r^2 – coeficiente de correlação linear

rDNA – DNA ribossômico

RIFI - reação de imunofluorescência indireta

rK39 – antígeno recombinante 39

rKE16 – antígeno recombinante 16

SP – São Paulo

spp. – espécie

SUS – Sistema Único de Saúde

TAD - teste de aglutinação direta

Th1 – linfócito T auxiliar 1

Th2 – linfócito T auxiliar 2

TMB – tetrametilbenzidina

UE – unidade de ELISA

UNESP – Universidade Estadual Paulista

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Número e percentagem, segundo o sexo e a faixa etária, de uma população de 284 pacientes encaminhados a um hospital público de área endêmica para leishmaniose visceral, localizado na microrregião de Araçatuba-SP, considerados infectados por <i>Leishmania</i> spp. segundo a presença de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. ou PCR em tempo real para amplificação de fragmento do DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	51
Tabela 2 - Associações entre presença de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp., anti-saliva de <i>Lutzomyia</i> spp., sexo e idade de 284 pacientes encaminhados a um hospital público de área endêmica para leishmaniose visceral, na microrregião de Araçatuba-SP.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Mapa da microrregião de Araçatuba–SP compreendendo 16 municípios, de acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo	46
Figura 2 - Diagrama de dispersão e reta ajustada das unidades de ELISA (UE) anti- <i>Leishmania</i> spp. e anti-saliva de <i>Lutzomyia</i> spp. de indivíduos encaminhados a um hospital público de área endêmica para leishmaniose visceral, na microrregião de Araçatuba-SP.....	52

EXPOSIÇÃO À PICADA DE *LUTZOMYIA* SPP. E À *LEISHMANIA* SPP. EM INDIVÍDUOS DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

RESUMO – A leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada e de importância clínica em países das Américas Central e do Sul, África, Ásia e Europa. A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, que inoculam formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania infantum* em um hospedeiro vertebrado, as quais são fagocitadas pelo sistema mononuclear fagocitário. As manifestações clínicas da doença podem variar de formas assintomáticas a um envolvimento visceral severo, sendo a resposta imunológica induzida determinante para a apresentação clínica do indivíduo infectado. A saliva do vetor pode influenciar no curso da infecção por *Leishmania* spp., uma vez que o estabelecimento prévio de imunidade específica anti-saliva do flebotomíneo pode auxiliar no desenvolvimento de imunidade celular protetora na infecção por *Leishmania* spp., associada à ausência de sinais clínicos da doença. O diagnóstico da LV representa um desafio e frequentemente se faz necessária a associação de diferentes técnicas para obtenção de um diagnóstico conclusivo. Métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares estão disponíveis para a identificação de indivíduos infectados por *Leishmania* spp., porém os resultados podem diferir de acordo com a fase de evolução da doença e o tipo de resposta imune incitada. Dessa forma, o entendimento da interação entre o vetor-hospedeiro, bem como a associação entre a apresentação clínica do indivíduo infectado e o tipo de resposta imune induzida são importantes para que um acurado diagnóstico da doença.

Palavras-chave: anticorpos, imunidade humoral, reação em cadeia da polimerase em tempo real, saliva, sorologia

EXPOSURE TO THE BITE OF *LUTZOMYIA* SPP. AND TO *LEISHMANIA* SPP. IN PEOPLE OF AN ENDEMIC AREA FOR VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZIL

ABSTRACT - Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease of clinical importance in Central and South America, Africa, Asia and Europe. Transmission occurs during the blood feeding of female *Lutzomyia longipalpis*, which inoculate promastigote forms of *Leishmania infantum* in a vertebrate host, which are phagocytosed by the mononuclear phagocytic system. Clinical presentation of the disease may range from asymptomatic to severe visceral involvement, and the induced immune response is determinant for the clinical presentation of the infected person. The saliva of the vector may influence the course of infection by *Leishmania* spp., since the previous establishment of specific anti-salivary immunity can help in the development of protective cellular immunity in *Leishmania* spp. infection, associated with the absence of clinical signs of the disease. The diagnosis of VL represents a challenge and it is often necessary to associate different techniques to obtain a conclusive diagnosis. Serological, parasitological and molecular methods are available for identification of people infected by *Leishmania* spp., however the results may differ depending on the stage of the disease and the type of immune response prompted. Thus, the understanding of the interaction between the host-vector, as well as the association between the clinical presentation of the infected people and the type of immune response induced are important for an accurate diagnosis of the disease.

Keywords: antibodies, humoral immunity, real-time polymerase chain reaction, saliva, serology

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e gênero *Leishmania*, que parasitam células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro (SILVEIRA; CORBETT, 2010). As espécies de *Leishmania* pertencem a dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987). Neste último encontram-se a *Leishmanias* do complexo *Leishmania donovani*, agentes etiológicos da leishmaniose visceral (LV), sendo a *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* o agente etiológico encontrado na África e Ásia; *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* nas Américas (CUNHA; CHAGAS, 1937). Apesar de haver discordância entre pesquisadores, semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *Leishmania chagasi* e a *Leishmania infantum* sejam a mesma espécie, permitindo a denominação *L. infantum* (syn. *chagasi*) para o agente etiológico desta enfermidade também nas Américas (AKHOUNDI et al., 2016). As leishmanioses acometem, além do homem, diversas espécies de animais silvestres e domésticos, com distintas formas clínicas na dependência da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do hospedeiro (BRASIL, 2006). Em seres humanos apresenta-se sob quatro formas clínicas: visceral, cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. Das quatro, a leishmaniose visceral (LV) é a mais grave por ser geralmente fatal quando não tratada (WHO, 2018).

A LV é uma doença tropical negligenciada e de importância clínica em países das Américas Central e do Sul, África, Ásia e Europa (COTTON, 2017). Estima-se que a LV esteja entre as doenças infecciosas de maior importância global, no entanto, a enfermidade nem sempre é considerada entre as doenças tropicais prioritárias, uma vez que o estabelecimento de prioridades é realizado, entre outros fatores, com base no número de casos registrados e incapacitação do indivíduo acometido (ALVAR et al., 2012). No entanto, assim como outras doenças tropicais negligenciadas, a LV possui distribuição focal e muitas vezes

ocorre em locais de difícil acesso, dificultando a coleta de dados epidemiológicos (BERN et al., 2008). Em áreas endêmicas, a ocorrência da infecção e manifestação clínica de LV tem sido associada a condições precárias de habitação e saneamento básico, e a falta de acesso à saúde culmina em atrasos no diagnóstico e instituição de tratamento adequado (ALVAR et al., 2006). A LV é frequentemente fatal se não tratada, e estima-se que a maioria dos casos de óbito por LV não são diagnosticados (ALVAR et al., 2012; WHO, 2018). Ainda, considerando que a afecção não é de notificação compulsória em todos os países em que ocorre, e que muitos países não possuem um sistema eficiente de armazenamento de dados, é provável que o número de casos de LV identificados seja inferior ao número de indivíduos infectados pelo parasito, o que reduz a acurácia dos dados de incidência, morbidade e mortalidade pela doença, e consequentemente, prejudica a priorização e instituição de medidas adequadas de controle da LV (ALVAR et al., 2012).

Nas Américas, casos de LV em humanos foram descritos desde o México até a Argentina, em 12 países, com cerca de 96% dos casos relatados no Brasil (PAHO, 2017). A expansão da LV na América Latina tem sido associada à destruição de ecossistemas e modificação de ambientes naturais; urbanização, associada à migração em massa de pessoas das áreas rurais para as cidades; migração de cães domésticos infectados; pobreza, falta de saneamento e medidas de controle de vetores ineficazes ou parcialmente efetivas (ARAÚJO et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2014; HARHAY et al., 2011; LARA-SILVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; PAIVA et al., 2010; RANGEL; VILELA, 2008; ROMERO; BOELAERT, 2010; SALOMÓN et al., 2015). Entre 2001 e 2015 foram reportados 52.176 casos humanos de LV na América Latina, sendo registrados, apenas em 2015, um total de 3.456 casos da doença, com uma taxa de incidência de 2,27 casos por 100.000 habitantes (PAHO, 2017).

No Brasil, a LV encontrava-se inicialmente concentrada em áreas rurais pobres no nordeste do país. Entretanto, desde a década de 1980 as epidemias ocorreram nas grandes cidades, e os relatos de cães e humanos infectados se estenderam gradualmente para o sudeste e centro-oeste do país. Desde 2004,

mais de 3.000 novos casos humanos são registrados no país a cada ano (BRASIL, 2017). Até 2006, o sul do Brasil, Argentina e Uruguai eram considerados áreas não endêmicas para LV. Em 2006, após os surtos de LV na cidade de Assunção, no Paraguai, o primeiro caso humano urbano autóctone de LV na Argentina foi relatado em Posadas, uma cidade na fronteira do Paraguai, no rio Paraná (ACARDI et al., 2010; SALOMÓN et al., 2008, 2009, 2010). Três anos depois, o primeiro surto de LV ocorreu no sul do Brasil, em São Borja, uma cidade na fronteira com a Argentina, a 160 km de Posadas, com mais de 1.200 cães suspeitos identificados (TARTAROTTI et al., 2011). Desde então, a LV expandiu-se na região (GRILL; ZURMENDI, 2017; WHO 2018). O tráfego de cães na fronteira entre o Paraguai e a Argentina pode ter contribuído ainda mais para a expansão da LV canina e humana nessa parte da América Latina (SALOMÓN et al., 2009). No estado de São Paulo o primeiro registro da presença em área urbana de *Lutzomyia longipalpis*, vetor de maior importância no ciclo epidemiológico da doença no país, ocorreu no município de Araçatuba, em 1997 (COSTA et al., 1997). Os primeiros casos autóctones da doença em cães e em humanos no estado foram notificados no mesmo município, respectivamente, em 1998 e 1999 (CAMARGO-NEVES; KATZ, 1999). Entre os anos de 2014 e 2017, a microrregião de Araçatuba apresentou 112 casos confirmados de LV em humanos, com 13 óbitos em quatro anos, distribuídos entre 16 municípios (CVE, 2017). Embora seja uma doença de notificação compulsória no Brasil, estima-se que haja uma falha nos sistemas de vigilância e armazenamento de dados, de forma que o número de humanos assintomáticos ou expostos à LV provavelmente é superior ao número de casos detectados (ALVAR et al., 2012).

