

ALEKSON MENDONÇA MENDES

ENSAIO COMUNITÁRIO MASCARADO PARA AVALIAR A
EFETIVIDADE DE UMA VACINA CONTRA A
LEISHMANIOSE CUTÂNEA NA MICRORREGIÃO DE
CARATINGA, MINAS GERAIS, SUDESTE DO BRASIL,
2002-2007.

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALEKSON MENDONÇA MENDES

ENSAIO COMUNITÁRIO MASCARADO PARA AVALIAR A
EFETIVIDADE DE UMA VACINA CONTRA A
LEISHMANIOSE CUTÂNEA NA MICRORREGIÃO DE
CARATINGA, MINAS GERAIS, SUDESTE DO BRASIL,
2002-2007.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas do Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Ouro Preto, como requerimento parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho.

Co-Orientador: Prof. Dr. Wilson Mayrink.

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
2008

M539e

Mendonça-Mendes, Alekson.

Ensaio comunitário mascarado para avaliar a efetividade de uma vacina contra a *leishmaniose* cutânea na microrregião de Caratinga, Minas Gerais, Sudeste do Brasil, 2002-2007 [manuscrito] / Alekson Mendonça Mendes. - 2008.

xxv, 132f.: il., color; graf.; tabs. mapas.

Orientador: Prof. Dr. George Luiz Lins Machado-Coelho.
Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Mayrink.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Epidemiologia das doenças parasitárias.

1. *Leishmaniose* - Teses. 2. Vacinas - Teses. 3. Epidemiologia - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 614.47

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Suporte financeiro:

FAPEMIG – Fundação de Amparo a pesquisa do estado de Minas Gerais.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde

FBB – Fundação Banco do Brasil

Apoio logístico:

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto.

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais.

SES-MG – Secretaria de Estado da Saúde do Estado de Minas Gerais.

SMS-Car – Secretaria Municipal de Saúde de Caratinga.

CISMIRECAR – Consórcio Intermunicipal da microrregião de Caratinga.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Epidemiologia da Escola de Farmácia e do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto e no Ambulatório Dr. Paulo Araújo Magalhães – Caratinga, Minas Gerais.

“O homem que trabalha somente pelo que recebe, não merece ser pago pelo que faz”.

(Abraham Lincoln).

Dedico este trabalho a Deus, que é a minha fonte de fé e de esperança. Obrigado pela vida, pela oportunidade de estudar, pela proteção, pela benção, pela saúde, pela coragem, pela sabedoria, pelos ensinamentos, pela misericórdia e por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho. Agradeço também pela presença constante durante toda minha e por nunca me abandonar durante as batalhas mais árduas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Ao Doutor George Luiz Lins Machado-Coelho, pela orientação, ensinamentos, apoio, incentivos, paciência e confiança depositada em mim. Depois de anos de convívio, vários trabalhos, além de um grande exemplo de pesquisador, tornou-se também um grande amigo. Muito obrigado por sua valiosa contribuição em minha formação. Agradeço também pelos conselhos, pela parceria, por sua amizade, pelo apoio e incentivo constantes e por no momento mais difícil que passei em minha vida ter demonstrado total compreensão e disposição em me ajudar, minha família também agradece.

Ao Professor Doutor Wilson Mayrink agradeço por ter me dado a oportunidade de fazer parte desta grande equipe de pesquisadores, por seus ensinamentos, por sua extrema atenção e pelas facilidades a nós concedidas.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela contribuição à minha formação e em especial a Doutora Maria Terezinha Bahia.

À Secretária do Curso de Pós-Graduação, Cida, que com sua extrema atenção e dedicação, busca ajudar a todos.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia (LEPI) da Universidade Federal de Ouro Preto, principalmente á aqueles que conviveram diretamente comigo – Alexandra, Ana Paula (APCC), Ana Paula, Cléia, Cristiane, Daniel, Gabriela, Gustavo, Josiane, Liliane, Luciana, Raquel, Silvia - pelo agradável convívio, pela alegria, tornando as coisas mais agradáveis e pela grande amizade cultivada. Sentirei saudades...

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação pelo excelente convívio, discussões científicas e amizade, em especial, aos colegas Alexandra, Leonardo e Wendel, pois não foram poucas as noites que passamos em claro estudando. As suas companhias e brincadeiras tornavam os estudos mais prazerosos.

A Alexandra de Paiva Araújo grande amiga, companheira de mestrado, de laboratório, dos vários trabalhos de campo meus agradecimentos são eternos. Valeu pelo aprendizado, pelo incentivo, pelas várias discussões que em muito nos acrescentaram, pelas várias horas de convivência pacífica e engraçadas e pelas várias horas de estudos que através das inacabáveis brincadeiras aprendíamos e nos divertíamos. A nossa amizade e a minha consideração por você são imensuráveis.

À bolsista de iniciação científica do Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Ouro Preto, Liliane Maria Vidal Siqueira, pela grande contribuição dada a este trabalho, pela dedicação e pelo ótimo trabalho desenvolvido em equipe.

Ao Sr. Jair Cecílio de Paula, pelos ensinamentos durante a minha passagem por Caratinga, pela atenção dada aos pacientes tratados no CTL-Caratinga, pelo apoio e pela colaboração imprescindível para a execução deste trabalho.

A equipe técnica da UDS-Caratinga, Edna C.R.Muniz, Jane P.Medina, José Lúcio Barbosa, Rogério C. da Silva e Walter R. da Silva que sempre com muita boa vontade contribuíram muito para que este trabalho fosse realizado, sem as suas colaborações seria impossível a realização deste trabalho.

A todos os voluntários residentes nas áreas de estudo de Bom Jesus do Galho, Córrego Novo, Dom Lara, Entre Folhas, Imbé de Minas, Sapucaia e Ubaporanga pela humildade e disposição em participar deste estudo.

Aos pacientes atendidos no Ambulatório Paulo Araújo Magalhães, da UDS-Caratinga, pela paciência e boa vontade.

Ao pessoal do Laboratório de Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Universidade Federal de Ouro Preto, pelo incentivo que me deram a seguir a carreira acadêmica: Prof. Roney, Prof. Luiz Fernando, Prof., Angélica, Adão, Nonote, Vani, Maurício.

A Prof. Doutora Rosângela Barbosa de Deus por ter me iniciado na vida científica.

Aos meus irmãos da ETERNA e GLORIOSA República MASMORRA: Ex-alunos, Badalo, Sucêgo, Muamba, Molusko, Jagunçú, Tamudo, Splinter, Insônia, Discunjuntado e todos que ainda hão de fazer parte dessa maravilhosa família meus agradecimentos são eternos.

Aos meus amados pais, Enoque e Lúcia, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e apoio incondicionais. Vocês serão sempre o meu referencial, o meu aconchego e o meu porto firme. Infelizmente não existem palavras para descrever o quanto os amos e o quanto sou grato a vocês.

As minhas irmãs queridas irmãs, Maria Lúcia (Lucinha) e Sandra Márcia, por confiarem em mim e por me terem feito esforçar cada vez mais para mostrar-lhes que podemos ser fortes e superar qualquer obstáculo. Esta vitória também tem esforços teus, pois sempre pensei em vocês quando fraquejava. Estarei sempre com vocês.

Aos meus avôs e avós, (Gentil e Adelaide, Geraldo “Nenzin” e Maldir), jamais esquecerei aqueles teus conselhos, aquela confiança que me passavam e de tudo que fizeram por mim. Vocês são eternos em meu coração.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por me trazerem tanta alegria.

Ao Sr. Roberto, D. Cidinha, Dinda e tia Leninha pelo apoio que sempre me deram.

A toda minha família que sempre me apoiou em todas as minhas caminhadas.

Ao Sr. Vagner, D. Teresa, D. Alice, Vagner e Filipe pelo aconchego, receptividade, amizade e confiança que em mim depositam.

À Livia (Minha Linda), pelo amor, carinho, amizade, compreensão e incentivos dado desde o momento em que nos conhecemos. Obrigado pelas longas conversas de puro incentivo que me deste e por sempre me apoiar. Saiba que também estarei sempre ao teu lado.

...e a todos aqueles que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão!!!

SUMÁRIO

Resumo	xv
Abstract	xvi
Lista de figuras	xvii
Lista de tabelas	xix
Lista de quadros	xxi
Lista de figuras do anexo	xxii
Lista de tabelas do anexo	xxiii
Lista de abreviaturas e siglas	xxiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. O parasita	6
2.2. Espécies do gênero <i>Leishmania</i>	7
2.3. Vetores	9
2.4. Reservatórios	12
2.5. Transmissão	13
2.6. Aspectos Clínicos da doença	15
2.6.1. Formas Clínicas	16
2.7. Resposta Imunológica	19
2.8. Diagnóstico	21
2.8.1. Diagnóstico Clínico-Epidemiológico	21
2.8.2. Diagnóstico Laboratorial	21
2.8.2.1. Exame parasitológico direto	21
2.8.2.2. Cultura	22
2.8.2.3. Inoculação em animais	22
2.8.2.4. Histopatologia	23
2.8.2.5. Reação em cadeia de polimerase (PCR)	23
2.8.3. Diagnóstico Imunológico	24
2.8.3.1. Intradermorreação de Montenegro (IDRM)	24
2.8.3.2. Sorologia	26

2.9. Tratamento	27
2.10. Estratégias de Controle	29
2.11. Vacina Anti-LTA	30
2.11.1. Resposta imune após vacinação	31
2.11.2. Ensaio vacinal	33
3. JUSTIFICATIVAS	38
4. OBJETIVOS	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1. Desenho do Estudo	43
5.2. Área geográfica do Estudo	43
5.3. Serviço de referência para LTA em Caratinga	45
5.4. Seleção das áreas e localidades do estudo submetidas ao Ensaio Vacinal	45
5.5. Censo populacional e Georeferenciamento	48
5.6. Determinação do tamanho populacional anual	49
5.7. Divulgação do trabalho e recrutamento dos voluntários para vacinação	50
5.8. Triagem dos indivíduos	50
5.9. Esquema de vacinação	51
5.10. Composição da vacina	51
5.11. Composição do placebo	51
5.12. Métodos diagnósticos para identificação dos casos de LTA	52
5.13. Diagnóstico clínico	52
5.14. Reação intradérmica de Montenegro	53
5.15. Diagnóstico parasitológico	53
5.16. Processamento dos dados	54
5.17. Análise dos dados	54
5.18. Comitê de ética	55
6. RESULTADOS	56
6.1. População recenseada nas 108 localidades selecionadas para o Ensaio Comunitário	57
6.2. Caracterização da população eleita para o Ensaio Comunitário	68

6.3. Casos de LTA pós-vacinal identificados na população recenseada	70
6.4. Incidência da LTA na série temporal de 1980 a 2006	73
6.5. Eficácia da vacina anti-LTA Mayrink e cols (1979) observada no Ensaio Comunitário	74
7. DISCUSSÃO	75
8. CONCLUSÕES	84
9. RECOMENDAÇÕES	86
10. ANEXOS	88
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

RESUMO

A complexidade eco-epidemiológica da LTA tem dificultado o desenvolvimento de estratégias eficazes para a prevenção e controle da doença. Portanto, o desenvolvimento de uma vacina segura e efetiva ainda permanece a forma mais promissora para prevenir a LTA.

O objetivo do presente estudo foi determinar a redução da incidência da LTA de uma série temporal de 18 anos, após 5 anos do uso I.M. de duas doses da vacina produzida com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mortas.