A transmissão da leishmaniose ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) e do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (África, Europa e Ásia) (KILLICK-KENDRICK, 1990). O principal vetor de *L. infantum* na América Latina é *Lu. longipalpis*, distribuído desde o México até a Argentina (BRAVO et al., 2013; FELICIANGELI et al., 2003; FERNÁNDEZ et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2016;

GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017; RANGEL; VILELA, 2008). Embora já apresente extensa distribuição geográfica, o vetor está passando por uma expansão territorial no Brasil, Argentina e Uruguai (BRAVO et al., 2013; SALOMÓN et al., 2011; SALOMÓN; ORELLANO, 2005; RANGEL; VILELA, 2008). Anteriormente associada a áreas florestais e rurais, o perfil epidemiológico da LV mudou e os vetores agora estão presentes também em áreas urbanas e periurbanas da América Latina, incluindo grandes cidades no Brasil (BEJARANO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2016; SARAIVA et al., 2009).

A expansão mundial da LV pode estar associada também a outras vias de transmissão, como a via transplacentária, o transplante de órgãos e as transfusões sanguíneas (MANSUETO et al., 2014; SILVA et al., 2013). Em relação à última, diversos estudos têm demonstrado que ela pode ocorrer principalmente se o doador apresentar infecção ativa. No entanto, doadores assintomáticos também são capazes de transmitir a doença, inclusive em áreas não endêmicas (FUKUTANI et al., 2014; MANSUETO et al., 2014). Em áreas endêmicas do Brasil constatou-se uma prevalência de infecção em amostras coletadas de doadores atendidos em bancos de sangue do nordeste do país variando entre 16 e 68%, de acordo com o método diagnóstico utilizado (FUKUTANI et al., 2014; MONTEIRO et al., 2016). Por essa razão testes diagnósticos de rotina devem ser implementados em bancos de sangue, para triagem e exclusão de doadores infectados por *Leishmania* spp. e redução do risco de pacientes submetidos à transfusão sanguínea (MANSUETO et al., 2014).

A ocorrência de LV em áreas onde a *Lu. longipalpis* não foi encontrada, assim como o achado de outros flebotomíneos naturalmente infectados com este agente, sugeriram que existem outros vetores na América Latina, tais como *Lu. cruzi*, *Lu. neivai*, *Lu. sallesi*, *Lu. lenti*, *Lu. forattinii*, *Lu. lloydi*, *Lu. whitmani*, *Lu. termitophila*, *Migonemyia migonei* e *Pintomyia fischeri* (CARVALHO et al., 2010; GALVIS-OVALLOS et al., 2017; GUIMARÃES E SILVA et al., 2017; LANA et al., 2015; LARA-SILVA et al., 2015; MISSAWA et al., 2011; PITA-PEREIRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2016; SARAIVA et al., 2009). Os flebotomíneos são

pequenos, com um a três milímetros de comprimento, recobertos de pêlos, e de coloração clara, cor de palha ou castanho claro, facilmente reconhecíveis por seu comportamento ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas e ligeiramente eretas. É comum encontrá-los no peri-domicílio em galinheiros, chiqueiros, canis e outros locais sombreados, podendo também ser encontrados no intra-domicílio, em repouso nas paredes dos dormitórios. Após a cópula, as fêmeas ovipõem na terra, em lugares úmidos, ricos em matéria orgânica e baixa luminosidade, e os ovos eclodem, geralmente, de sete a dez dias após a postura, dando origem às larvas. Essas se transformam em pupas, que dão origem aos adultos (BRASIL, 2006). Como a atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna, medidas preventivas tais como a utilização de mosquiteiro com malha fina em portas e janelas, o uso de repelentes e a não exposição nos horários de maior atividade do vetor, são recomendações preconizadas em áreas com a presença do vetor (BRASIL, 2006).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são pleomórficos, com uma forma flagelada ou promastigota, que se desenvolve no trato alimentar do vetor e se torna infectante após oito a vinte dias, e outra aflagelada ou amastigota, que se multiplica no interior de células do sistema mononuclear fagocitário de um hospedeiro vertebrado (BRASIL, 2006; DESJEUX, 2004). A principal via de transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos, que inoculam formas promastigotas metacíclicas através da pele do hospedeiro, as quais são fagocitadas pelo sistema mononuclear fagocitário, representadas principalmente pelos macrófagos (KILLICK-KENDRICK, 1990). Dentro dos fagolisossomos, as formas promastigotas transformam-se em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias. As células densamente parasitadas rompem-se, liberando as formas amastigotas que serão fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre, então, a disseminação hematogena e linfática para tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (MURRAY et al., 2005; NARDERER; MCCONVILLE, 2008). A infecção do vetor ocorre pela ingestão de macrófagos parasitados. No sistema digestório do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as formas amastigotas, que se reproduzem por divisão

binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas promastigotas. Estas, por sua vez, sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Quando o inseto realiza novo repasto sanguíneo, formas infectantes são inoculadas, reiniciando-se assim, o ciclo no hospedeiro vertebrado (MARCONDES; VASCONCELLOS, 2018).

O cão é considerado o principal reservatório doméstico envolvido no ciclo de transmissão da LV (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006), e por constituir uma fonte de infecção para os flebotômíneos, contribui para a persistência do parasito em áreas urbanas (FRAGA et al., 2012). Em geral, os casos de leishmaniose visceral canina (LVC) em um município precedem ou estão correlacionados à ocorrência de casos de LV no homem, de modo que o cão pode atuar como sentinela da infecção em humanos (CAMARGO-NEVES, 2007; OLIVEIRA et al., 2001; PRADO et al., 2011). A prevalência de LVC no Brasil, em média, varia entre 1,9 a 35% em áreas endêmicas, podendo alcançar até 53,4% em algumas regiões (BARATA et al., 2013).

As manifestações clínicas da doença em humanos podem variar de formas assintomáticas a envolvimento visceral severo. A resposta imune em casos de LV é mista, e envolve tanto uma resposta mediada por linfócitos do tipo Th1 quanto Th2, sendo que a doença clínica está associada ao predomínio de linfócitos Th2 (KAUSHAL et al., 2014). Após um período de incubação de dois a seis meses, o paciente pode apresentar sinais clínicos de infecção sistêmica persistente, incluindo febre prolongada, apatia, perda de apetite e perda de peso. Quando o parasito alcança a circulação sistêmica e o sistema fagocítico-mononuclear, alterações como linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia também podem estar presentes (BOELAERT et al., 2007; CHAPPUIS et al., 2007). No entanto, a maior parte dos indivíduos infectados por *L. infantum* geralmente apresenta infecção assintomática (SILVEIRA et al., 2010), a qual tem sido associada a uma resposta imune celular protetora mediada por linfócitos Th1 (KAUSHAL et al., 2014).

O diagnóstico preciso da LV ainda representa um desafio (PEREIRA et al., 2014). A identificação de formas amastigotas em amostras de aspirado esplênico é considerada o teste ouro para o diagnóstico de LV devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, no entanto, trata-se de um método invasivo que requer capacitação técnica para sua realização (BOELAERT et al., 2007). Além do baço, o exame microscópico de amostras de linfonodos e medula óssea também representa um método de diagnóstico eficaz, porém com menor sensibilidade quando comparado à avaliação do tecido esplênico (SRIVIDYA et al., 2012). Vários testes para detecção de anticorpos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de LV, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e teste de aglutinação direta (TAD); entretanto, nenhum deles é suficientemente específico para ser utilizado isoladamente (BOELAERT et al., 2007).

Encontram-se disponíveis, ainda, testes imunocromatográficos que detectam anticorpos específicos em amostras de soro, e que possuem como vantagem o fato de se obter resultados de forma rápida, simples e confiável. Estes têm sido utilizados como teste de triagem em casos de suspeita de LV. A maioria dos testes comercialmente disponíveis são baseados nos antígenos recombinantes rK39 e rKE16 (KUMAR et al., 2013). No Brasil, o teste rápido imunocromatográfico OnSite™ (Bio Advance Diagnóstico), que dispõe de proteínas recombinantes rK39, tem sido preconizado para triagem de pacientes suspeitos de LV atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2018). Ainda, o Ministério da Saúde preconiza que os indivíduos com suspeita clínica de LV sejam submetidos à coleta de sangue para avaliação sorológica por ELISA ou RIFI, além da realização de intradermoreação de Montenegro (IDR) (BRASIL, 2006). Os títulos de anticorpos podem ser baixos em pacientes assintomáticos, no entanto, estes indivíduos geralmente apresentam reatividade no teste intradérmico. Da mesma forma, espera-se que pacientes sintomáticos revelem elevados títulos de anticorpos ao teste sorológico e ausência de reatividade na IDR (BRASIL, 2006). Anticorpos anti-*Leishmania* spp. desenvolvem-se principalmente durante a fase aguda da infecção e tendem a

decrecer e até tornarem-se negativos após a resolução dos sintomas. Nesse período, frequentemente observam-se resultados positivos no teste intradérmico em decorrência do desenvolvimento simultâneo de uma reação de hipersensibilidade tardia, sugerindo recuperação da doença. Nesse sentido, um resultado positivo na IDR está associado à imunidade celular e ao controle dos sinais clínicos (LIMA et al., 2012).

Quando os testes sorológicos e parasitológicos não são capazes de elucidar o diagnóstico de LV, os métodos moleculares podem auxiliar no diagnóstico da doença, uma vez que a reação em cadeia da polimerase (PCR) possui elevada sensibilidade e especificidade, e possibilita a detecção de diversas espécies de *Leishmania* em diferentes amostras clínicas (RUITER et al., 2014). As técnicas de PCR são amplamente utilizadas para o diagnóstico de LV em amostras de sangue periférico, medula óssea e aspirado esplênico, e identificam diferentes espécies de *Leishmania* com maior sensibilidade quando comparadas aos métodos parasitológicos (KUMAR et al., 2013). A coleta de amostras de sangue periférico é mais segura e menos invasiva do que os procedimentos para a obtenção de aspirados de medula óssea ou baço (SRIVASTAVA et al., 2011). Podem ser utilizadas tanto as técnicas de PCR convencional quanto PCR em tempo real (qPCR), sendo a última a mais sensível e, portanto, a mais indicada (PEREIRA et al., 2014). A qPCR tem, ainda, como vantagem, o fato de permitir a quantificação da carga parasitária (MOHAMMADIHA et al., 2013).