Um ensaio comunitário mascarado foi executado em 108 pequenas áreas geográficas de uma região endêmica de LTA em Bom Jesus do Galho, Caratinga, Córrego Novo, Entre Folhas, Imbé de Minas e Ubaporanga localizadas na microrregião de Caratinga, leste do Estado de Minas Gerais, no período de 2002 a 2007. Estas comunidades depois de estratificadas pelo tamanho populacional (N = 11.773) foram randomizadas através de amostra simples para receber vacina (N=50) ou placebo (N=58). Um total de 5.606 indivíduos de 5 a 59 anos e que não apresentavam história de LTA e apresentavam IDRMs negativos, foram eleitos para participar do ensaio. As taxas de incidência observadas nas áreas vacinadas ou controles foram comparadas através da análise de co-variância ajustada pela incidência média anual pré-vacinal. Diferenças entre grupos foram consideradas significantes quando $P < 0.05$.

Não foi observada diferença significativa ($p = 0,357$) entre as incidências no período pré-vacinal observadas em ambas as áreas (vacina e controle). Foi observada uma flutuação cíclica do número de casos durante o período de observação em ambas as áreas. Uma redução no número de casos foi observada na área vacinada ($n=1$) em relação à observada na área controle ($n=9$) ou entre o grupo de indivíduos que recusaram ($n=9$) a participar do ensaio.

Este ensaio demonstrou que a vacina foi capaz de conferir proteção aos indivíduos vacinados. No entanto frente ao pequeno número de casos de LTA observados na região durante esses últimos cinco anos faz-se necessário a manutenção da vigilância epidemiológica das áreas selecionadas para participar do ensaio.

Palavras Chaves: Ensaio Comunitário, Leishmaniose Cutânea, Vacina, Estudo de Série Temporal, Epidemiologia.

ABSTRACT

The eco-epidemiological complexity of American cutaneous leishmaniasis (ACL) has made it difficult to elaborate an efficient strategy for the management of the disease, and the development of an effective vaccine remains the most promising approach.

The objective of the study was to determine the reduction in the incidence of ACL in a 18 years of a temporal trend following 5 years of an intramuscular administration of two doses of a killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine.

A community-based blind trial was conducted during 2002-2007 in 108 areas in the Caratinga micro-region of Minas Gerais (Brazil) that is endemic for ACL. Communities were stratified according to population size, and areas were randomly selected to receive vaccine ($n=50$) or placebo ($n=58$). The post-vaccination ACL incidence rates in the two areas were compared through co-variant analysis.

A cyclic fluctuation in the number of ACL cases recorded during the 18-year pre-vaccination period was observed in both areas but there were no significance differences in overall incidence rates. Following the vaccination campaign, a significant reduction in the number of cases of ACL was observed in the vaccine area in comparison with the placebo area and with groups of individuals who refused to take part in the trial.

This study demonstrated that the vaccine was able to confer protection against ACL. However, since there have been few cases of ACL in the study region since 2002, it was not possible to detect a significant difference between the average incidence rates in the post-vaccination period between the various groups. Continuation of epidemiological surveillance in the study areas is recommended in order to determine the precise efficacy of the vaccine.

Keywords: Community trial; Cutaneous Leishmaniasis; Vaccine; Temporal trends; Epidemiology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica do universo populacional recenseado nas 108 localidades da microrregião de Caratinga eleitas para o Ensaio Comunitário, 2002-2007, segundo o tipo de vacina (Vacina x Placebo) e os setores censitários.

Figura 2: Domicílios cadastrados, recenseados e georeferenciados durante o censo populacional nas áreas pré-selecionadas para realização do Ensaio Comunitário na microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo a área e hidrografia (Córregos).

Figura 3: Distribuição geográfica dos domicílios recenseados nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga para a realização do Ensaio Comunitário, 2002-2007, segundo a área e o tipo de vacina.

Figura 4: Organograma do estudo.

Figura 5: Distribuição geográfica dos indivíduos com IDRMs naturalmente positiva detectadas na fase de triagem do Ensaio Comunitário realizados na microrregião de Caratinga, 2002-2007.

Figura 6: Distribuição espacial dos casos de leishmaniose tegumentar americana progressiva detectados na população recenseada nas áreas submetidas ao Ensaio Comunitário, 2002-2007.

Figura 7: Distribuição espacial da população eleita para a avaliação da efetividade vacinal segundo a área geográfica de residência e o tipo de vacina (vacina/placebo) nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga, 2002-2007.

Figura 8: Distribuição espacial dos casos de Leishmaniose cutânea pós-vacinal detectados no Ambulatório Paulo Araújo Magalhães na população recenseada das áreas submetidas ao Ensaio Comunitário, 2002-2007.

Figura 9: Número de casos de acordo a área selecionada a receber vacina (-----▲-----) ou placebo (—●—) e entre aqueles indivíduos que recusaram (----■----) a participação no Ensaio Comunitário, realizado na microrregião de Caratinga, 1985-2007.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição da população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga para o ensaio comunitário, 2002-2007, segundo sexo e faixa etária.

Tabela 2: Distribuição populacional por área geográfica do ensaio comunitário na microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo a aceitação em participar do estudo.

Tabela 3: Distribuição populacional do grupo Recusa segundo o sexo e a faixa etária da população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário da microrregião de Caratinga, 2002-2007.

Tabela 4: Resultado da IDRМ pré-vacinal segundo a positividade e as áreas geográficas da população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário da microrregião de Caratinga, 2002-2007.

Tabela 5: Distribuição e prevalência da IDRМ naturalmente positiva na população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário na microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo o sexo e faixa etária.

Tabela 6: Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana progressa identificados na população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário da microrregião de Caratinga, segundo a área de estudo e o sexo e prevalência da doença.

Tabela 7: Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana progressa identificados na população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário da microrregião de Caratinga, segundo a área de estudo e a faixa etária.

Tabela 8: Distribuição da população eleita para o Ensaio Comunitário nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo o tipo de vacina e as áreas selecionadas a participarem do estudo.

Tabela 9: Distribuição da população eleita para o Ensaio Vacinal nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo o tipo de vacina e o sexo.

Tabela 10: Distribuição da população eleita para o Ensaio Vacinal nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo o tipo de vacina e a faixa etária.

Tabela 11: Distribuição dos casos de Leishmaniose Cutânea pós-vacinal na população elegível para o Ensaio Vacinal nas áreas pré-selecionadas da microrregião de Caratinga submetidas ao Ensaio Comunitário, 2002-2007, segundo a área de estudo e os grupos avaliados: recusa placebo e vacina.

Tabela 12: Incidência média anual (por 1.000 habitantes) no período pré e pós-vacinal de acordo com o grupo populacional: vacina, placebo e recusa.

Tabela 13: Cálculo da eficácia da vacina anti-LTA Mayrink e cols. (1979).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros de classificação dos coeficientes de detecção/100.000 habitantes, segundo o Ministério da Saúde.

Quadro 2: Setores censitários utilizados como referência para seleção das áreas geográficas do ensaio com o respectivo tamanho populacional e coeficiente de detecção (RESENDE, 2004).

Quadro 3: Protocolo de procedimentos para identificação de casos de LTA.

LISTA DE FIGURAS DO ANEXO

Figura 1: Registro dos pacientes com LTA diagnosticados no Ambulatório Paulo Araújo Magalhães, da UDS-Caratinga, no SIL (Sistema de Informação de Leishmaniose), na plataforma ACESS.

Figura 2: Distribuição geográfica do grupo recusa segundo o tipo de vacina e as áreas geográficas da microrregião de Caratinga pré-selecionadas para realização do ensaio comunitário, 2002-2007.

Figura 3: Casos de LTA pós-vacinal segundo os grupos: Recusa, Placebo, Vacina e IDRM Naturalmente positivo e a hidrografia (córregos) das áreas de estudo.

LISTA DE TABELAS DO ANEXO

Tabela 1: Boletim de cadastramento e acompanhamento dos trabalhos de vacina anti-LTA.

Tabela 2: Planilha de anotação das coordenadas geodésicas dos domicílios (GPS).

Tabela 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- BALB/c – Camundongos susceptíveis à infecção por *L. major*
- BGC - Bacilo Calmette Guérin
- CD - Coeficiente de Detecção
- CD4+ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos Tauxiliares
- CD8+ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos Tcitotóxicos
- CMSP - Células Mononucleares do Sangue Periférico
- CONEP - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
- CTL - Centro de Tratamento de Leishmaniose de Caratinga
- DNA - Ácido desoxirribonucléico.
- FNS - Fundação Nacional de Saúde
- ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay.
- ES - Espírito Santo
- GPS - Global Position System
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICM - Índice comparativo de morbidade
- IM - intramuscular
- IDRM - Intradermorreação de Montenegro
- IL2 - Interleucina 2
- IL4 - Interleucina4
- IL5 - Interleucina 5
- IL6 - Interleucina 6
- IL9 - Interleucina 9
- IL10 - Interleucina 10
- IL12 - Interleucina 12
- IL13 - Interleucina 13
- INF- γ - Interferon gama
- iNOS - Óxido nítrico redutase
- LC - Leishmaniose cutânea
- LIT - Liver Infusion Tryptose.

LM - Leishmaniose mucosa
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
MG - Minas Geras
MS - Ministério da Saúde.
N - Número absoluto (indivíduos)
NK - Células Natural Killer
NNN - Meio de cultivo Nicole, Novy & Neal (Meio de cultivo bifásico)
NO - Oxido Nítrico
OMS - Organização Mundial de Saúde
pH - Potencial hidrogeniônico
PCR - Reação da Polimerase em Cadeia.
RIFI - Imunofluorescência Indireta
Sb - Sal de antinômio
SES - MG – Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais
SMS - Secretária Municipal de Saúde
SIL - Sistema de Informação de Leishmaniose
SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública do Ministério da Saúde
FNS - Fundação Nacional de Saúde
TA - Temperatura axilar
Th1 - Reposta celular
TNF - Fator de Necrose Tumoral
UDS-Caratinga - Unidade Descentralizada de Saúde de Caratinga
UDS-DRS-CF - Unidade Descentralizada de Saúde da Regional de Coronel Fabriciano
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto
WHO - World Health Organization.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana é um importante problema de saúde pública no Brasil e nas Américas, sendo endêmica em 66 países do Novo Mundo (DESJEUX, 2004). Estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco, que existam 12 milhões de pessoas infectadas e que ocorra 1 a 1,5 milhões de novos casos por ano (WHO, 2006).

No Brasil a LTA apresenta-se em fase de expansão geográfica, registrando coeficientes de detecção (CD) que oscilam entre 3,8 a 22,9 por 100.000 habitantes no período de 1980 a 2004 (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; GOMES & NEVES, 1998; PASSOS et al., 2001; BRASIL, 2004).

No Vale do Rio Doce, localizado na Região Leste do Estado de Minas Gerais, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie responsável pela transmissão da doença (MAYRINK et al., 1979; VOLPINI et al., 2006), cuja infecção é adquirida principalmente em áreas agrícolas (MAYRINK et al., 1979; MACHADO-COELHO et al., 1999). Na região a doença se manifesta na forma de uma simples lesão cutânea a lesões múltiplas disseminadas, e mais raramente na forma mucosa (5,1%) (MACHADO-COELHO et al., 2005).

Entre o ano de 1965 e 2007 foram notificados pelo Centro de Tratamento de Leishmaniose da Unidade Descentralizada de Saúde da Regional de Coronel Fabriciano (UDS-DRS-CF), localizado no município de Caratinga, aproximadamente 8.000 casos. Os pacientes atendidos procedem geralmente da zona rural (82%), são de cor não preta (80,7%), da faixa etária de 10 a 21 anos (45%), e estima-se que 40% apresentem a atividade agropastoril como a ocupação principal (MACHADO-COELHO, 1999).

A prevenção via vacinação deveria ser o método de escolha para o controle da doença em função de determinados fatores: (a) necessidade de múltiplas doses por tempo prolongado das terapias vigentes – sal de antimônio, anfotericina B, pentamidina; (b) efeitos colaterais

freqüentes; (c) dificuldades de aplicação de métodos de controle e prevenção para os padrões de transmissão selvático e peridomiciliar da leishmaniose. A viabilidade do uso de uma vacina é reforçada na medida em que indivíduos que se recuperam da doença permanecem refratários a re-infecções posterior pela mesma espécie (ALEXANDER, 1989; LIEW, 1989; KEDZIERSKI et al., 2006).

As primeiras avaliações vacinais contra a leishmaniose tegumentar em humanos iniciaram com SALLES GOMES (1939) e PESSOA & PESTANA (1940), utilizando extrato bruto de promastigotas mortas como antígeno imunizante. Posteriormente, Mayrink e colaboradores em uma série de ensaios demonstraram a segurança, imunogenicidade e eficácia (aproximadamente 50%) de uma vacina anti-LTA, preparada com um pool de cinco cepas de promastigotas inativadas. Em 1991 em reunião promovida pela OMS, ficou definida a necessidade do desenvolvimento de uma vacina monocepa em substituição a vacina pentavalente, originalmente utilizada. A cepa de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foi escolhida para formulação da vacina devido à facilidade de cultivo em meio de cultura (NNN) e a sua menor patogenicidade - menor efeito indutivo de lesão mucosa. A nova vacina monocepa, assim como a pentavalente, também promoveu um aumento da resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e da produção de INF- γ e uma taxa de conversão em torno de 85% da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) nos indivíduos vacinados, demonstrando também apresentar um bom potencial imunogênico (MENDONÇA et al., 1995).

Apesar dos vários ensaios realizados por Mayrink e colaboradores utilizando a vacina monocepa, principalmente na região do Vale do Rio Doce, ainda não foi possível concluir em que grau estas campanhas contribuíram para a redução da incidência da LTA. Sendo assim, foi proposto a realização de um ensaio comunitário na microrregião de Caratinga, afim de

comparar a redução das taxas de incidência de LTA de áreas vacinadas em relação às taxas de incidência de LTA das áreas placebo (controle). A escolha dessa microrregião deve-se ao fato da área já ser trabalhada pela equipe de pesquisadores há quatro décadas, cujas características epidemiológicas são amplamente conhecidas e da existência de um Centro de Referência para o tratamento das leishmanioses, localizado no município de Caratinga.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - O parasita

A LTA é uma antropozoonose endêmica no continente americano, causada por parasitas do gênero *Leishmania*, protozoário dimórfico e intracelular obrigatório, que pode acometer tanto a pele quanto a mucosa e com ciclo de vida digenético (heteroxênico).

Segundo LEVINE et al., (1980) e LAINSON & SHAW (1992), estes parasitas possuem a seguinte classificação taxonômica:

Reino: *Protista* (HAECKEL, 1866)

Sub-reino: *Protozoa* (GOLDFUSS, 1817)

Filo: *Sarcomastigophora* (HONIGBERG & BALAMUTH, 1963)

Sub-filo: *Mastigophora* (DESING, 1866)

Classe: *Zoomastigophorea* (CALKINS, 1909)

Ordem: *Kinetoplastida* (HONIGBERG, 1963 emend VICKERMAM, 1976)

Subordem: *Trypanosomatina* (KENT, 1880)

Família: *Trypanosomatidae* (DOFLEIN, 1901 emend GROBBEN, 1905)

Gênero: *Leishmania* (ROSS, 1903)

A transmissão da doença ocorre pela picada de fêmea infectada do gênero *Lutzomia* (LAINSON & SHAW, 1987; WEIGLE & SARAVIA, 1996; DESJEUX, 1996). A fêmea, no momento do repasto sanguíneo, inocula as formas infectivas, promastigotas metacíclicas, na epiderme do hospedeiro. Na tentativa de evadir da resposta imune do hospedeiro, estas formas se ligam a receptores específicos de fagocitose presentes nos histiócitos teciduais e são opsonizadas. Após a opsonização ocorre a formação do vacúolo parasitóforo, local onde as promastigotas se diferenciam em amastigotas, formas arredondas e sem flagelo (DESCONTEAUX & TURCO, 1999; CUNNINGHAM, 2002). Dentro destes vacúolos parasitóforos as amastigotas reproduzem-se por fissão binária, rompem o macrófago infectado

e são liberadas ao meio para infecção de novos macrófagos e um novo ciclo inicia-se (LAINSON & SHAW, 1992; PIMENTA et al., 1992; WEIGLE & SARAVIA, 1996; DESCOTEAUX & TURCO, 1999; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

No Brasil, até a década de setenta, todos os casos eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com a evolução dos métodos de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies começaram a serem descritas. Segundo GONTIJO & CARVALHO (2003) e MARZOCHI & MARZOCHI (1994), no Brasil, pelo menos seis espécies de *Leishmania* pertencentes ao sub-gênero *Leishmania e Viannia* (LAINSON & SHAW, 1987) já foram isoladas de lesões em seres humanos.

2.2 – Espécies do gênero *Leishmania*

As espécies de *Leishmania* identificadas no Brasil apresentam uma vasta distribuição geográfica, algumas apresentando características eco-epidemiológicas e modo de transmissão particular (LAINSON & SHAW, 1998).

Segundo SILVEIRA et al. (2004) os principais agentes etiológicos da LTA no Brasil são a: *Leishmania (L.) amazonensis* (LAINSON & SHAW, 1972), *L. (V.) guyanensis* (FLOCH, 1954 in DIAS-LIMA et al., 2002), *L. (V.) braziliensis* (VIANNA, 1911), *L. (V.) lainsoni* (SILVEIRA et al., 1987), *L. (V.) naiffi* (LAINSON & SHAW, 1989; LAINSON et al., 1990) e *L. (V.) shawi* (LAINSON et al., 1989).

L. (L.) amazonensis – originalmente descrita na região Amazônica, particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”, é considerada como a principal responsável pela maioria dos casos de LTA causados por parasitas do sub-gênero *Leishmania* (LAINSON & SHAW, 1987). Apresenta uma ampla distribuição geográfica nos vários países da América Latina, tais como: Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Panamá, Peru e Venezuela

(ARIAS et al., 1996). A sua distribuição no território brasileiro vem aumentando, já tendo sido descrita nos estados da Bahia (BITTENCOURT et al., 1989; BARRAL et al., 1991), Paraná (SILVEIRA et al., 1990), Santa Catarina (STEINDEL et al., 1997) e Mato Grosso (LAINSON & SHAW, 1970).

L. (V.) braziliensis – apresenta uma ampla distribuição geográfica e uma elevada prevalência, principalmente em regiões não amazônicas (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). Na região Sudeste, é a espécie mais freqüente nos estados de São Paulo (TOLEZANO, 1994, 2001), Rio de Janeiro (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; KAWA & SABROZA, 2002), Espírito Santo (BARROS et al., 1985; FALQUETO et al., 1991, 2003) e Minas Gerais (MAYRINK et al., 1979; PASSOS et al., 1999, VOLPINI et al., 2006). Esses autores tem relacionado a transmissão desta espécie a atividades ocupacionais ligadas ao ambiente, favorecendo a infecção. Em áreas envolvendo a *L. (V.) braziliensis*, a taxa de positividade do teste de Montenegro aumenta com a idade e as reinfecções são raras (SABROZA, 1983; MENDONÇA et al., 1986; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

L. (V.) guyanensis – espécie restrita ao Norte da Bacia Amazônica (LAINSON, 1983; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). Tem-se notificado vários casos na periferia da cidade de Manaus (ARIAS et al., 1996; DESJEUX, 2001). Geralmente o parasito está associado principalmente a florestas de terra firme, áreas não alagadas na estação chuvosa, e bosques de arbustos altos (ARIAS et al., 1996; BRASIL, 2000).

L. (V.) shawi – espécie responsável por casos esporádicos no Amazonas e no Pará (LAINSON et al., 1989; LAINSON, 1997; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

L. (V.) naiffi – foi descrita por LAINSON & SHAW em 1989 e distribui-se pelo Brasil nos estados do Amazonas e Pará, provocando no homem, principalmente a leishmaniose cutânea (LAINSON & SHAW em 1989; LAINSON et al., 1990). THOMAZ-SOCCOL et al.

(1993) demonstraram que este parasita é uma espécie intermediária entre a *L. braziliensis* e a *L. guyanensis*.

L. (V.) lainsoni – distribuiu-se pela região Amazônica, sendo descrita na floresta tropical do norte do Pará, onde foram notificados 23 casos de leishmaniose cutânea provocados por esta espécie (SILVEIRA et al., 1987; ARIAS et al., 1996; LAINSON, 1997; GONTIJO & CARVALHO, 2003; GRAMICCIA & GRADONI, 2005). Em estudo recente BASANO & CAMARGO (2004) também descreve casos de leishmaniose cutânea no estado de Rondônia.

2.3 – Vetores

Os vetores da espécie *Leishmania* sp são dípteros flebotomíneos fêmeas pertencentes a vários gêneros e espécies. A *Lutzomia* sp é o gênero mais freqüente no Novo Mundo (LEMOS et al., 2001). Geralmente, não ultrapassam 0,5 cm de comprimento, apresentam pernas longas e delgadas, corpo piloso e olhos grandes (REBELO & OLIVEIRA-PEREIRA, 2001; LEMOS et al., 2001). Apresentam como características o vôo saltitante e a manutenção das asas eretas, mesmo em repouso, diferentemente de outros dípteros. Este mosquito também é conhecido por vários nomes populares, variando segundo o país, estado e região: mosquito palha, cangalha, cangalhinha, asa dura, orelha de veado, birigui, arrupiado, péla égua, ligeirinho, murutinga (REBELO & OLIVEIRA-PEREIRA, 2001; LEMOS et al., 2001; ALEXANDER et al., 2002).

No Brasil, as espécies incriminadas como transmissoras da *Leishmania* sp são: *Lutzomia intermedia*, *Lutzomia whitmani*, *Lutzomia pessoai*, *Lutzomia migonei*, *Lutzomia fischeri*, *Lutzomia umbratilis*, *Lutzomia flaviscutellata*, *Lutzomia wellcomei* (LAINSON & SHAW, 1987; DEDET, 1993; LAINSON et al., 1994; LUZ et al., 2000; FERREIRA et al.,

2001; CAMPBELL-LENDRUM et al., 2001; ALEXANDER et al., 2002; RANGEL & LAINSON, 2003; DIAS et al., 2007). Recentemente, novas espécies têm sido incriminadas como vetoras da doença *Lutzomia nunextovari anglesi* (TORRES et al., 1998) *P. davisi* (GIL et al., 2003).

Os vetores da LTA também apresentam uma ampla distribuição geográfica no território brasileiro. Esta distribuição é dependente da topografia (FERREIRA et al., 2001), da vegetação (MAYRINK et al., 1979; ALEXANDER, 1987, 1992, 2002; DAVIES et al., 1997; KAWA & SABROZA, 2002; CAMARGO-NEVES et al., 2002), e das condições de temperatura e umidade do ar (KARL et al., 1996; LIMA, 2000; FRANKE et al., 2002; CAMARGO-NEVES et al., 2002, CASTRO et al., 2005).

TOLEZANO et al. (2001) em inquéritos entomológicos realizados no município de Eldorado estado de São Paulo, mostrou que a *L. intermedia* (99%) era a principal espécie dos ambientes alterados pelo homem, retratando uma ótima adaptação desta espécie ao novo bioma. Dados semelhantes foram encontrados no município de São Roque (SP) por TANIGUCHI et al. (1991), na região de São João da Boa Vista (SP) por RANGEL & VIDO (1997), no município de Uberlândia (MG) por LEMOS et al. (2001) e no vale do rio Ribeira (PR) por CASTRO et al. (2005).