A sensibilidade e especificidade das reações de PCR variam, ainda, conforme o tecido analisado (GONTIJO; MELO, 2004; SVIRIDYA et al., 2012) e o gene alvo utilizado para amplificação do fragmento de DNA de *Leishmania* spp. (SRIVASTAVA et al., 2011). Diversas sequências alvo têm sido utilizadas para o diagnóstico de LV, entre elas o DNA ribossômico (rDNA), minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) (EL-BESHBISHY et al., 2013), gene da glicoproteína 63 (gp63) e região do espaçador interno transcrito (ITS) (MAURICIO et al., 2004), entre outros. El-Beshbishy e colaboradores (2013), compararam os resultados da PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificam um fragmento do rDNA e do

kDNA e observaram melhores resultados quanto à sensibilidade nas reações em que o gene alvo era o kDNA. Em geral, este é considerado o alvo mais sensível para diagnóstico de LV, uma vez que o DNA do cinetoplasto de *Leishmania* spp. contém 10.000 minicírculos com aproximadamente 200 pb da região conservada (MOHAMMADIHA et al., 2013).

A maioria dos oligonucleotídeos que amplificam um fragmento do DNA de *Leishmania* spp. são gênero-específicos e, portanto, após a identificação do agente, podem ser necessárias outras técnicas moleculares para identificação da espécie envolvida. O método de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste na utilização de enzimas de restrição para clivagem de sítios específicos do DNA de *Leishmania* spp., gerando fragmentos de diferentes tamanhos de acordo com a espécie envolvida (AKMAN et al., 2000). Ainda, a realização de sequenciamento de isolados de amostras clínicas com amplificação do DNA de *Leishmania* spp. também possibilita a identificação da espécie (SINGH et al., 2013).

Evidências sugerem que a saliva do vetor pode influenciar no curso da infecção por *Leishmania* spp. e que o estabelecimento prévio de imunidade específica anti-saliva do flebotomíneo pode auxiliar no desenvolvimento de imunidade celular na infecção por *Leishmania* spp. (AQUINO et al., 2010). A saliva do flebotomíneo contém diversas moléculas que modulam a resposta imune do hospedeiro, e o peptídeo maxadila presente na saliva do vetor *Lu. longipalpis* possui propriedades vasodilatadoras, anti-coagulantes e imunossupressoras (BARRAL et al., 2000). Os componentes salivares do vetor podem auxiliar no estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp., entretanto, a exposição prévia aos antígenos salivares com produção de imunidade específica anti-saliva pode reduzir a infectividade do patógeno e estimular o desenvolvimento de resposta imune celular protetora na LV (AQUINO et al., 2010; BARRAL et al., 2000; PRATES et al., 2012). O desencadeamento de uma resposta imune celular contra o parasito após o contato prévio com a saliva de *Lu. longipalpis* pode ser decorrente de uma reação de hipersensibilidade tardia

no local da picada, que pode transformar a lesão e seu entorno em um local inóspito para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* (PRATES et al., 2012; VINHAS et al., 2007).

Diversos estudos avaliando anticorpos anti-saliva de flebotomíneos tem sugerido que a presença de títulos detectáveis pode atuar como marcador epidemiológico de exposição ao vetor em áreas endêmicas (AQUINO et al., 2010; BARRAL et al., 2000; PRATES et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2010; VINHAS et al., 2007). A importância da saliva do flebotomíneo na infecção por *Leishmania* spp. em humanos ainda não se encontra completamente esclarecida, no entanto, a produção de anticorpos anti-saliva tem sido avaliada em conjunto com a indução de reação de hipersensibilidade tardia ao teste intradérmico em indivíduos infectados por *L. infantum*, para verificar seu papel na resposta imune induzida no hospedeiro (GOMES et al., 2002). A identificação de proteínas salivares auxilia no entendimento das interações entre vetor e hospedeiro, uma vez que a presença ou ausência de imunidade específica anti-saliva pode sugerir um padrão de resposta imune associada à resistência ou suscetibilidade para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp. (TEIXEIRA et al., 2010). O reconhecimento dos diferentes antígenos presentes no homogeneizado salivar do vetor é complexo e o padrão de resposta imune induzido é variável de acordo com o tempo e a intensidade da exposição. Embora vários estudos utilizem o macerado salivar como antígeno para avaliação da resposta imune humoral à saliva do flebotomíneo (AQUINO et al., 2010; BARRAL et al., 2000; GOMES et al., 2002), é possível que ocorra reação cruzada entre os antígenos presentes no macerado salivar e antígenos presentes na saliva de outros insetos (BARRAL et al., 2000). Uma alternativa para corrigir essa limitação é a utilização de proteínas recombinantes obtidas por meio de purificação de moléculas salivares de *Lu. longipalpis*; no entanto, nem sempre é viável por se tratar de uma técnica de difícil execução (TEIXEIRA et al., 2010). Teixeira e colaboradores (2010), identificaram duas proteínas recombinantes salivares de *Lu. longipalpis*, LJM17 e LJM11, que são especificamente reconhecidas no soro de seres humanos que residem em área

endêmica para LV. Dessa forma, a presença de anticorpos contra essas proteínas recombinantes específicas identifica indivíduos expostos ao vetor da LV e pode representar um marcador de exposição ao flebotomíneo *Lu. longipalpis* (TEIXEIRA et al., 2010).

Em função da expansão territorial de casos de LV no Brasil e da possibilidade de a infecção ser negligenciada e subdiagnosticada em seres humanos, os objetivos do presente estudo foram pesquisar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e de fragmento do DNA do parasito no sangue periférico, além de verificar a prevalência de exposição à saliva do flebotomíneo, em indivíduos encaminhados a um hospital localizado na microrregião de Araçatuba-SP, área endêmica para a doença.

1.2. REFERÊNCIAS

1. ACARDI, S.A.; LIOTTA, D.J.; SANTINI, M.S.; ROMAGOSA, C.M.; SALOMÓN, O.D. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 796-799, 2010.
2. AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 1-40, 2016.
3. AKMAN, L.; AKSU, H. S. Z.; WANG, R.Q.; OZENSOY, S.; OZBEL, Y.; ALKAN, Z.; OZCEL, M.A.; CULHA, G.; OZCAN, K.; UZUN, S.; MEMISOGLU, H.R.; CHANG, K.P. Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotypes predicting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region. **Journal of Eukaryotic Microbiology**,

- v. 47, n. 6, p. 545-554, 2000.
4. ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
 5. ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
 6. AQUINO, D.M.; CALDAS, A.J.; MIRANDA, J.C.; SILVA, A.A.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL A. Epidemiological study of the association between anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies and development of delayed-type hypersensitivity to Leishmania antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, p. 825-827, 2010.
 7. ARAÚJO, V.E.M.; PINHEIRO, L.C.; ALMEIDA, M.C.M.; MENEZES, F.C.; MORAIS, M.H.F.; REIS, I.A.; ASSUNÇÃO, R.M.; CARNEIRO, M. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. 1-9, 2013.
 8. BARATA, R.A.; PEIXOTO, J.C.; TANURE, A.; GOMES, M.E.; APOLINÁRIO, E.C.; BODEVAN, E.C.; ARAÚJO, H.S.; DIAS, E.S.; PINHEIRO, A.C. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2013, p.1-7, 2013.
 9. BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E.D.; VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETTO, M.; RIBEIRO, J.M.C. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 6, p. 740–745, 2000.
 10. BEJARANO, E.E.; URIBE, S.; ROJAS, W.; VELEZ, I.D. Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 27–28, 2001.

11. BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. 1-8, 2008.
12. BOELAERT, M.; BHATTACHARYA, S.; CHAPPUIS, F.; SAFI S.H.E.; HAILU, A.; MONDAL, D.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA, M.; PEELING, R.W. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nature Publishing Groups**, v. 5, p. s30-s39, 2007.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral De Laboratórios De Saúde Pública - Cglab. **Nota Informativa Nº 3/2018-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018. 3p.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral. 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 25 nov. 2017.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. 120p.
16. BRAVO, A.G.; QUINTANA, M.G.; ABRIL, M.; SALOMÓN, O.D. The first record of *Lutzomyia longipalpis* in the Argentine northwest. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 1071–1073, 2013.
17. CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, supl.II, p. 63-64, 1999.
18. CAMARGO-NEVES, V.L.F. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 48, p. 12-14, 2007.
19. CARVALHO, M.R.; VALENÇA, H.F.; SILVA, F.J.; PITA-PEREIRA, D.; PEREIRA, T.A.; BRITTO, C.; BRAZIL, R.P.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of

- visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 116, p. 108–110, 2010.
20. CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Publishing Groups**, v. 5, p.873-881, 2007.
 21. COSTA, A.I.P.; CASANOVA, C.; RODAS, L.A.C.; GALATI, E.A.B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saude Publica**, v. 31, n. 6, p. 632-633, 1997.
 22. COTTON, J.A. The expanding world of human leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 5, p. 341-344, 2017.
 23. CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*. Nota prévia. **Hospital**, v. 11, p. 3-9, 1937.
 24. CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica). 2017. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1417_lpi.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2018.
 25. DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.
 26. DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.
 27. EL-BESHBISHY, H.A.; AL-ALI, K.H.; EL-BADRY, A.A. Molecular characterization of cutaneous Leishmaniasis in Al-Madinah Al-Munawarah province, Western Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 334–338, 2013.
 28. FELICIANGELI, M.D.; MAZZARRI, M.B.; BLAS, S.S.; ZERPA, O. Control trial of *Lutzomyia longipalpis* in the Island of Margarita,

- Venezuela. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, p. 1131–1136, 2003.
29. FERNÁNDEZ, M.S.; SALOMÓN, O.D.; CAVIA, R.; PEREZ, A.A.; ACARDI, S.A.; GUCCIONE, J.D. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with enviromental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. **Acta Tropica**, v. 114, p. 81-87, 2010.
 30. FRAGA, D.B.; SOLCA, M.S.; SILVA, V.M.; BORJA, L.S.; NASCIMENTO, D.E.G.; OLIVEIRA, G.G.S.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; VERAS, P.S.T.; DOS SANTOS, W.L.C. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 591-594, 2012.
 31. FUKUTANI, K.F.; FIGUEIREDO, V.; CELES, F.S.; CRISTAL, J.R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; OLIVEIRA, C.I. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 422, p. 1-8; 2014.
 32. GALVIS-OVALLOS, F.; SILVA, F.M.D.; BISPO, G.B.S.; OLIVEIRA, A.G.; GONÇALVES NETO, J.R.; MALAFONTE, R.S.; GALATI, E.A.B. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, n. 2, 2017.
 33. GOMES, R.B.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C.I.; COSTA, J.; MIRANDA, J.C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J.G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* Saliva Concurrent with the Development of Anti-*Leishmania chagasi* Delayed-Type Hypersensitivity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n.10, p. 1530–1534, 2002.
 34. GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 339-349, 2004.
 35. GONZÁLEZ, C.; PAZ, A.; FERRO, C. Predicted altitudinal shifts and reduced spatial distribution of *Leishmania infantum* vector species