GOMES et al. (1983) e CAMPBELL-LENDRUM et al. (2001) mostraram que em ambientes que sofrem intensa ação antrópica, a *L. intermedia* assume importância epidemiológica, por assumir condições de população dominante nesse tipo de ambiente, fazendo com que a transmissão da LTA deixe de apresentar caráter selvático e ligação com atividades ocupacionais e passe a apresentar caráter de transmissão peri-domiciliar e domiciliar. A *L. intermedia* é considerada a principal espécie envolvida na transmissão da leishmaniose cutânea (LC) na região Sudeste do Brasil. Apresenta elevada frequência no

ambiente domiciliar demonstrando forte associação com o homem e animais domésticos. (MARCONDES et al., 1997, 1998; RANGEL & LAINSON, 2003; CASTRO et al., 2005).

LEONARDO & REBELO (2004) sugerem que, nas regiões Sul e Nordeste do Brasil, a *L. witmani* (GOMES et al., 1989; TOLEZANO, 1994; MARCONDES et al., 1997; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; SHAW, 1999), juntamente com a *L. intermedia* (MARCONDES et al., 1997, 1998; SHAW, 1999), sejam os principais vetores para *L. (V.) braziliensis*, nas áreas onde a transmissão da LTA é predominantemente peridomiciliar.

TEODORO et al. (1999), em estudo realizado na área urbana da cidade de Maringá, no estado do Paraná, descreve a *L. whitmani* como a principal espécie vetor de LTA, sugerindo que esta espécie apresenta uma melhor adaptação ao novo bioma do que as outras espécies de *Lutzomya*.

MAYRINK et al. (1979) estudando aspectos da LTA no município de Caratinga – MG, observaram que nas áreas endêmicas para LTA as principais espécies capturadas foram a *L. whitmani* (63,7%), *L. migonei* (5,13%) e *L. intermedia* (0,55%).

Os principais vetores conhecidos e responsáveis pela transmissão da espécie da *L. (L.) amazonensis* são o *L. flaviscutellata*, *L. olmeca nociva*, *L. reducta* (YOUNG & ARIAS, 1982; SHAW & LAINSON, 1987), amplamente distribuído na região amazônica, principalmente nos estados do Amazonas e de Rondônia. Essas espécies apresentam características pouco antropofílicas, hábitos noturnos e vôo baixo (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; BRASIL, 2000, 2006).

A *L. fischeri* parece ser uma espécie mais adaptada ao ambiente florestal apresentando dificuldades para vencer as barreiras impostas pela ação antrópica (TOLEZANO et al., 2001). No entanto, alguns autores têm demonstrado associação desta espécie ao homem em focos da

doença no ambiente domiciliar (MAYRINK et al., 1979; MAYO et al., 1993; GOMES, 1994; FALQUETO, 1995).

O principal vetor responsável pela transmissão da *L. (V.) guyanensis* é a *L. umbratilis*. A transmissão geralmente está associada à penetração dos indivíduos em áreas de florestas virgens, desmatamentos, trabalho e exercícios militares (LAINSON, 1983; BRASIL, 2006).

2.4 – Reservatórios

Os animais silvestres incriminados como reservatórios da leishmaniose são roedores (*Proechimys*, *Oryzomys*, *Akodon*,) (BARBOSA et al., 1970; FORATTINI et al., 1976; LAINSON & SHAW, 1979; LAINSON, 1989), marsupiais (*Didelphis*) (ARAÚJO-FILHO, 1978; LAINSON et al., 1983) e edentados - *Choloepus* (LAINSON et al., 1983) e *Tetradactylus sp* (tamanduá) (LAINSON et al., 1983). Os animais domésticos (eqüinos, suínos e cães) parecem ter um papel relevante como reservatórios da doença nas áreas urbanas e periurbanas, uma vez que já foram encontrados *Leishmania* em lesões de pele destes animais (FALQUETO et al., 1986, 1987; AGUILAR et al., 1989; REITHINGER & DAVIS, 1999; SOSA-ESTANI et al., 2001; RYAN et al., 2003).

A *L. (L.) amazonensis* tem como principal reservatório silvestre o roedor *Proechimys sp.* (rato soiá) (FORATTINI et al., 1960, 1972; LAINSON, 1989) que desenvolve infecção sub-clínica. Os roedores *Oryzomys sp* (FORATTINI et al., 1973; LAINSON & SHAW, 1979), *Neacomys sp* e *Nectomy sp* apresentam importância secundária como reservatórios desse parasito (MARZOCHI, 1992; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; ARIAS et al., 1996; LAINSON, 1997).

Os principais reservatórios comprovados da *L. (V.) guyanensis* são os edentados arbóreos *Choloepus didactylus* (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994) e o *Tetradactyla sp*

(tamanduá) (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). Roedores (LAINSON, 1983) e marsupiais, apesar de serem encontrados menos freqüentemente infectados, são também considerados reservatórios desse parasito (ARIAS et al., 1996; LAINSON; 1997).

Os reservatórios silvestres para a espécie *L. (V.) braziliensis* ainda não estão bem definidos, pois até o momento não se conseguiu identificar definitivamente nenhum animal silvestre como reservatório, apesar do parasito já ter sido isolado de roedores (*Akodon e Proechymys dimidiatus*) no Vale do Rio Doce (DIAS, 1977; MAGALHAES-ROCHA et al., 1987) e em preguiças (*Bradypus variegatus*) em uma área endêmica do estado do Rio de Janeiro (PIRMEZ et al., 1997). Segundo MARZOCHI & MARZOCHI (1994) esses animais sinantrópicos ou o próprio homem seriam os responsáveis pela introdução da *L. (V.) braziliensis* nas áreas extra-amazônicas, em consequência das alterações ambientais antrópicas e pela capacidade adaptativa de alguns flebótomos. Esse parasito é também freqüentemente encontrado em vários animais domésticos, tais como: o cão (FALQUETO et al., 1986; ROSA et al., 1988; FALQUETO et al., 1991; REITHINGER & DAVIS, 1999; CASTRO et al., 2007), eqüinos e mulas (FALQUETO et al., 1987; AGUILAR et al., 1987, 1989; ROSA et al., 1988). Esses autores sugerem que estes animais têm um papel importante na propagação da doença no ambiente peridoméstico.

2.5 – Transmissão

Segundo DESJEUX (1992) sempre existe um nível de disparidade nos registros de número de casos de LTA, mesmo em países onde a doença é considerada de notificação compulsória. Essa disparidade se deve a erros de diagnóstico, dificuldades de acesso ao serviço de assistência, falhas na própria vigilância epidemiológica (apenas detecção passiva) e a casos não diagnosticados. No entanto, nos países onde a notificação da doença é

compulsória, como no Brasil, as taxas de prevalência são mais confiáveis, devido à melhoria no processo de Vigilância Epidemiológica.

Vários estudos têm sido realizados a fim de descrever a ocorrência da LTA, assim como o de conhecer a importância dos fatores ecológicos, ambientais, sócio-econômicos e individuais associados ao processo de transmissão da doença (DESJEUX, 2004).

No Brasil, VALIM (1993) e SILVEIRA (2005) descreveram três padrões de transmissão da LTA:

O primeiro seria a leishmaniose tegumentar puramente silvestre, isto é, uma zoonose primária de mamíferos silvestres. Neste caso o homem adquiriria a infecção ao entrar em contato com a biocenose silvestre onde se mantém o ciclo enzoonótico (LAINSON 1981, 1985; BASANO & CAMARGO, 2004). A doença ocorreria através de surtos epidêmicos associados à derrubada das matas (construção de estradas, instalação de povoados em regiões pioneiras) e exploração desordenada das florestas (extração de madeira, mineração, agricultura), ocorrendo de modo geral na Amazônia (LAINSON 1981, 1985).

O segundo padrão de transmissão, a leishmaniose tegumentar silvestre modificada, vem ocorrendo através de surtos epidêmicos sazonais, em áreas com pequenos focos residuais de mata primária. A infecção ocorre no peridomicílio e na área de mata, onde o homem geralmente desenvolve atividades ligadas à agricultura, como ocorre no Vale do Rio Doce (MAYRINK et al., 1979; HERMETO et al., 1994), Bahia (JONES et al., 1987), Viana-ES (BARROS et al., 1985) e nos municípios de Pedro Toledo e Miracatu-SP (GOMES et al., 1992).

No terceiro padrão a leishmaniose tegumentar ocorre nas áreas periurbana ou urbana, no intra ou peridomicílio, ocorrendo de forma endemo-epidêmica. Nessas áreas há a suspeita de participação de animais domésticos como reservatórios. Destacam-se cidades como Belo

Horizonte (PASSOS et al., 1990, 1993, 2001) e Rio Janeiro (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; KAWA & SABROZA, 2002).

BASAMO & CAMARGO (2004) salientam que o perfil de transmissão periurbano está relacionado com a falta de saneamento básico, a situação econômica precária, a migração da população para as periferias, ao convívio com animais domésticos ermos ou não, mas que servem de reservatórios para o parasito.

Outro padrão típico da doença é a ciclicidade de ocorrência de casos. Apesar do padrão endêmico clássico da doença, vários autores têm observado em várias regiões que os períodos endêmicos ocorrem entre picos epidêmicos cíclicos. MAYRINK et al. (1979) e MACHADO-COELHO et al. (1999) demonstraram na microrregião de Caratinga a ocorrência de alças epidêmicas a intervalos de 6 anos. JONES et al. (1987) observaram também intervalos endêmicos interpícos, no entanto com intervalos de 4 a 5 anos, em área endêmica para LTA. GOMES et al. (1992) observaram surtos epidêmicos com duração trianual a intervalos de 3 anos nos municípios de Miracatu e Pedro Toledo no estado de São Paulo. Da mesma forma, CONVIT (1996) observou na Venezuela que os picos de ocorrência de casos ocorriam de 3 a 4 anos. A diversidade dos achados epidemiológicos confirma a importância de se particularizar o perfil da doença em cada região.

2.6 – Aspectos Clínicos da doença

A LTA pode apresentar-se sob diversas formas clínicas, representando um complexo de doenças (DESJEUX, 2004). A manifestação destas formas clínicas dependerá do grau de patogenicidade e virulência das espécies ou da cepa de *Leishmania* adquirida pelo hospedeiro (GRIMALDI-JUNIOR & TESH, 1993; GREVELINK & LERNER et al., 1996; DAVIES et al., 1997).

Durante o período de incubação, geralmente de 30 a 45 dias, mas que pode variar entre 2 semanas a muitos anos, uma série de eventos celulares pode ocorrer, culminando nas primeiras manifestações cutâneas. Inicialmente surge uma pápula eritematosa ou pequeno nódulo que pode desaparecer ou ulcerar. Este nódulo é formado por um infiltrado de linfócitos e macrófagos contendo *leishmania*. Devido à pressão exercida do infiltrado sobre a epiderme este nódulo pode ulcerar. Geralmente, o processo ulcero-necrótico inicia-se do centro da lesão em direção às periferias ou bordas. Os fatores determinantes da evolução da lesão e da gravidade clínica, ainda não são bem conhecidos. No entanto, sabe-se que estes eventos dependem tanto da resposta do hospedeiro e da predisposição genética quanto da espécie do parasito (WEIGLE & SARAVIA, 1996; DOWLATI, 1996; DAVIES et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2004).

A lesão em sua forma clássica surge como uma pápula eritematosa, bem delimitada, com borda violácea hipertrófica e base granulomatosa. A presença de pus ou crosta amarela é indicativa de infecção bacteriana (WEIGLE & SARAVIA, 1996; DOWLATI, 1996; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Aproximadamente 3,5 a 5% dos casos de leishmaniose cutânea podem ocorrer metástases para as mucosas (CARVALHO et al., 1985; LAGO et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2004; MACHADO-COELHO et al., 2005). Segundo MACHADO-COELHO et al. (2005) o sexo, a idade, o estado nutricional e o tempo de duração da lesão são marcadores clínicos da forma mucosa.