- under climate change scenarios in Colombia. **Acta Tropica**, v. 129, p. 83–90, 2014.
36. GRILL, F.; ZURMENDI, M. Leishmaniasis visceral en Uruguay. **Archivos de Pediatría del Uruguay**, v. 88, p. 32-38, 2017.
 37. GUIMARÃES, V.C.F.V.; PRUZINOVA, K.; SADLOVA, J.; VOLFOVA, V.; MYSKOVA, J.; BRANDÃO, P.; FILHO, S.; VOLF, P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites and Vectors**, v. 9, p. 159, 2016.
 38. GUIMARÃES-E-SILVA, A.S.; SILVA, S.O.; SILVA, R.C.R.; PINHEIRO, V.C.S.; REBÊLO, M.M.; MELO, M.N. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1-19, 2017.
 39. HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 403-409, 2011.
 40. KAUSHAL, H.; BRAS-GONÇALVES, R.; NEGI, N.S.; LEMESRE, J.L.; SALOTRA, G.P.P. Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. **Infectious Diseases**, v. 14, p.653-660, 2014.
 41. KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v.4, p.1-24, 1990.
 42. KUMAR, D.; KHANAL, B.; TIWARY, P.; MUDAVATH, S.L.; TIWARY, N.K.; SINGH, R.; KOIRALA, K.; BOELAERT, M.; RIJAL, S.; SUNDAR, S. Comparative evaluation of blood and serum samples in rapid immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 3955–3959, 2013.
 43. LAINSON R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETEERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Press Inc; 1987. p. 12-120.
 44. LANA, R.S.; MICHALSKY, E.M.; FORTES-DIAS, C.L.; FRANÇA-SILVA, J.C.; LARA-SILVA, F.O.; LIMA, A.C.V.M. Phlebotomine sand fly

- fauna and *Leishmania infection* in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a Natural Brazilian Heritage Site. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.
45. LARA-SILVA, F.O.; MICHALSKY, E.M.; FORTES-DIAS, C.L.; FIUZA, V.O.P.; PESSANHA, J.E.M.; REGINA-SILVA, S.; AVELAR, D.M.; SILVA, M.A.; VIANNA, A.C.; LIMA, M.R.; COSTA, A.J.A.; MACHADO-COELHO, L.L.; DIAS, E.S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 128–136, 2015.
 46. LIMA, I.D.; QUEIROZ, J.W.; LACERDA, H.G.; QUEIROZ, P.V.S.; PONTES, N.N.; BARBOSA, J.D.A.; MARTINS, D.R.; WEIRATHER, J.L.; PEARSON, R.D.; WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.B. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic Infection at the Urban Perimeter. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 1, p. 99–107, 2012.
 47. MANSUETO, P.; SEIDITA, A.; VITALE, G.; CASCIO, A. Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, p. 617-627, 2014.
 48. MARCONDES, M.; VASCONCELLOS, S.A. Leishmaniose visceral. Disponível em: <http://www.crmvsp.gov.br/arquivo_zoonoses/LEISHMANIOSE_SERIE_ZOONOSES.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2018.
 49. MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**, v. 128, p. 263–267, 2004.
 50. MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 76-78, 2011.

51. MOHAMMADIHA, A.; MOHEBALI, M.; HAGHIGHI, A.; MAHDIAN, R.; ABADI, A.R.; ZAREI, Z.; YEGANEH, F.; KAZEMI, B.; TAGHIPOUR, N.; AKHOUNDI, B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* infection in human and dog blood samples. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 89–94, 2013.
52. MONTEIRO, D.C.S.; SOUSA, A.Q.; LIMA, D.M.; FONTES, R.M.; PRACIANO, C.C.; FRUTUOSO, M.S.; MATOS, L.C.; TEIXEIRA, M.J.; PEARSON, R.D.; POMPEU, M.M.L. *Leishmania infantum* Infection in Blood Donors, Northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 739-740, 2016.
53. MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, p. 1561–1577, 2005.
54. NADERER, T; MCCONVILLE, M.J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.
55. OLIVEIRA, A.M.; VIEIRA, C.P.; DIBO, M.R.; GUIRADO, M.M.; RODAS, L.A.C.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 233–242, 2016.
56. OLIVEIRA, C.D.L.; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1231-1239, 2001.
57. PAHO (Organização Pan-Americana da Saúde): Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde. 2017. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754>. Acesso em: 08 mar. 2018.
58. PAIVA, B.R.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; MALAFRONTTE, R.S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, p. 126–130, 2010.

59. PEREIRA, M.R.; ROCHA-SILVA, F.; GRACIELE-MELO, C.; LAFUENTE, C.R.; MAGALHÃES, T.; CALIGIORNE, R.B. Comparison between Conventional and Real-Time PCR Assays for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-5, 2014.
60. PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M.A.; ALVES, C.R.; BRAZIL, R.P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, p. 66-69, 2008.
61. PRADO, P. F.; ROCHA, M. F.; SOUSA, J. F.; CALDEIRA, D. I.; PAZ, G. F.; DIAS, E. S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, state of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561-566, 2011.
62. PRATES, D.B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BORGES, V.M. New Insights on the Inflammatory Role of *Lutzomyia longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012.
63. RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2948–2952, 2008.
64. RODRIGUES, A.C.M.; MELO, L.M.; MAGALHÃES, R.D.; MORAES, N.B.; SOUZA JÚNIOR, A.D.; BEVILAQUA, C.M.L. Molecular identification of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 28–32, 2016.
65. ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2010.

66. RUITER, C.M.; VAN DER VEER, C.; LEEFLANG, M.M.G.; DEBORGGRAEVE, S.; LUCAS, C.; ADAMS, E.R. Molecular Tools for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 3147–3155, 2014.
67. SALOMÓN, O.D.; BASMAJDIAN, Y.; FERNÁNDEZ, M.S.; SANTINI, M.S. *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 381–382, 2011.
68. SALOMÓN, O.D.; FELICIANGELI, M.D.; QUINTANA, M.G.; AFONTOS, M.M.S.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 831–846, 2015.
69. SALOMÓN, O.D., ORELLANO, P.W. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475–476, 2005.
70. SALOMÓN, O.D.; QUINTANA, M.G.; BEZZIC, G.; MORÁNC, M.L.; BETBEDERC, E.; VALDÉZ, D.V. Short communication: *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**, v. 113, p. 84–87, 2010.
71. SALOMÓN, O.D.; QUINTANA, M.G.; BRUNO, M.R.; QUIRICONI, R.V.; CABRAL, V. Visceral leishmaniasis in border areas: clustered distribution of phlebotomine sand flies in Clorinda, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 801-804, 2009.
72. SALOMÓN, O.D.; ROSA, J.R.; STEIN, M.; QUINTANA, M.G.; FERNÁNDEZ, M.S.; VISINTIN, A.M.; SPINELLI, G.R.; PASCUAL, M.M.B.; MOLINARI, M.L.; MORÁN, M.L.; VALDEZ, D.; BRUNO, M.R. Phlebotominae (Diptera: Psycodidae) fauna in the Chaco region and cutaneous leishmaniasis transmission patterns in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 578-584, 2008.

73. SARAIVA, L.; CARVALHO, G.M.; GONTIJO, C.M.; QUARESMA, P.F.; LIMA, A.C.; FALCÃO, A.L.; ANDRADE FILHO, J.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1159–1163, 2009.
74. SILVA, L.A.; ROMERO, H.D.; FAGUNDES, A.; NEHME, N.; FERNANDES, O.; RODRIGUES, V.; COSTA, R.T.; PRATA, A. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania* infection in a visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 101-104, 2013.
75. SILVEIRA, F.T.; CORBETT, C.E.P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: indigenous or introduced? A brief review. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 143-147, 2010.
76. SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CRESCENTE, J.A.; SOUZA, A.A.A.; CAMPOS, M.B.; GOMES, C.M.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p.529–535, 2010.
77. SINGH, N.; CHIKARA, S.; SUNDAR, S. SOLiD™ sequencing of genomes of clinical isolates of *Leishmania donovani* from India confirm leptomonas co-infection and raise some key questions. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2013.
78. SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1–6, 2011.
79. SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1065-1078, 2012.
80. TARTAROTTI, A.L.; DONINI, M.A.; DOS ANJOS, C.; RAMOS, R.R. Vigilância de reservatórios caninos. **Boletim Epidemiológico**, v. 13, p. 5-6, 2011.

81. TEIXEIRA, C.; GOMES, R.; COLLIN, N.; REYNOSO, D.; JOCHIM, R.; OLIVEIRA, F.; SEITZ, A.; ELNAIEM, D.E.; CALDAS, A.; SOUZA, A.P.; BRODSKY, C.I.; OLIVEIRA, C.I.; MENDONÇA, I.; COSTA, C.H.N.; VOLF, P.; BARRAL, A.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J.G. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 638-648, 2010.
82. VINHAS, V.; ANDRADE, B.B.; PAES, F.; BOMURA, A.; CLARENCIO, J.; MIRANDA, J.C.; BÁFICA, A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 11, p. 3111–3121, 2007.
83. WHO (World Health Organization). Leishmaniasis. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

2. CAPÍTULO 2 - EXPOSIÇÃO À PICADA DE *LUTZOMYIA* SPP. E À *LEISHMANIA* SPP. EM INDIVÍDUOS DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

2.1. Exposição à picada de *Lutzomyia* spp. e à *Leishmania* spp. em indivíduos de área endêmica para leishmaniose visceral no Brasil

2.1.1. RESUMO - O presente estudo teve como objetivos investigar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-saliva de *Lutzomyia* spp., e a presença do DNA de *Leishmania* spp. no sangue periférico de 284 indivíduos atendidos em um hospital público de área endêmica para leishmaniose visceral (LV). Baseando-se nos resultados de sorologia e da reação em cadeia da polimerase (PCR), 21,1% dos indivíduos foram considerados expostos. A presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-saliva de *Lutzomyia* spp. foi observada em 20,8% e 37,7% dos indivíduos, respectivamente, observando-se uma associação significativa entre a presença dos dois anticorpos. Em 20,4% dos indivíduos verificou-se sororeatividade em ambos os testes, 17,3% apresentavam anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp. sem a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e um indivíduo apresentava somente anticorpos anti-*Leishmania* spp. sem a presença de anticorpos anti-saliva de flebotomíneo. Em apenas um indivíduo foi possível amplificar fragmento do DNA de *Leishmania* spp. no sangue periférico. Concluiu-se que a infecção por *Leishmania* spp. pode estar sendo subdiagnosticada em áreas endêmicas para LV e, portanto, sugere-se que indivíduos atendidos em hospitais sejam melhor avaliados quanto à possibilidade de infecção e posterior desenvolvimento da doença. Ainda, a presença de anticorpos anti-saliva de flebotomíneo pode ser um possível indicador de exposição ao vetor.