2.6.1 – Formas Clínicas

Baseado na evolução das manifestações clínicas da LTA e do local da picada pelo vetor infectado, MARZOCHI & MARZOCHI (1994) classificaram a doença em 5 grupos: 1)

Grupo sub-clínico, 2) Grupo Cutâneo, 3) Grupo mucocutâneo, 4) Grupo mucoso e 5) Grupo linfático-ganglionar.

1) Grupo Sub-clínico: indivíduos expostos à picada do vetor infectado, mas que não desenvolvem a doença. Este grupo pode ser caracterizado através da intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva, ocasionalmente através da sorologia positiva e ausência de lesões cutâneas ou cicatrizes.

2) Grupo cutâneo: baseado na apresentação clínica da úlcera, sub-divide-se em 3 grupos:

2.1) Forma cutânea localizada – caracterizada por apresentar lesões cutâneas simples ou múltiplas, freqüentemente ulceradas, nas proximidades do provável local de inoculação do parasito. Freqüentemente a IDRM e, ocasionalmente, a sorologia são positivas. O tratamento geralmente é eficaz e a cura espontânea pode ocorrer.

2.2) Forma cutânea disseminada – caracterizada por apresentar numerosas lesões cutâneas pequenas e ulceradas distribuídas pelo corpo, não apresentando relação com o local de inoculação do parasito. Geralmente apresentam a IDRM e a sorologia positiva e uma excelente resposta ao tratamento.

2.3) Forma cutânea difusa – apresentam numerosos nódulos ou pápulas múltiplas não ulceradas por todo o corpo e sem correlação com o provável local de inoculação do parasito. A IDRM é negativa, porém a sorologia positiva. A doença ocorre por uma deficiência ou anergia de resposta imune mediada por células (DESJEUX, 1996). A cura espontânea é praticamente inexistente e mesmo os indivíduos tratados tendem a recidiva da doença (DESJEUX, 2004).

3) Grupo mucocutâneo ou associado: Essa forma produz lesões destrutivas e desfigurantes nas mucosas orofaríngeas, geralmente, associadas às espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. Segundo GRAMICCIA & GRADONI (2005) 30 a 80% dos pacientes com lesão cutânea provocada pela *L. (V.) braziliensis* podem evoluir para lesão cutânea mucosa.

3.1) Formas mucocutânea concorrente – com lesões cutâneas e mucosas ativas, ambas simultâneas e distantes. Apresentam IDRMs e sorologia fortemente positiva e apesar do tratamento ser efetivo, este deve ser prolongado.

3.2) Forma mucocutânea contígua – onde as lesões mucosas ocorrem em continuidade com as lesões cutâneas, a resposta imune é preservada e o tratamento prolongado, mas eficaz.

4) Grupo mucoso.

4.1) Forma mucosa tardia – lesões mucosas intensas associadas a cicatrizes de lesões cutâneas, curadas por tratamento ou de cura espontânea. Apresenta a IDRMs fortemente positiva e o tratamento é sempre prolongado, mas geralmente eficaz.

4.2) Forma mucosa isolada de origem indeterminada – apresenta envolvimento das mucosas na ausência de cicatriz ou sinal de lesão cutânea ativa. A IDRMs e a sorologia são positivas e o tratamento é eficaz, mas prolongado.

4.3) Forma mucosa primária – relacionada diretamente com a ausência de cicatriz ou lesão cutânea ativa e com a picada do vetor infectado na mucosa, onde provoca lesões extensas. Tanto a sorologia quanto a IDRMs mostram-se positivas.

- 5) Grupo linfático-ganglionar – ocorrência de linfagite e/ou linfadenopatia com ou sem a presença de lesões cutâneas. A IDRM apresenta-se geralmente negativa e a sorologia positiva.

Um outro grupo clínico de leishmaniose não citado na classificação de MARZOCHI & MARZOCHI (1994) seria a leishmaniose recorrente ou recidivante. Refere-se ao desenvolvimento de novas lesões no centro ou na periferia de cicatrizes ou de lesões agudas de leishmanioses, podendo manifestar tanto na forma cutânea quanto na mucosa. Segundo PASSOS et al. (2001) os pacientes tratados de leishmaniose que não convertem a IDRM apresentam 3 vezes mais chances de recorrência ou recidiva da doença. Acredita-se que o mecanismo recidivante seja devido à reativação dos parasitos latentes que geralmente ocorre num período de cinco anos após o desaparecimento da lesão, quando o tratamento foi ineficaz (LLANOS-CUENTAS et al., 1984; SARAVIA, 1990; WEIGLE & SARAVIA, 1996).

Um grupo clínico preocupante são os formados pelos indivíduos imunossuprimidos (HIV/AIDS, terapia imunossupressora) que apresentam ou que já apresentaram LTA, pois nestes pacientes o quadro da leishmaniose tem aumentado a gravidade devido ao surgimento de infecções concomitantes, além de pacientes assintomáticos e curados converterem a sintomáticos (COURA et al., 1987; WHO, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

2.7 – Resposta Imunológica

Após a picada pelo vetor infectado e inoculação da *Leishmania* a relação parasito/hospedeiro pode ser direcionada rumo à cura com possível destruição do parasito, portanto sem desenvolvimento de sinais e sintomas clínicos ou rumo à doença, com produção de lesões cutâneas e/ou mucosas, isto dependerá da alta ou baixa capacidade da resposta

imune mediada por células “Th1” em destruir o parasito e controlar a infecção (COUTINHO et al., 1996; ROGERS et al., 2002).

Estudos em camundongos têm mostrado que a resposta imune mediada por células T tem função central na ativação ou não dos macrófagos responsáveis pela resposta do hospedeiro ao parasito.

A resistência às leishmanias é dependente de célula CD4+ do tipo Th1, que estimulam a resposta imune celular efetiva associada à secreção de algumas citocinas (INF-gama, TNF, IL-12, IL-2). A IL-12 produzida pelos macrófagos e células dendríticas estimulam a proliferação e diferenciação das células T imaturas em células do tipo Th1 e induzem a produção de INF-gama pelas células T e Natural Killer (NK) (HAMERMAN et al., 2005). O INF-gama associado ao TNF-alfa produzido pelos macrófagos infectados ativam o gene da óxido nítrico redutase (iNOS), resultando na produção do óxido nítrico (NO), substância tóxica ao parasito e responsável pela morte da Leishmania (AFONSO et al., 1994; SCHARTON-KESTER, 1995; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; KANE & MOSSER, 2000; ROGERS et al., 2002), desta forma o sistema imune do indivíduo consegue controlar a infecção (ROGERS et al., 2002; AWASTHI et al., 2004; HAMERMAM et al., 2005).

A susceptibilidade ao parasito ou progressão da doença é caracterizada pela ativação de células do tipo Th2, envolvida na indução da resposta humoral e nos fenômenos de eosinofilia, e associado à secreção de citocinas do tipo IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 e principalmente IL-4 (COFFMAN & CARTY, 1986; LOHOFF, 1998). Estas citocinas são tidas como depressoras da resposta imune, pois inibem a ativação dos macrófagos favorecendo a multiplicação do parasito dentro dos vacúolos parasitóforos e resultando num agravamento da doença (AFONSO & SCOTT, 1993; COUTINHO et al., 1996; ETGES & MULLER, 1998).

2.8 – Diagnóstico

O diagnóstico de LTA abrange aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais (GONTIJO & CARVALHO, 2003) e reposta ao tratamento (OLIVEIRA-NETO, 1988).

2.8.1 – Diagnóstico Clínico-Epidemiológico

É realizado a partir das características da lesão associada à história progressa e procedência do paciente. As formas tegumentares do Novo Mundo compreendem uma síndrome cujas manifestações clínicas dependem de alguns fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasito com seu hospedeiro. Assim, ela produz um amplo espectro de lesões o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

2.8.2 – Diagnóstico Laboratorial

Os exames laboratoriais são constituídos por técnicas de detecção do parasito, portanto de confirmação etiológica (pesquisa direta, histopatologia, cultura, inoculação em animais e reação em cadeia da polimerase) e técnicas imunológicas (detecção da resposta imune celular, detecção de anticorpos, detecção de imunocomplexos circulantes) (KAR, 1995). Frequentemente a associação de alguns destes elementos é necessário para a definição do diagnóstico.

2.8.2.1 – Exame parasitológico direto

O exame parasitológico direto é o procedimento de primeira escolha, por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. O material é obtido por escarificação, biópsia, punção aspirativa ou impressão por aposição das bordas da lesão ulcerada. A coloração

utilizada é o Giensa (10%) e a observação das formas amastigotas realizadas através da microscopia óptica (BRASIL, 2000).

A positividade deste exame é inversamente proporcional ao tempo de lesão (FURTADO, 1980). FABER et al. (2003) em trabalho realizado para avaliação de técnicas de diagnóstico para leishmaniose cutânea encontrou uma sensibilidade de 54% para o exame parasitológico direto, resultado semelhante ao descrito por ANDRESEN et al. (1996), que observou positividade de 48%, RODRIGUES et al. (1994), com positividade de 64% e ÁVILES et al. (1999) que encontrou 42%. Porém, MARQUES et al. (2006) demonstraram que isoladamente o exame direto apresentou sensibilidade de 62,8% e, que, quando usado em associação com a IDRM a sensibilidade de diagnóstico eleva-se para 81,1%.

2.8.2.2 – Cultura

A cultura é um método indireto da pesquisa da forma promastigota do parasito. É realizada através da disposição de fragmentos biopsiados ou raspados da lesão em meio de cultura NNN e/ou LIT entre 24-26°C. A sensibilidade deste método é de aproximadamente 60% e 30% para as lesões agudas e crônicas, respectivamente (WEIGLE et al., 1987). A dificuldade operacional torna este procedimento inadequado para inquérito epidemiológico.

2.8.2.3 – Inoculação em animais

O hamster (*Mesocricetus auratus*) é o animal comumente utilizado para isolamento da *Leishmania* sp. O inóculo obtido de fragmentos triturado da lesão é aplicado no focinho ou patas traseiras do animal. O grande inconveniente desta metodologia é o tempo excessivo para conclusão dos resultados, geralmente de 2 a 9 meses, dependendo da cepa de *Leishmania*

inoculada. Portanto, é utilizado apenas em pesquisas científicas para isolamento e posterior caracterização da espécie (BRASIL, 2000).

2.8.2.4 – Histopatologia

A histopatologia é realizada com fragmentos de tecido, desidratado, embebido em bloco de parafina, cortado em pequenos fragmentos de 4-5 micrometros e corados com eosina-hematoxilina (TAFURI et al., 2001). As manifestações histológicas dependem: da cepa inoculada, da carga do inócuo e do estado imunológico do indivíduo de área endêmica ou não endêmica. O infiltrado caracteriza-se por hiperplasia pseudo-epiteliomatosa, formações granulosas, presença de células epitelióides, linfócitos, plasmócitos, células gigantes e histiócitos. A confirmação de positividade só é feita quando a forma amastigota do parasito é visualizada no tecido (MEHREGAN et al., 1999).

Segundo WEIGLE et al. (1987) não é um método de alta sensibilidade, variando de 14 a 18%. Entretanto, FABER et al. (2003) avaliando a técnica em amostras de 46 pacientes com suspeita de LTA, demonstrou uma elevada sensibilidade (69%) para o método. No entanto, os autores relacionaram a alta positividade à extensa experiência em exames histopatológicos do patologista.

2.8.2.5 – Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Reproduz *in vitro* o fenômeno da duplicação *in vivo* da molécula de DNA. Permite a rápida detecção do parasito e sua específica identificação, sem isolamento em cultura. Entretanto, as exigências técnicas e o custo relativamente elevado ainda limitam seu emprego rotineiro (BRUJIN & BARKEN, 1992; GONTIJO, 1997).

WEIGLE et al. (2002) utilizando a PCR como método de diagnóstico de lesões crônicas em comparação aos métodos convencionais encontrou uma sensibilidade duas vezes maior aos métodos convencionais associados ou isolados. MÁRQUES et al. (2002) avaliando 164 casos suspeitos de LTA através do método de PCR, encontraram uma positividade de 76,8% para os casos suspeitos e considerando os casos de LTA confirmados a sensibilidade do método elevou-se para 90,2%. FABER et al. (2003) demonstraram em trabalho realizado em pacientes com LC uma alta especificidade (100%) e sensibilidade (96%) para o resultado da PCR, seguida pelo IDRM e cultura do parasito, 89% e 70% de sensibilidade, respectivamente. MÁRQUES et al. (2006) desmontaram que o exame de PCR foi o método mais sensível, capaz de diagnosticar 126 (76,8%) dos 164 casos considerados suspeitos, seguido pelo exame parasitológico (62,8%) e IDRM (61,0%).

2.8.3. – Diagnóstico Imunológico

Dentre os métodos imunológicos destacam-se os métodos de reação de hipersensibilidade retardada (IDRM) e sorologia.

2.8.3.1 – Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

Este teste é baseado na reação de hipersensibilidade tardia; foi desenvolvido por MONTENEGRO em 1926 e modificado por GOMES (1939), sendo usado tanto como método diagnóstico individual, devido sua alta sensibilidade, como para inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas (SILVEIRA et al., 1996; ANDRADE et al., 2005).

MELLO et al. (1977) e DA COSTA et al. (1996) realizaram em área endêmica para LTA, Vale do Rio Doce-MG, um estudo para padronização do teste em função do conteúdo protéico através de dosagem do nitrogênio. Esses autores concluíram que tanto para inquérito

epidemiológico quanto para o diagnóstico da leishmaniose, o uso do antígeno na concentração de 40 µg/mL permitiria detectar reações específicas mais fracas e sem perda de especificidade. A sensibilidade da reação depende do antígeno empregado no teste. ROMERO et al. (2004) encontraram discordância em 22% das reações. ABRAMSON et al. (1995) também observaram uma variação da sensibilidade de 19% a 100% em 27 pacientes com LTA e 29 pacientes com LV, ao utilizarem antígenos preparados de *L. major* ou antígenos preparados a partir de uma mistura de promastigotas de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*.

Reações cruzadas são observadas principalmente em indivíduos com doença de Chagas e indivíduos curados de leishmaniose visceral (VEXENAT et al., 1996).

Verifica-se uma positividade de 20 a 30% da reação em indivíduos vivendo em áreas endêmicas, sem história de LTA progressiva e na ausência de cicatriz ou lesão ativa, apontando para a possibilidade de formas abortivas ou infecções subclínicas (BRASIL, 1998).

Alguns autores (NASCIMENTO et al., 1993; CASTES et al., 1994; DE LUCA et al., 2001, 2003; BORGES et al., 2002) sugeriram que a própria realização do 1º teste de Montenegro poderia induzir a uma conversão. DE LUCA et al. (2003), em estudo avaliando o potencial imunogênico da IDRM, e JOSE et al. (2001), avaliando o poder sensibilizante da IDRM, observaram que a aplicação de uma única dose do teste de Montenegro induziu uma resposta imune mediada por células significativamente maior do que a observada no grupo placebo. Os autores não recomendam o uso da IDRM como critério de seleção em triagem clínica visando avaliar imunogenicidade e/ou eficácia de vacinas anti-LTA. No entanto, JOSE et al. (2001) observaram que após um ano todos os indivíduos apresentaram-se negativos novamente.

Resultados falso negativo também têm sido descritos em pacientes imunossuprimidos, na LC difusa e disseminada (MARZOCHI et al., 1980), em infecções precoces (CUBA-CUBA et al., 1985, JOSE et al., 2001) e em infecções provocadas pela *L. amazonensis* (SILVEIRA et al., 1991).

Entretanto, apesar dessas falhas, frente à alta especificidade e sensibilidade da IDRM (FURTADO, 1980; GUERRA et al., 1985; OLIVEIRA-NETO, 1988), associado a sua praticidade e facilidade de execução, fazem com que esse teste continue sendo o exame mais utilizado no diagnóstico da LTA e em inquéritos epidemiológicos. Além disso, é o método de escolha para definição do diagnóstico de lesões cutâneo-mucosa antigas, onde o número de parasitas é pequeno, portanto, difíceis de serem detectados pelos métodos parasitológicos (DA COSTA et al., 1996).

A negatividade desta reação em indivíduos que vivem em áreas endêmicas tem sido utilizada com regularidade como critério de seleção para a inclusão destes indivíduos em estudos de caracterização de resposta imune e eficácia da imunização após a administração de vacina anti-LTA (MAYRINK et al., 1979, 1978, 1985; SHARIFI et al., 1998; KHALIL et al., 2000; ARMIJOS et al., 2004; VÉLEZ et al., 2005). Teoricamente em indivíduos vivendo em áreas não endêmicas, a resposta positiva ou conversão do teste após a aplicação da vacina anti-LTA seria atribuído à imunidade induzida pela própria vacina.

2.8.3.2 – Sorologia

A sorologia expressa os níveis de anticorpos circulantes e está associado ao tempo de evolução da doença, sendo mais freqüente em presença de comprometimento de mucosas.

A Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o método sorológico mais utilizado. Apresenta resultados variáveis para a LTA devido à reduzida antigenicidade do parasito e/ou devido aos

baixos níveis de anticorpos circulantes (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Sua sensibilidade varia entre 67 a 76% e apresenta baixa especificidade (CHIARI et al.; 1973; GARCIA-MISS et al., 1990; SANCHEZ et al., 1992).

Os níveis de anticorpos tendem a baixar com a cura clínica, constituindo, assim, um método auxiliar na avaliação da eficácia terapêutica para LTA (BITTENCOURT et al., 1989).

Este método não deve ser utilizado em inquéritos epidemiológicos de LTA (CONVIT et al., 1969; KAR, 1995) devido à variabilidade da sensibilidade e a possibilidade de reação cruzada com a doença de Chagas e tuberculose pulmonar (CHILLER et al., 1990; GARCIA-MISS et al., 1990; KAR, 1995).

2.9 – Tratamento

O tratamento da LTA constitui um desafio constante em razão da falta de um medicamento totalmente eficaz, de uso oral, dose única diária, de baixo custo e de efeitos colaterais inexpressivos (DESJEUX, 2004).

Os compostos pentavalentes tais como o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) ainda são as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses (BRASIL, 2000, 2006). A eficácia destes compostos é atribuída à capacidade de inibir a síntese de adenosina e guanosina trifosfato, através da inibição da glicólise e do ciclo do ácido cítrico (KOFF & ROSEN, 1994). A OMS (1990) recomenda de 10 a 20 mg de Sb/ Kg de peso corporal/dia, ministrado via intramuscular ou venosa. Para a forma cutânea, preconiza-se o tratamento por 20 dias consecutivos, e para a forma mucosa, por 30 dias ou até a cura clínica da doença. O difícil manuseio, a longa duração do tratamento, a alta toxicidade e os vários efeitos colaterais prejudicam o processo de adesão ao tratamento. Os efeitos colaterais mais comuns dos antimoniais são mialgias,

artralgias, vômitos, anorexia e náuseas (SALDANHA et al., 1999; RATH et al., 2003). São também descritas alterações eletrocardiográficas, agranulocitose, pancreatite aguda e arritmias fatais durante o tratamento (MARSDEN, 1985; KOFF & ROSEN, 1994; SALDANHA et al., 1999; RATH et al., 2003).

Além dos efeitos colaterais, outras desvantagens da quimioterapia são o alto custo e a longa duração do tratamento, assim como as contra indicações para os indivíduos portadores de doenças cardíacas, renais e hepáticas, além de idosos e gestantes (SALDANHA et al., 1999; BRASIL, 2000, 2006; GONTIJO & CARVALHO, 2003; DESJEUX, 2004).

Outro fator de grande preocupação é a resistência que o parasito vem apresentando frente ao tratamento com os antimoniais pentavalentes (DESJEUX, 2004). GROGL et al. (1992) observaram resistência do parasito em 11% dos casos estudados. BERMAN (1997) observou recidivas em 10% dos casos da forma cutânea e de 3% nos que apresentam a forma mucosa. SUNDAR (2001) e DESJEUX (2004) relataram que em distritos hiperendêmicos, ao norte do estado de Bihar, 50 a 60% dos pacientes não respondiam ao tratamento com os antimoniais pentavalentes.

MAYRINK et al. (2006) avaliando a eficácia da imunoterapia nos casos em que a quimioterapia é contra indicada ou refratária, observaram uma taxa de cura de 98,1%, apesar do maior tempo de tratamento, de aproximadamente 95 dias para 173 dias, quando comparado ao tempo de cura do tratamento padrão (antimônio). CONVIT et al. (1989) associando a imunoterapia ao bacilo Calmette Guérin (BGC) observaram uma taxa de cura de 90% em um tempo médio de cura de 16 a 18 semanas, resultados semelhantes ao da quimioterapia realizada com antimoniato de N-metil-D-Glucamina.

A imunoquimioterapia, associação entre quimioterapia e imunoterapia, tem diminuído o tempo e o volume de antimônio necessário para obtenção do processo de cura (GENARO et

al., 1996, 2000). A partir desses resultados a ANVISA (Diário Oficial da União em 31/12/2001) renovou o registro de medicamento similar Leishvacin® (Produto comercial 0,34 mg/mL para uso pela via subcutânea injetável comercializado em caixas com 4 frascos de vidro incolor de 5 mL) produzido pela BIOBRAS S/A (registro 1.00574-2) como vacina terapêutica contra leishmaniose (registro: 25000.045522/99-10 1.0574.0047.001-1). MACHADO-PINTO et al. (2002) avaliando 47 pacientes com LTA observaram que a associação do sal de antimônio com a vacina (imunoquimioterapia) resultou em 100% de cura e ainda reduziu em 50% o volume final de antimônio usado no tratamento. Da mesma forma, MAYRINK et al. (2006) demonstraram que a imunoquimioterapia apresentou o mesmo índice de cura em relação ao tratamento padrão, e ainda reduziu o volume do sal de antimônio em 17,9% e o tempo de cura significativamente de 87 para 62 dias, conseqüentemente, reduzindo os efeitos colaterais.

Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL, 2006), o critério de cura é clínico e recomenda-se que seja feito o acompanhamento mensal do paciente por 3 meses consecutivos, e após a cura clínica, acompanhar o paciente até completar 12 meses após o término do tratamento.

2.10 – Estratégias de controle

As estratégias de controle dependerão do tipo de transmissão observado e das características epidemiológicas de cada região em particular (DESJEUX, 1996; SANTOS et al., 2000; BASAMO & CAMARGO, 2004). Estas medidas têm sido abordadas sob 5 aspectos: vigilância epidemiológica, medidas de atuação na cadeia de transmissão, medidas educativas e vacina (BRASIL, 2000, 2006).

A vigilância epidemiológica abrange desde a detecção do caso até o envio dos dados, visualização, caracterização da distribuição da doença e do seu perfil clínico-epidemiológico (BRASIL, 2006).