Palavras-chave: anticorpos, imunidade humoral, reação em cadeia da polimerase em tempo real, saliva, sorologia

2.1. Exposure to the bite of *Lutzomyia* spp. and to *Leishmania* spp. in people of an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil

2.1.2. ABSTRACT - The present study aimed to investigate the presence of anti-*Leishmania* spp. and anti-saliva of *Lutzomyia* spp. antibodies, and the presence of *Leishmania* spp. DNA in the peripheral blood of 284 people attended at a public hospital in an area endemic for visceral leishmaniasis (VL). Based on the results of serology and PCR, 21.1% of the people were considered exposed. The presence of antibodies anti-*Leishmania* spp. and anti-saliva of *Lutzomyia* spp. was observed in 20.8% and 37.7% of the individuals, respectively, with a significant association between the presence of both antibodies. In 20.4% of the people there was serum reactivity in both tests, 17.3% had antibodies anti-saliva of *Lutzomyia* spp. without the presence of anti-*Leishmania* spp. antibodies, while one individual had only anti-*Leishmania* spp. antibodies without the presence of antibodies against saliva of sand flies. In only one individual it was possible to amplify the DNA fragment of *Leishmania* spp. in peripheral blood. It was concluded that the infection by *Leishmania* spp. may be underdiagnosed in areas endemic for VL and, therefore, it is suggested that people referred to hospitals should be better evaluated for the possibility of infection and subsequent development of the disease. Furthermore, the presence of antibodies anti-sandfly saliva may be an indicator of exposure to vector.

Keywords: antibodies, humoral immunity, real-time polymerase chain reaction, saliva, serology

2.1.3. Introdução

Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada, nas Américas, pela *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*). A doença já foi descrita desde o México até a Argentina, com 95% dos casos humanos ocorrendo no Brasil (WHO, 2018). O país, que há duas décadas concentrava os casos de LV na região nordeste, apresentou uma dispersão territorial da doença, com casos notificados em todas as regiões e mais de 3000 casos humanos por ano na última década (BRASIL, 2017). No estado de São Paulo, o primeiro registro da presença em área urbana de *Lutzomyia longipalpis*, vetor de maior importância no ciclo epidemiológico da doença no país, ocorreu no município de Araçatuba, em 1997 (COSTA et al., 1997). Os primeiros casos autóctones da doença em cães e em humanos no estado foram notificados no mesmo município, respectivamente, em 1998 e 1999 (CAMARGO-NEVES; KATZ, 1999). Entre os anos de 2014 e 2017, o estado de São Paulo registrou 505 casos de LV, 112 dos quais foram confirmados na microrregião de Araçatuba, que abrange 16 municípios. Enquanto a taxa de letalidade no estado foi da ordem de 7,9% no período, na microrregião de Araçatuba a mesma foi de 11,6% (CVE, 2017).

O diagnóstico preciso da LV representa ainda um desafio. Apesar do desenvolvimento de novas técnicas sorológicas e moleculares nas últimas décadas, os métodos parasitológicos diretos com visualização do parasito em aspirados esplênicos, de linfonodos e de medula óssea constituem uma ferramenta importante no diagnóstico definitivo da doença (MANSUETO et al., 2014; SRIVIDYA et al., 2012). Trata-se de uma técnica de baixo custo e elevada especificidade, porém com sensibilidade variável de acordo com o tecido utilizado (GONTIJO; MELO, 2004; SRIVIDYA et al., 2012). O teste de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) tem sido amplamente utilizado para imunodiagnóstico de LV no Brasil, entretanto, apresenta algumas limitações, como a baixa sensibilidade na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos, e a possibilidade de reações cruzadas com agentes etiológicos da leishmaniose

tegumentar e doença de Chagas, o que pode levar a resultados falso-positivos em áreas em que existe a ocorrência de ambas as doenças (GONTIJO; MELO, 2004). Os métodos moleculares podem auxiliar no diagnóstico da doença nos casos em que os testes sorológicos e parasitológicos não foram capazes de elucidar o diagnóstico e identificar a espécie de *Leishmania* (PEREIRA et al., 2014). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica com elevada sensibilidade e especificidade, que tem sido amplamente utilizada para detecção de diversas espécies de *Leishmania* em diferentes amostras clínicas (RUITER et al., 2014).

Evidências sugerem que a saliva do vetor pode influenciar no curso da infecção por *Leishmania* spp. e que o estabelecimento prévio de imunidade específica anti-saliva do flebotomíneo pode auxiliar no desenvolvimento de imunidade celular na infecção por *Leishmania* spp. (AQUINO et al., 2010). A saliva do flebotomíneo contém diversas moléculas que modulam a resposta imune do hospedeiro, e o peptídeo maxadila presente na saliva do vetor *Lu. longipalpis* possui propriedades vasodilatadoras, anti-coagulantes e imunossupressoras (BARRAL et al., 2000). Os componentes salivares do vetor podem auxiliar no estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp., entretanto, a exposição prévia aos antígenos salivares com produção de imunidade específica anti-saliva pode reduzir a infectividade do patógeno e estimular o desenvolvimento de resposta imune celular protetora na LV (AQUINO et al., 2010; BARRAL et al., 2000; PRATES et al., 2012).

Diversos estudos avaliando anticorpos anti-saliva de flebotomíneos tem sugerido que a presença de títulos detectáveis pode atuar como marcador epidemiológico de exposição ao vetor em áreas endêmicas (AQUINO et al., 2010; BARRAL et al., 2000; PRATES et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2010; VINHAS et al., 2007). A importância da saliva do flebotomíneo na infecção por *Leishmania* spp. em humanos ainda não se encontra completamente esclarecida, no entanto, a produção de anticorpos anti-saliva tem sido avaliada em conjunto com a indução de reação de hipersensibilidade tardia ao teste intradérmico em indivíduos infectados por *L. infantum*, para verificar seu papel

na resposta imune induzida no hospedeiro (GOMES et al., 2002). A identificação de proteínas salivares auxilia no entendimento das interações entre vetor e hospedeiro, uma vez que a presença ou ausência de imunidade específica anti-saliva pode sugerir um padrão de resposta imune associada à resistência ou suscetibilidade para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp. (TEIXEIRA et al., 2010). O reconhecimento dos diferentes antígenos presentes no homogeneizado salivar do vetor é complexo e o padrão de resposta imune induzido é variável de acordo com o tempo e a intensidade da exposição (VINHAS et al., 2007).

Em função da expansão territorial de casos de LV no Brasil e da possibilidade de a infecção ser negligenciada e subdiagnosticada em seres humanos, os objetivos do presente estudo foram pesquisar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e de fragmento do DNA do parasito no sangue periférico, além de verificar a prevalência de exposição à saliva do flebotômico em indivíduos encaminhados a um hospital localizado na microrregião de Araçatuba-SP, área endêmica para a doença.

2.1.4. Material e Métodos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para Experimentação Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Campus de Araçatuba, sob protocolo CAEE: 39096314.8.0000.5420.

2.1.4.1. Delineamento experimental

O estudo foi conduzido entre julho e dezembro de 2015. Durante este período, devido à dificuldade de obtenção de amostras de sangue da população, foram obtidas amostras de indivíduos atendidos em um hospital da microrregião de Araçatuba-SP, que compreende os municípios de Andradina, Araçatuba, Avanhandava, Bilac, Birigui, Braúna, Buritama, Castilho, Guaraçá, Ilha Solteira,

Mirandópolis, Nova Independência, Penápolis, Pereira Barreto, Santo Antônio do Aracanguá e Valparaíso (CVE, 2017) (Figura 1). A maioria dos municípios é considerada como área de transmissão intensa de LV e de leishmaniose visceral canina (LVC) (COMITÊ DE LVA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 2011). Aqueles pacientes que, por qualquer motivo, precisavam ser submetidos à coleta de sangue foram convidados a participar do estudo. No caso de concordância, após a assinatura de um termo de consentimento esclarecido pelos pacientes, ou por seus responsáveis legais, duas alíquotas de sangue, colhidas por um enfermeiro responsável, eram separadas para o estudo; uma para a realização das provas sorológicas e a outra para a pesquisa de fragmento de DNA do parasito por PCR em tempo real. Os critérios de inclusão foram idade superior a dois anos, independente de sexo, sem história pregressa de LV e com residência permanente em um dos municípios da microrregião. Os resultados dos exames foram sigilosos e fornecidos somente ao médico responsável pelo atendimento.