As medidas de atuação, em virtude das características epidemiológicas peculiares, devem ser flexíveis, distintas e aliadas a um sistema de saúde básico capacitado para o diagnóstico precoce e tratamento adequado da doença (DESJEUX, 1996). As medidas educativas devem estar inseridas em todos os serviços que desenvolvem as ações de controle da LTA, sendo que as equipes do Programa de Saúde da Família podem ter importante papel na busca ativa e na adoção de algumas atividades educativas junto à comunidade (BRASIL, 2000; BASANO & CAMARGO, 2004). Em áreas que apresentam o perfil periurbano de transmissão, deve-se tentar a redução do contato vetorial através da aplicação de inseticidas de uso residual, usar mosquiteiros, instalar tela fina nas janelas e portas, usar repelentes e manter uma distância mínima de 300 metros das moradias em relação à mata (DESJEUX, 1996; SANTOS et al., 2000; BASANO & CAMARGO, 2004; BRASIL, 2006). Aliadas a todas estas medidas devem ser valorizadas as atividades de capacitação continuada dos profissionais de saúde em todos os seus níveis.

Todas estas medidas apresentam um elevado custo e são de difícil aplicabilidade, além de não poderem ser aplicadas ao padrão de transmissão selvático ou peridomiciliar. Portanto, a vacina seria a única medida eficaz para o controle da doença em grandes populações.

2.11 - Vacina Anti-LTA

Diante das dificuldades impostas pelo tratamento e das dificuldades de controle da doença, propiciadas pelo seu caráter enzoonótico, a pesquisa por uma vacina segura, efetiva e barata seria a medida mais adequada para a prevenção da leishmaniose humana (DESJEUX,

2004), já que indivíduos que se recuperaram da doença permanecem refratários a re-infecções (ALEXANDER, 1989; LIEW, 1989; GENARO et al., 1996).

2.11.1) Resposta imune após vacinação

As primeiras hipóteses para o desenvolvimento de uma possível vacina para a leishmaniose iniciaram-se baseado numa prática bastante antiga, a leishmanização, realizada nos países do Oriente Médio e Asiáticos onde a leishmaniose cutânea é considerada uma doença hiper-endêmica. Esta prática iniciou após observações de que, pessoas curadas desta doença geralmente permaneciam protegidas a exposições posteriores, desta forma, as mães de crianças do sexo feminino, pensando em proteger o rosto, uma das únicas partes expostas do corpo, devido ao uso do turbante, aplicavam o exsudato de lesão ativa nas partes posteriores do corpo para provocar lesões, geralmente auto-curáveis, porém, suficiente para dar-lhes proteção a futuras exposições (NADIM et al., 1983; KHAMESIPOUR et al., 2005).

Segundo MENDONÇA et al. (1995) a proteção conferida pela vacina anti-LTA está associada ao desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células, tipo Th1, com aumento de INF- γ e diminuição de IL-4, sendo esta resposta denominada protetora.

NASCIMENTO et al. (1990) demonstraram que a proteção vacinal pode ser associada à conversão da IDRM, com uma correlação de 90% entre a IDRM positiva, a resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico e uma produção aumentada de INF- γ ; esses autores também demonstraram que a vacina conferia uma proteção de 70% aos indivíduos e que após vacinação convertiam a IDRM de negativa para positiva. Baseados na correlação encontrada por ANDRADE et al. (1984); MAYRINK et al. (2002) e NASCIMENTO et al. (1990) entre IDRM e resposta imune, vários autores tem adotado a IDRM negativa como critério de inclusão de indivíduos e a IDRM positiva como critério

avaliador de imogenicidade vacinal (ARMIJOS et al., 1998; VÉLEZ et al., 2000; MAYRINK et al., 2002).

DE LUCA et al. (1999) demonstraram que indivíduos vacinados induziam uma resposta imune mediada por células T, com predomínio do fenótipo T CD8⁺. Nestes mesmos indivíduos vacinados foi observado um aumento da produção de INF-gama após vacinação, indício de que a resposta induzida pela vacina é potencialmente benéfica. As células TCD8⁺ são importantes fontes para produção de INF-gama e pobres produtoras de IL-12 sendo consideradas células T de memória. A predominância deste fenótipo entre as células respondedoras ao antígeno de *leishmania* pode ser explicada pelos baixos níveis de IL-12 detectados em sobrenadante de cultura de células polimorfonucleares (PBMC) de indivíduos vacinados como observados por estes autores.

DA-CRUZ et al. (1994) observaram que pacientes curados da LTA tem revelado um aumento na proporção de células TCD8⁺ em comparação com os níveis observados antes da terapia, durante a doença ativa, sugerindo assim, que estas células podem ter uma função importante na proteção contra LTA.

Em contrapartida, KAR et al. (2005) em trabalho realizado em camundongos BALB/C e com a vacina de antígeno de promastigota P-4 atribuiu a resposta imune protetora fundamentalmente as células TCD4⁺ independentemente das células TCD8⁺. A proteção proporcionada pela vacinação envolveria células TCD4⁺ e produção de citocinas MIF, TNF/LT e INF-gama.

Apesar de já estar bem estabelecido, que a resposta imune mediada por células (Th1) é a responsável pela proteção contra a *Leishmania*, ainda não se estabeleceu um conhecimento definitivo sobre as características da resposta imune protetora mediada por células induzidas pelas vacinas anti-LTA (MENDONÇA et al., 1995).

2.11.2 - Ensaio vacinais

No Brasil, as primeiras tentativas para obtenção de uma vacina anti-LTA foram realizadas por SALLES-GOMES (1939) a partir de extrato de promastigotas mortas.

Um ano depois, PESSOA & PESTANA (1940) realizaram o primeiro teste feito em humanos com “pool” de formas promastigotas de *Leishmania* sp preparadas em solução salina-fenol. A vacina foi administrada em 3 doses em intervalos de 21 dias aos voluntários cujo IDRМ foi considerada negativo. Houve um registro de 18% de doentes no grupo controle e de apenas 3,2% no grupo vacinado. Desta forma, a vacina proporcionou uma redução de 80% na incidência da doença, não tendo sido reportado nenhum efeito colateral no grupo vacinado (PESSOA & PESTANA, 1940; PESSOA, 1941).

Trinta anos após, esses estudos foram retomados por Mayrink e colaboradores que aperfeiçoaram e padronizaram o preparo da vacina polivalente, composta de 5 cepas dermatotrópicas oriundas de diferentes regiões do Brasil (MAYRINK et al., 1979).

O primeiro ensaio clínico foi realizado em Caratinga, Minas Gerais, objetivando avaliar a capacidade da vacina em induzir a proteção (MAYRINK et al., 1978, 1979). Foram selecionados 1.588 voluntários com IDRМ negativas, sendo que 614 constituíram o grupo vacinado e 974 o grupo não vacinado. Observaram uma conversão de 78,4% da IDRМ após três meses, de 73,2% após um ano e de 54,1% após dois anos. Durante 20 anos, 18 casos de LTA ocorreram na área, sendo que destes 16 não tinham tomado a vacina e dois a receberam, mas não haviam convertido a IDRМ para positivo (MAYRINK, comunicação pessoal).

O segundo ensaio clínico de vacinação ocorreu em Viana, Espírito Santo, onde 483 voluntários com IDRМ negativas foram divididos em dois grupos, um de 216 vacinados e

outro de 267 voluntários como controle ou placebo. Observaram uma taxa de conversão de 80% no grupo vacinado. Três anos após, 18 pessoas contraíram a doença na área vacinada, sendo que apenas três (1,7%) pertenciam ao grupo vacinado (MAYRINK et al., 1985).

ANTUNES et al. (1986) conduziram na região de Manaus dois ensaios controlado, duplo cego e realizado em militares. Em 1981 foram vacinados 1.311 soldados e no ano de 1983 foram vacinados 1.274. Observaram uma conversão da IDRМ de 33% em 1981 e de 70% em 1983, resultando numa proteção de 23% e 60% para cada ensaio. A baixa proteção encontrada no primeiro ensaio foi atribuída à imunossupressão provocada pela administração concomitante de outras vacinas (tifo, febre amarela e tétano).

Um sexto ensaio foi realizado por NASCIMENTO et al. (1990) para avaliação da imunidade celular e humoral. Demonstraram que a vacinação aumenta a resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico quando comparados a resposta obtida dos indivíduos constituintes do grupo controle. Encontraram uma correlação de 90% entre a IDRМ positiva e a resposta linfoproliferativa. Observaram também que a produção de INF-gama pelos indivíduos vacinados e estimulados com antígeno de *Leishmania* era superior aos dos indivíduos controle (não vacinados).

Em fevereiro e setembro de 1991 a Organização Mundial de Saúde (OMS) patrocinou reuniões em Washington (Estados Unidos) e em Belo Horizonte (Brasil), para sugerir a modificação da vacina polivalente para monovalente (monocepa) e a realização de testes para comprovação de sua eficácia (WHO,1990). Foi definido que a nova vacina seria composta pela cepa de *Leishmania amazonensis* (pH=8). A opção por esta cepa baseou-se em estudos sobre a antigenicidade das cepas constituintes da vacina, verificando uma melhor resposta estimulativa pela cepa *L. amazonensis*, e na velocidade e facilidade de crescimento em meio de cultura (GENARO et al., 1996, MAYRINK et al., 2002).

MENDONÇA et al. (1995) demonstraram que essa nova formulação vacinal apresentou uma imunogenicidade de 85% e GUIMARÃES et al. (1996), em estudos realizados em camundongos, demonstraram níveis de proteção idênticos aos obtidos pela vacina polivalente.

Um estudo de fase I, duplo-cego, realizado por MARZOCHI et al. (1998), com o objetivo de avaliar a presença de efeitos colaterais desta vacina anti-LTA monocepa aplicada em voluntários normais, num esquema de duas doses intramuscular (IM) de 1,5 mL desta vacina, identificaram a ocorrência de apenas dor leve no local da aplicação, que não se estendeu por mais de 24 horas. Os autores concluíram que a vacina apresenta segurança para ser utilizada em populações humanas, aplicadas num esquema de duas doses IM de vacina não autoclavada na concentração de 1440 mg de nitrogênio por dose.

MAYRINK et al. (1999) avaliaram diferentes preparações da vacina monocepa anti-LTA, autoclavada, não autoclavada, liofilizada, autoclavada estocada por 12 meses, não autoclavada estocada por 12 meses e liofilizada estocada por 12 meses, estas apresentaram taxas de conversão da IDRM de 89,3%, 89,3%, 92,0%, 26,7%, 93,3% e 80,0%, respectivamente. Apenas o grupo que recebeu a vacina autoclavada estocada por 12 meses apresentou menores taxas de conversão da IDRM e menor produção de INF- γ .

ARMIJOS et al. (1998) realizaram no Equador um ensaio controlado-duplo cego e randomizado onde observaram uma conversão da IDRM de 85,1% no grupo vacinado versus 20,1% no grupo placebo ($p < 0,001$). Observaram também uma redução na taxa de incidência da leishmaniose no grupo vacinado (2,1%) comparado ao grupo controle (7,6%) ($p < 0,003$).

VÉLEZ et al. (2000), na Colômbia, em um ensaio clínico avaliando a imunogenicidade da vacina monocepa anti-LTA associada ao adjuvante BCG utilizaram a conversão da IDRM 60 dias após o término da vacinação como critério imunogênico.

Observaram após a vacinação uma taxa de 86,4% de conversão da IDRM no grupo que recebeu apenas a vacina, de 67,9 % no grupo que recebeu a associação de vacina com BCG, de 25,0 % no grupo placebo e de 81,3 % no grupo placebo associado ao BCG. Um ano após a vacinação os grupos que receberam apenas vacina e placebo foram reavaliados e verificaram uma taxa de conversão da IDRM de 90% e 5%, respectivamente. Observaram também um índice de linfoproliferação maior no grupo vacinado em relação ao placebo. A vacina apresentou-se segura, pois não foram observados efeitos colaterais graves relacionados à sua administração. Desta forma, a vacina passou a ser sugerida para estudo de fase III com avaliação da sua eficácia.