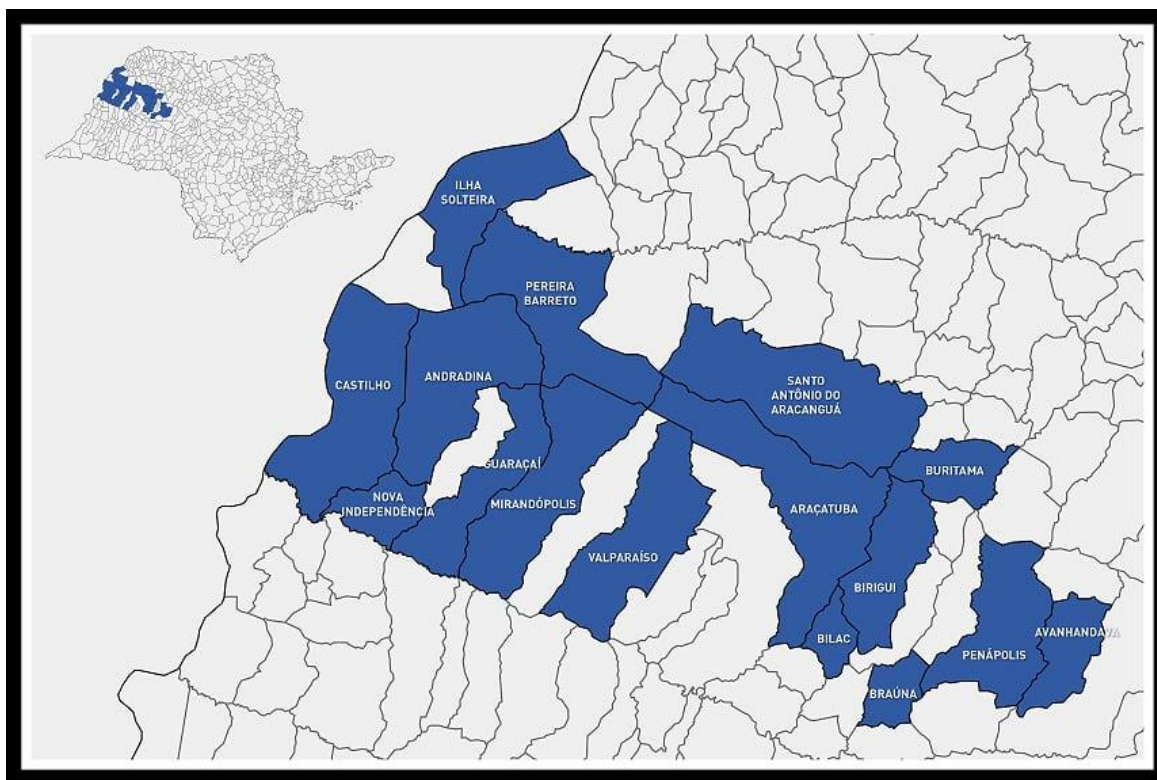


Figura 1 – Mapa da microrregião de Araçatuba–SP compreendendo 16 municípios, de acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo.

Dos 1238 indivíduos atendidos no hospital público da microrregião de Araçatuba-SP e que foram submetidos à coleta de sangue no período determinado, 284 concordaram em participar do estudo. A população experimental selecionada encontra-se abaixo descrita (Tabela 1).

2.1.4.2. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) com o uso de antígeno total de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/74/PP75) na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato (0,01M, pH 9,5), e incubadas por toda a noite, a 4°C. Após lavagem as placas foram bloqueadas com 150 µL de PBS e 10% de leite Molico® e incubadas à temperatura ambiente, durante uma hora. Foram, então, adicionados a cada poço 100 µL de amostra de soro diluído na concentração de

1:200 em PBS-T, e incubados por três horas à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se, em cada poço, 100 µL de conjugado anti-IgG humano (Anti-human IgG Peroxidase Conjugate nº A6029 – Sigma®, Saint Louis, MO, EUA), diluído na concentração de 1:20.000. Depois de um período de incubação de 45 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados a cada poço 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB Substrate Reagent Set nº 555214 - BD®) durante 30 minutos. A reação foi interrompida utilizando-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico 2N. Entre cada uma das etapas, foram realizadas três lavagens com tampão fosfato salina 0,05M acrescido de Tween (PBS-T 0,05%). A densidade óptica foi avaliada em duplicata, em espectrofotômetro a 450 nm. A determinação do ponto de corte foi estabelecida utilizando-se a média das densidades ópticas de indivíduos sorologicamente negativos e de área não endêmica para LV, acrescida de três desvios padrões. Em todas as placas foi incluída, como controle positivo das reações, uma amostra de soro de paciente acometido por LV, proveniente de área endêmica para a doença.

2.1.4.3. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp.

Para determinação da presença de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp. por ELISA utilizou-se metodologia previamente descrita (ROHOUSOVA et al., 2005). Como antígeno, foram utilizadas glândulas salivares de *Lutzomyia* spp. da geração F1 obtidas a partir de flebotomíneos capturados no município de Cametá-PA, Brasil, submetidas à lise conforme descrito anteriormente (BATISTA et al., 2016). As microplacas foram cobertas com 100 µL de lisado de glândula salivar de *Lutzomyia* spp. a 600ng/mL em tampão carbonato-bicarbonato (0,01M pH 9), e incubadas por toda a noite a 4°C. Após lavagem, as placas foram bloqueadas com 150 µL de PBS e 10% de leite Molico® e incubadas a 37°C, durante uma hora. Foram adicionados 100 µL de soro diluído a 1:50 em PBS-T, e as placas foram incubadas por 90 minutos, a 37°C. Em seguida, adicionaram-se em cada poço 100 µL de conjugado anti-IgG humano (Anti-

human IgG Peroxidase Conjugate nºA6029 – Sigma®, Saint Louis, MO, EUA), diluído na concentração de 1:20.000 e as placas incubadas durante 45 minutos, a 37°C. Depois do período de incubação, foram adicionados a cada poço 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB Substrate Reagent Set nº 555214 - BD®) durante 30 minutos. A reação foi interrompida utilizando-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico 2N. Entre cada uma das etapas foram realizadas três lavagens com tampão fosfato salina 0,05M acrescido de Tween (PBS-T 0,05%). A densidade óptica foi avaliada em duplicata, em espectrofotômetro a 450 nm. A determinação do ponto de corte foi estabelecida utilizando-se a média das densidades ópticas de indivíduos sorologicamente negativos e de área não endêmica para LV, acrescida de dois desvios padrões. Em todas as placas foi incluída, como controle positivo das reações, uma amostra de soro de indivíduo sororeagente, proveniente de área endêmica para LV.

Os resultados dos testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-saliva de *Lutzomyia* spp. foram quantificados em unidade de ELISA (UE), sendo o mesmo controle positivo de cada placa utilizado como calibrador e determinado como 100 UE (PERSICHETTI et al., 2017). Os pontos de corte das reações para anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-saliva de *Lutzomyia* spp. foram, respectivamente, 38,51 UE e 29,43 UE.

2.1.4.4. PCR em Tempo Real

2.1.4.4.1. Extração de DNA

As amostras de sangue total foram acondicionadas em tubos contendo citrato de sódio a 3,2%. Após descongelamento em temperatura ambiente, 700 µL de sangue total foram submetidos à extração de DNA utilizando-se fenol-clorofórmio (Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 nº P3808–Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EUA), conforme previamente descrito (OLIVEIRA et al., 2015). Água ultrapura foi utilizada como controle negativo da reação. A concentração e pureza do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotômetro

(ND-1000, Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, EUA) pela mensuração da relação de absorbância 260/280. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR em tempo real.

2.1.4.4.2. Amplificação de fragmento de DNA de *Leishmania* spp.

Para a amplificação do fragmento de DNA de *Leishmania* spp. foram utilizados oligonucleotídeos previamente descritos, que amplificam um fragmento de 120 pb do minicírculo do kDNA de *Leishmania* (RANASINGHE et al., 2008). A reação de PCR em Tempo Real foi realizada utilizando-se um mastermix comercial com o fluoróforo SYBR Green (SYBR® Green JumpStart Taq ReadMix S4438, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EUA), 600 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 5µL de DNA, com concentração média de 85 ng/µL, totalizando um volume final de 25µL. As amostras, em triplicata, foram amplificadas em termociclador (CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto, momento onde os dados de fluorescência foram coletados. Na sequência, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação (*melt curve*), de 60°C até 95°C, com incremento de 0,5°C a cada 5 segundos. Um valor de *threshold cycle* (Ct) foi calculado para cada amostra, pela determinação do ponto onde a fluorescência ultrapassou o limiar de detecção. Em cada placa de PCR foi acrescentado, em triplicata, um controle negativo da reação, constituído pelo mastermix acrescido de água livre de nucleases substituindo a amostra, e um controle positivo, constituído por *L. infantum* na concentração de 2×10^8 promastigotas/mL.

2.1.4.5. Análise estatística

O teste de independência de Pearson (qui-quadrado) com correção de continuidade de Yates foi utilizado para verificar a associação entre as

avaliações sorológicas e as variáveis idade e sexo. O nível de significância foi ajustado para o teste de múltiplas hipóteses por meio do método de Bonferroni e foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,01$. Para verificar a correlação entre os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-saliva de *Lutzomyia* spp. utilizou-se teste de correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R v3.4.3 (R Core Team®).

2.1.5. Resultados

Dos 284 indivíduos avaliados, baseando-se nos resultados de sorologia e PCR, 60 (21,1%) foram considerados expostos à *Leishmania* spp. Destes, 48 (80%) eram do sexo feminino, 12 (20%) do sexo masculino, 1 (1,7%) era adolescente, 51 (85%) adultos e 8 (13,3%) idosos (Tabela 1).

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. foi observada em 59 (20,8%) indivíduos, enquanto em 107 (37,7%) observou-se a presença de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp.. Um total de 58 (20,4%) indivíduos foram sororeagentes em ambos os testes; 49 (17,3%) apresentavam anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp. sem a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e 1(0,4%) apresentava anticorpos anti-*Leishmania* spp. sem a presença de anticorpos anti-saliva de flebotomíneo. Em 176 (61,9%) indivíduos observou-se um resultado negativo em ambas as sorologias. Em apenas um indivíduo (0,35%) foi possível amplificar um fragmento de kDNA de *Leishmania* spp. no sangue periférico. Tratava-se de indivíduo encaminhado ao hospital com quadro clínico não compatível com LV, cujas provas sorológicas para pesquisa de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp. e de anticorpos anti-*Leishmania* spp. foram negativas.

Entre os indivíduos com resultados positivos aos testes sorológicos, os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. variaram entre 41,30 e 135,68 UE, e os títulos de anticorpos anti-*Lutzomyia* spp. entre 31,17 e 150,55 UE. Na avaliação sorológica para *Leishmania* spp., observou-se que 35,6% (21/59) dos

indivíduos reagentes apresentaram títulos maiores do que duas vezes o ponto de corte. Quando da avaliação dos anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp., constatou-se que 73,8% (79/107) dos indivíduos apresentaram títulos maiores do que duas vezes o ponto de corte, alcançando valores cinco vezes superiores.

Tabela 1 – Número e percentagem, segundo o sexo e a faixa etária, de uma população de 284 indivíduos encaminhados a um hospital público de área endêmica para leishmaniose visceral, localizado na microrregião de Araçatuba-SP, considerados infectados por *Leishmania* spp. segundo a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. ou PCR em tempo real para amplificação de fragmento do DNA de *Leishmania* spp.

Sexo	População Total (n=284)	População Infectada (n=60)
Masculino	92 (32,4%)	12 (20,0%)
Feminino	192 (67,6%)	48 (80,0%)
Faixa etária		
≤18 anos	9 (3,2%)	1 (1,7%)
19-65 anos	226 (79,6%)	51 (85,5%)
> 65 anos	49 (17,3%)	8 (13,3%)

A associação observada entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-saliva de *Lutzomyia* spp. foi estatisticamente significativa ($p=1,81 \times 10^{-26}$) (Tabela 2). Quando da avaliação das unidades de ELISA anti-*Leishmania* spp. e anti-saliva de *Lutzomyia* spp., observou-se regressão altamente significativa ($p = 2,78 \times 10^{-40}$) (Figura 2), sugerindo correlação moderada a forte ($\rho = 0,683$). Não foi observada associação significativa entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e as variáveis sexo ($p=1,000$) e idade ($p=0,290$), e entre a presença de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp. e as variáveis sexo ($p=0,826$) e idade ($p=0,621$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Associações entre presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp., anti-saliva de *Lutzomyia* spp., sexo e idade de 284 pacientes encaminhados a um hospital público de área endêmica para leishmaniose visceral, na microrregião de Araçatuba-SP

Variável Resposta	Variável Independente	Estatística (χ^2) ^a	Graus de liberdade	P-valor
Anti- <i>Leishmania</i>	Sexo	0,000	1	1,000
Anti- <i>Leishmania</i>	Idade	2,473	2	0,290
Anti- <i>Leishmania</i>	Anti-saliva	113,345	1	$1,81 \times 10^{-26}$ *
Anti-saliva	Sexo	0,048	1	0,826
Anti-saliva	Idade	0,954	2	0,621

^aTeste de independência de Pearson; *p<0,01

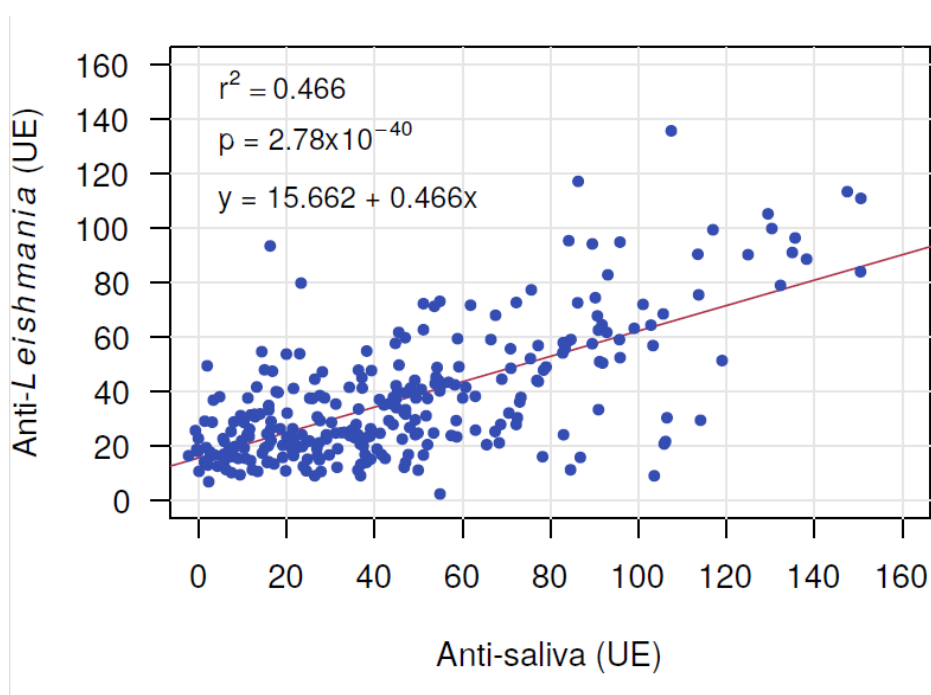


Figura 2 - Diagrama de dispersão e reta ajustada das unidades de ELISA (UE) anti-*Leishmania* spp. e anti-saliva de *Lutzomyia* spp. de indivíduos encaminhados a um hospital público de área endêmica para leishmaniose visceral, na microrregião de Araçatuba-SP.

2.1.6. Discussão

A prevalência de indivíduos com anticorpos anti-*Leishmania* spp. na população estudada (20,8%) foi semelhante à observada em estudo realizado no estado do Rio Grande do Norte (24,6%), área também endêmica para LV no nordeste do país (LIMA et al., 2012), e superior à verificada em estudo prospectivo conduzido no estado do Pará, região Norte do país, cuja prevalência foi de 12,7% (SILVEIRA et al., 2010). Embora ambos os estudos tenham sido realizados com crianças e adultos de áreas endêmicas para LV, Lima e colaboradores (2012) conduziram o experimento com indivíduos residentes em bairros vizinhos a locais com casos confirmados da doença. A sorologia positiva em humanos pode ser utilizada para a confirmação de uma infecção recente ou aguda por *L. infantum*, independente da presença de sintomas (MANSUETO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2010), entretanto não indica um risco de progressão para a forma clínica da doença (SILVA et al., 2011). Em geral, a maior parte dos indivíduos infectados por *L. infantum* apresenta infecção assintomática (SILVEIRA et al., 2010). Inicialmente verifica-se um aumento do título de anticorpos séricos, que diminui com o passar do tempo, enquanto ocorre um desenvolvimento de uma resposta predominantemente celular, que pode ser evidenciada por meio de intradermoreação de Montenegro (IDR). Por outro lado, indivíduos que progridem para a forma clínica da doença apresentam elevados títulos de anticorpos, que tendem a diminuir apenas após tratamento efetivo (FUKUTANI et al., 2014; LIMA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2010).

Os indivíduos avaliados no presente estudo não foram encaminhados ao hospital com suspeita clínica de LV, no entanto, apresentavam sintomas inespecíficos, tais como febre, que levaram à necessidade de colheita de sangue para avaliação hematológica. Uma limitação do presente estudo é a ausência de exame físico e exames complementares direcionados à suspeita de LV. Dessa forma, não foi possível classificar os indivíduos aqui avaliados em sintomáticos ou assintomáticos em relação à doença. Alguns possuíam títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. elevados ao teste de ELISA, sugerindo que deveriam ser

melhor avaliados quanto à possibilidade de uma infecção ativa, e à necessidade da realização de IDR. Um fator agravante em relação à LV é o longo tempo decorrido entre o aparecimento dos sintomas e a confirmação do diagnóstico da doença, que pode variar de um a 16 meses (MANSUETO et al., 2014). A suspeita clínica de LV deve ser considerada quando um paciente proveniente de área de ocorrência de transmissão apresentar febre e esplenomegalia associada ou não à hepatomegalia (BRASIL, 2006). No entanto, se não houver uma suspeita clínica, muitas vezes o diagnóstico é inicialmente de febre de origem desconhecida (MANSUETO et al., 2014). Por ser uma doença de notificação compulsória no Brasil e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico deve ser feito de forma precisa e o mais precocemente possível (BRASIL, 2006). Entretanto, as falhas nos sistemas de vigilância e armazenamento de dados, somadas aos casos assintomáticos não identificados e de pacientes que vêm à óbito sem a confirmação da doença, contribuem para que a LV seja subdiagnosticada e até mesmo negligenciada (ALVAR et al., 2012). Assim, o diagnóstico sorológico pode ser uma ferramenta bastante interessante em áreas endêmicas (SILVA et al., 2011). O critério clínico-laboratorial para diagnóstico de casos humanos suspeitos é baseado na pesquisa do parasito por exame parasitológico direto, PCR e/ou cultura; ou avaliação sorológica por meio de reação de imunofluorescência indireta, com título de 1:80 ou superior, excluídos diagnósticos diferenciais (BRASIL, 2006).

A prevalência de parasitemia identificada pela técnica de PCR em tempo real na população estudada foi de 0,35%, valor inferior ao observado em outros estudos conduzidos em áreas endêmicas, entretanto, a amostragem populacional deve ser considerada. No experimento em que foi observada prevalência de 17%, os indivíduos apresentavam sorologia positiva e residiam em bairros vizinhos a locais com casos humanos de LV confirmados (LIMA et al., 2012); no estudo em que se constatou prevalência de 32% entre indivíduos residentes em área endêmica no estado de Minas Gerais, uma parcela da população avaliada residia na mesma casas de pacientes com LV ou com histórico de tratamento para LV (SILVA et al., 2013). A amplificação de DNA do

parasito no sangue periférico deve sempre ser interpretada em conjunto com a apresentação clínica do indivíduo e resultados de outros testes diagnósticos (RUITER et al., 2014), e não necessariamente indica risco de progressão da infecção para LV. Em estudo prévio, observou-se que após três a quatro anos da realização da técnica de PCR para avaliação de LV, nenhum dos indivíduos com resultados positivos desenvolveu a doença (SILVA et al., 2011). Apesar de alguns autores sugerirem que melhores resultados são obtidos quando se utiliza a técnica de PCR em amostras de medula óssea ou aspirados esplênicos (LIMA et al., 2012), pesquisas verificaram que a sensibilidade e a especificidade da PCR em amostras de sangue e medula óssea são elevadas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre a utilização dos dois tecidos, sugerindo que a utilização de sangue pode ser melhor, uma vez que não se trata de um método invasivo como a coleta de medula óssea (RUITER et al., 2014).

No presente estudo verificou-se predomínio de infecção em indivíduos do sexo feminino (80%), refletindo provavelmente o tipo de amostragem, já que a distribuição sexual da população avaliada era também composta predominantemente por mulheres (67,6%), divergindo de resultados que têm associado a ocorrência de infecção por *L. infantum* à indivíduos do sexo masculino (MARZOCHI et al., 2009). No que se refere à faixa etária, não foi verificada associação entre a ocorrência de infecção e a idade. A maior parte dos indivíduos infectados possuía entre 19 e 65 anos (adultos), refletindo também a amostragem populacional, que compreendia 79,6% dos indivíduos avaliados dentro desta faixa etária. Em muitas áreas endêmicas do Brasil, a LV é mais frequentemente observada em crianças (MARZOCHI et al., 2009). Até aproximadamente a década de 1970, crianças com menos de 10 anos de idade correspondiam a 80% dos casos (MARZOCHI et al., 2009). Com o passar dos anos o perfil etário dos indivíduos com LV tem se alterado, com crescente número de indivíduos adultos infectados (MARZOCHI et al., 2009).

Cerca de 37,7% dos indivíduos avaliados no presente experimento apresentavam anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp.. Estes podem servir como marcadores epidemiológicos de exposição ao vetor em áreas endêmicas

para LV (PRATES et al., 2012). A marcada resposta imune humoral desenvolvida após exposição à saliva do flebotomíneo observada neste experimento, em que elevados títulos de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp. foram detectados na maior parte dos indivíduos reagentes ao teste sorológico, sugere que exposições repetidas ao vetor em seres humanos que vivem em áreas endêmicas podem reforçar o estímulo antigênico, conforme previamente descrito (VINHAS et al., 2007).

A saliva dos flebotomíneos contém várias substâncias farmacologicamente ativas capazes de interferir com as respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro. Em camundongos, ela pode alterar o padrão de resposta imune anti-*L. infantum* de Th1, predominantemente celular e protetora, para uma resposta do tipo Th2, basicamente humoral e não protetora (GOMES et al., 2002; PRATES et al., 2012). No presente estudo constatou-se que 20,4% dos indivíduos apresentavam anticorpos anti-saliva e anti-*Leishmania* spp., além de correlação moderada a forte entre a intensidade de ambos os títulos, divergindo de um experimento prévio em que se observou que crianças que apresentavam títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* não desenvolveram uma resposta imune humoral contra a saliva dos vetores (GOMES et al., 2002). A presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. sem a ocorrência concomitante de anticorpos anti-saliva foi observada em apenas um (0,4%) indivíduo de nosso experimento. No estudo mencionado, indivíduos que não apresentavam uma resposta imune contra as proteínas salivares desenvolveram anticorpos anti-*Leishmania* associados com a progressão da doença (GOMES et al., 2002). No presente trabalho, como os resultados obtidos foram encaminhados diretamente ao médico responsável pelo atendimento hospitalar para que este decidisse a conduta a ser tomada, e a maioria dos indivíduos compareceu ao hospital para uma única consulta quando foi colhida a amostra de sangue, não tivemos acesso às informações sobre a evolução do quadro clínico dos mesmos, uma limitação do presente estudo.

Em 17,3% dos indivíduos avaliados foi possível identificar anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia* spp. sem a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

Uma limitação encontrada no presente estudo foi a utilização de macerado de glândula salivar de *Lutzomyia* spp. para obtenção do antígeno empregado. A resposta imune ao homogeneizado salivar é complexa, e os vários antígenos podem induzir a um padrão diferente de resposta, variável de acordo com o tempo e a intensidade da exposição. Apesar de vários estudos terem sido realizados com a mesma técnica (AQUINO et al., 2010; BARRAL et al., 2000; GOMES et al., 2002), é possível que haja reação cruzada entre os antígenos presentes no macerado salivar e antígenos presentes na saliva de outros insetos (BARRAL et al., 2000), o que pode ter ocorrido em parte dos indivíduos em que se observou anticorpos anti-saliva sem a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. A presença de anticorpos contra proteínas recombinantes salivares específicas, LJM17 e LJM11, representa um importante marcador de exposição de seres humanos ao flebotomíneo *Lu. longipalpis* (TEIXEIRA et al., 2010). A proteína recombinante salivar LJM11, ao ser testada em galinhas expostas à picada de *Lu. longipalpis*, demonstrou ser um antígeno confiável, uma vez que apresentou resultados similares aos obtidos com a utilização de macerado salivar de *Lu. longipalpis* como antígeno no teste de ELISA, além de não ser reconhecida pelo soro de galinhas expostas à saliva de outros vetores (SOARES, 2012). Embora exista a possibilidade de ocorrência de reatividade cruzada, o estudo citado sugere que a utilização do macerado salivar como antígeno pode ser um marcador confiável de exposição ao vetor da LV.

Ademais, esse padrão de resposta imune observado pode ser decorrente de vários fatores como a possibilidade de terem sido expostos a flebotomíneos não infectados pelo parasito, ao tempo necessário para que haja a soroconversão após exposição ao parasito, ou ainda ao desenvolvimento de uma resposta imune predominantemente celular nesses indivíduos, que mesmo infectados não apresentam anticorpos anti-*Leishmania* detectáveis (FUKUTANI et al., 2014; LIMA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2010). O desencadeamento de uma resposta imune celular contra o parasito após o contato prévio com a saliva de *Lu. longipalpis* pode ser decorrente de uma reação de hipersensibilidade tardia no local da picada, que pode transformar a lesão e seu entorno em um

local inóspito para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* (PRATES et al., 2012; VINHAS et al., 2007).

2.1.7. Conclusão

Em função da considerável prevalência de exposição à *Leishmania* spp. em pacientes sem suspeita clínica prévia de LV observada no presente estudo, fica evidente que a infecção por *Leishmania* spp. pode estar sendo subdiagnosticada em áreas endêmicas e, portanto, sugere-se que indivíduos atendidos em hospitais sejam melhor avaliados quanto à possibilidade de infecção e posterior desenvolvimento da doença, uma vez que existem orientações para a confirmação de casos suspeitos, as quais devem ser seguidas. Ainda, a PCR em tempo real de sangue periférico não foi eficaz para o diagnóstico da doença; e a presença de anticorpos anti-saliva de flebotomíneo pode atuar como um marcador de exposição ao vetor *Lutzomyia* spp.

2.1.8. REFERÊNCIAS

1. ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
2. AQUINO, D.M.; CALDAS, A.J.; MIRANDA, J.C.; SILVA, A.A.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL A. Epidemiological study of the association between anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies and development of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, p. 825-827, 2010.
3. BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E.D.; VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETTO, M.; RIBEIRO, J.M.C. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **American**

- Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 6, p. 740–745, 2000.
4. BATISTA, L.F.S.; DA MATTA, V.L.R.; TOMOKANE, T.Y.; PACHECO, A.D.; SILVEIRA, F.T.; ROSSI, C.N.; MARCONDES, M.; LAURENTI, M.D. Canine antibody response to *Lutzomyia longipalpis* saliva in endemic area of visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 361-364, 2016.
 5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120p.
 6. BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral. 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 03 fev. 2018.
 7. CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, supl.II, p. 63-64, 1999.
 8. Comitê de Leishmaniose Visceral Americana da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, SP, Brasil. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, atualizado em novembro de 2011. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 8, n. 96, p. 32-36, 2011.
 9. COSTA, A.I.P.; CASANOVA, C.; RODAS, L.A.C.; GALATI, E.A.B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saude Publica**, v. 31, n. 6, p. 632-633, 1997.
 10. CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica). Casos confirmados de leishmaniose visceral segundo LPI e ano de notificação, estado de São Paulo, 2014 a 2017. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia->

epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1417_lpi.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2018.

11. FUKUTANI, K.F.; FIGUEIREDO, V.; CELES, F.S.; CRISTAL, J.R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; OLIVEIRA, C.I. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 422, p. 1-8, 2014.
12. GOMES, R.B.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C.I.; COSTA, J.; MIRANDA, J.C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J.G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* Saliva Concurrent with the Development of Anti-*Leishmania chagasi* Delayed-Type Hypersensitivity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n.10, p. 1530–1534, 2002.
13. GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 339-349, 2004.
14. LIMA, I.D.; QUEIROZ, J.W.; LACERDA, H.G.; QUEIROZ, P.V.S.; PONTES, N.N.; BARBOSA, J.D.A.; MARTINS, D.R.; WEIRATHER, J.L.; PEARSON, R.D.; WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.B. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic Infection at the Urban Perimeter. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 1, p. 99–107, 2012.
15. MANSUETO, P.; SEIDITA, A.; VITALE, G.; CASCIO, A. Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, p. 617-627, 2014.
16. MARZOCHI, M.C.; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M.V.; SOUZA, M.B.; MADEIRA, M.F.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, A.O.; MARZOCHI, K.B.F. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, n. 5, p. 570-80, 2009.
17. OLIVEIRA, F.M.; COSTA, L.H.; BARROS, T.L.; ITO, P.K.; COLOMBO, F.A.; CARVALHO, C.; PEDRO, W.A.; QUEIROZ, L.H.; NUNES, C.M.

First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. **Acta Tropica**, v. 150, p. 176-181, 2015.

18. PEREIRA, M.R.; ROCHA-SILVA, F.; GRACIELE-MELO, C.; LAFUENTE, C.R.; MAGALHÃES, T.; CALIGIORNE, R.B. Comparison between Conventional and Real-Time PCR Assays for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-5, 2014.
19. PERSICHETTI, M.F.; SOLANO-GALLEGU, L.; VULLU, A.; MASUCCI, M.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; VITALE, F.; PENNISI, M.G. Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 119, p. 1-8, 2017.
20. PRATES, D.B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BORGES, V.M. New Insights on the Inflammatory Role of *Lutzomyia longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012.
21. RANASINGHE, S.; ROGERS, M.E.; HAMILTON, J.G.; BATES, P.A.; MAINGON, R.D. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 9, p. 875-882, 2008.
22. ROHOUSOVA, I.; OZENSOY, S.; OZBEL, Y.; VOLF, P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. **Parasitology**, v. 130, n. 5, p. 493-499, 2005.
23. RUITER, C.M.; VAN DER VEER, C.; LEEFLANG, M.M.G.; DEBORGGRAEVE, S.; LUCAS, C.; ADAMS, E.R. Molecular Tools for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 3147-3155, 2014.
24. SILVA, L.A.; ROMERO, H.D.; FAGUNDES, A.; NEHME, N.; FERNANDES, O.; RODRIGUES, V.; COSTA, R.T.; PRATA, A. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania*

- infection in a visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 101-104, 2013.
25. SILVA, L.A.; ROMERO, H.D.; NASCENTES, G.A.N.; COSTA, R.T.; RODRIGUES, V.; PRATA, A. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 261-266, 2011.
 26. SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CRESCENTE, J.A.; SOUZA, A.A.A.; CAMPOS, M.B.; GOMES, C.M.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p.529–535, 2010.
 27. SOARES, B.N.R.R. **Soroconversão de galinhas para antígenos salivares de *L. longipalpis*: possibilidade de uso como sentinela em área endêmica para leishmaniose visceral**. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.
 28. SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1065-1078, 2012.
 29. TEIXEIRA, C.; GOMES, R.; COLLIN, N.; REYNOSO, D.; JOCHIM, R.; OLIVEIRA, F.; SEITZ, A.; ELNAIEM, D.E.; CALDAS, A.; SOUZA, A.P.; BRODSKY, C.I.; OLIVEIRA, C.I.; MENDONÇA, I.; COSTA, C.H.N.; VOLF, P.; BARRAL, A.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J.G. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 638-648, 2010.
 30. VINHAS, V.; ANDRADE, B.B.; PAES, F.; BOMURA, A.; CLARENCIO, J.; MIRANDA, J.C.; BÁFICA, A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Human

anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 11, p. 3111–3121, 2007.

31. WHO (World Health Organization). Leishmaniasis. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 29 abr. 2018.