DE LUCA et al. (2001) em um ensaio mascarado controlado por placebo e randomizado avaliando diferentes protocolos de vacinação (180, 360 e 540 µg N por dose) aplicados em uma e duas doses observaram que o esquema vacinal mais eficiente foi a aplicação em duas doses de 360µg N/dose. Este esquema foi capaz de induzir 100% de conversão da IDRM e apresentou os maiores níveis de produção de INF- γ .

MAYRINK et al. (2002) com o objetivo de avaliar qual a melhor cepa constituinte da antiga vacina pentavalente anti-LTA era capaz de estimular um melhor padrão de resposta imune vacinal testaram em camundongos C57BL/10 a resposta imunológica induzida por cada uma destas cinco cepas. Seis meses após a vacinação dos camundongos foi realizado um desafio com *L. (L.) amazonensis* para testar a resposta induzida por cada uma das cepas. Observou-se que a vacina monovalente produzida com cepa pH8 *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/pH8), induzia melhores níveis de INF- γ detectados no sobrenadante de células esplênicas dos animais vacinados. Apesar da *L. (V.) braziliensis* induzir a melhor resposta estimulativa, esta não foi preterida devido a suspeita de que lesões mucocutâneas poderiam ser causadas por estímulos de auto-agressão por antígenos desta espécie.

ARMIJOS et al. (2004) em estudo de fase III realizado no Equador encontraram uma conversão para a IDRM de 74,4% no grupo vacinados e de 14,7% no grupo placebo ($p=0,000001$), demonstrando apresentar uma boa imunogenicidade medida pela conversão da IDRM. Entretanto, durante os 26 meses de seguimento os autores não observaram diferença significativa na incidência da LTA entre os grupos vacinados (2,0%) e placebo (1,3%), apesar de se ter observado uma redução na incidência da LTA comparado aos anos anteriores.

VÉLEZ et al. (2005) também em estudo de fase III realizado na Colômbia, observaram uma taxa de conversão da IDRM um ano após a vacinação de 84,3% no grupo vacinados versus 16,8% no grupo placebo, indicando importante imunogenicidade vacinal. A incidência de LTA observada durante um ano de seguimento do estudo no grupo vacinado foi de 7,7% e no grupo placebo que foi de 6,8%. Tanto ARMIJOS et al. (2004) quanto VÉLEZ et al. (2005) demonstraram que a vacina é segura e imunogênica. Entretanto, estes mesmos autores relataram não terem encontrado eficácia no processo vacinal.

Desta forma, apesar dessas discordâncias de resultados observados pelos diferentes autores, em diferentes momentos e em diferentes regiões da América do Sul, ainda não está claro em que grau o processo de vacinação contribuiu para redução da incidência da LTA, principalmente em áreas onde ela vem apresentando alta taxa de imunogenicidade.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar dos vários ensaios realizados por Mayrink e colaboradores utilizando a vacina monocepa (descritos no item 5.10), principalmente na região do Vale do Rio Doce, ainda não foi possível concluir em que grau estas campanhas contribuíram para a redução da incidência da LTA. Desta forma, este trabalho propõe realizar um ensaio comunitário na microrregião de Caratinga, a fim de comparar a redução das taxas de incidência de LTA de áreas vacinadas em relação às taxas de incidência de LTA das áreas não vacinadas (controle). A escolha dessa microrregião deve-se ao fato da área já ser trabalhada pela equipe de pesquisadores há quatro décadas, cujas características epidemiológicas são amplamente conhecidas e da existência de um Centro de Referência para o tratamento das leishmanioses, localizado no município de Caratinga.

4. OBJETIVOS

4.1 - Objetivo Geral:

Avaliar a efetividade da vacina Mayrink e cols (1979) (monovalente - cepa PH8, contendo 360 µg de Nitrogênio total por ml), conservada em mertiolato, na redução da incidência da LTA, através de um ensaio comunitário.

4.2 - Objetivos Específicos:

- 1) Determinar a incidência da LTA na região selecionada para o estudo e em relação às variáveis demográficas – sexo e idade;
- 2) Determinar a prevalência da IDRМ naturalmente positiva na região selecionada para realização do ensaio em relação às variáveis demográficas – sexo e idade;
- 3) Determinar a incidência da LTA na série temporal de 18 anos (1985 a 2002) na região selecionada para realização do ensaio;
- 4) Determinar a efetividade da vacina em termos de redução das taxas de incidências da LTA nas áreas vacinadas em relação às áreas não vacinadas (placebo), numa série temporal de 5 anos (2003 a 2007).
- 5) Determinar a eficácia da vacina, desagregando os dados para uma análise tendo como unidade o indivíduo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – Desenho do Estudo

Objetivando estudar o impacto da vacina anti-LTA no coeficiente de detecção de casos da doença ao nível de setor censitário, foi realizado um ensaio comunitário. Sete setores censitários da microrregião de Caratinga, Minas Gerais, foram selecionados para a realização do ensaio em função da taxa de incidência anual da LTA definida por MACHADO-COELHO et al. (1999). Após realização de censo populacional destes setores, 108 localidades foram selecionadas para realização do ensaio. Em cada setor censitário, as respectivas localidades foram alocadas por meio de sorteio aleatório simples estratificado pelo tamanho populacional para comporem os grupos teste e o controle. O universo populacional (N=6.386) de 50 localidades foi selecionado para compor o grupo teste (áreas vacinadas selecionadas para receber a vacina anti-LTA “Mayrink e cols, 1979”) e de 58 localidades (N=5.387) foi selecionado para compor o grupo controle (áreas geográficas selecionadas para receber placebo).

A identificação dos casos de LTA ocorridos na população recenseada nas áreas do ensaio foi realizada por demanda passiva, através do banco de dados do Sistema de Informação de Leishmaniose (SIL). Os casos de LTA identificados foram alocados nas áreas em que o voluntário residia na época da vacinação, a partir da identificação do nome, idade e endereço de residência de cada indivíduo recenseado, fosse ele eleito ou não para o ensaio (Anexo 2).

5.2 – Área geográfica do Estudo

O estudo foi realizado na microrregião de Caratinga, Vale do Rio Doce, no leste de Minas Gerais. As áreas selecionadas para o ensaio estão localizadas nos municípios de Bom

Jesus do Galho, Córrego Novo, Caratinga (Distritos de Dom Lara e Sapucaia), Entre Folhas, Imbé de Minas e Ubaporanga (Figura 1).

As áreas do estudo estão localizadas entre as coordenadas geodésicas 19° 37' 30" de latitude sul e 42° 09' 00" de longitude oeste, com altitude variando entre 250 a 1.000 metros do nível do mar. O clima da região é quente e úmido e as chuvas são mais freqüentes entre os meses de outubro e abril. A temperatura média anual é de 21,2 °C e a precipitação pluviométrica média é de 1.126 mm (IBGE, 1989).

A escolha dessa região deve-se ao fato da área ser endêmica para a LTA e da existência no município de Caratinga de um Centro de Referência para o tratamento da LTA há mais de 40 anos.

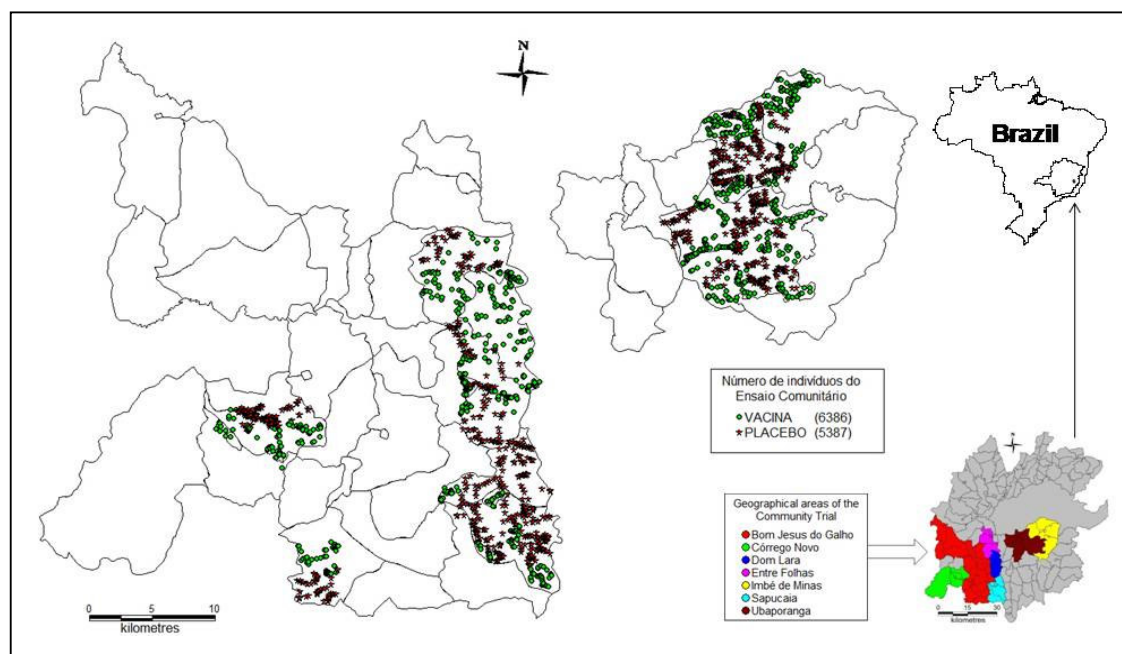


Figura 1: Distribuição geográfica do universo populacional recenseado nas 108 localidades da microrregião de Caratinga eleitas para o Ensaio Comunitário, 2002-2007, segundo o tipo de vacina (Vacina x Placebo) e os setores censitários.

5.3 – Serviço de referência para LTA em Caratinga

Através de convênio firmado entre o Laboratório de Leishmaniose do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Caratinga, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SESMG) e a Superintendência de Campanhas (SUCAM) do Ministério da Saúde, no ano de 1.966, foi criado o Centro de Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana (CTL) na sede do município de Caratinga.

A manutenção deste convênio ao longo dos últimos 40 anos permitiu criar na região um serviço robusto, sólido, coerente, e principalmente de continuidade, tornando o CTL um centro de referência no Vale do Rio Doce, mas principalmente para a população da microrregião de Caratinga, para o diagnóstico e o tratamento da LTA. Isto possibilitou o desenvolvimento de um sistema de banco de dados na plataforma ACCESS, com informações confiáveis, denominado Sistema de Informação de Leishmaniose (SIL) – Anexo 1.

Entre 1965 e 2007, em torno de 8.000 pacientes com LTA foram diagnosticados no CTL. O percentual de positividade para a IDRM foi de 81,9% e do exame parasitológico direto foi de 84,8%. Estes pacientes procediam geralmente da zona rural (82%), eram de cor não preta (80,7%), da faixa etária de 10 a 21 anos (45%), sendo que 40% deles exerciam uma atividade agro-pastoril como ocupação principal (MACHADO-COELHO, 1999, MARQUES et al., 2002)

5.4 – Seleção das áreas e localidades do estudo submetidas ao Ensaio Vacinal

Os 6 municípios pertencentes à micro-região de Caratinga (Bom Jesus do Galho, Caratinga, Córrego Novo, Entre Folhas, Imbé de Minas e Ubaporanga) participantes do Ensaio Comunitário foram selecionados em função do histórico epidemiológico da LTA

definido por MACHADO-COELHO et al. (1999), que estudou a distribuição dos casos de LTA no período de 1980 a 1996, segundo os setores censitários dos municípios da microrregião.

As áreas pré-selecionadas foram agrupadas de acordo o centro urbano ou setor censitário da residência, em caso de residentes nos centros urbanos. Na zona rural utilizou-se o nome do córrego ou da localidade utilizado pela FNS/Caratinga para a identificação do endereço das pessoas (Figura 2). A identificação dos setores censitários foi realizada baseando-se nos mapas cartográficos, com delimitações de setores censitários, fornecidos pelo IBGE.

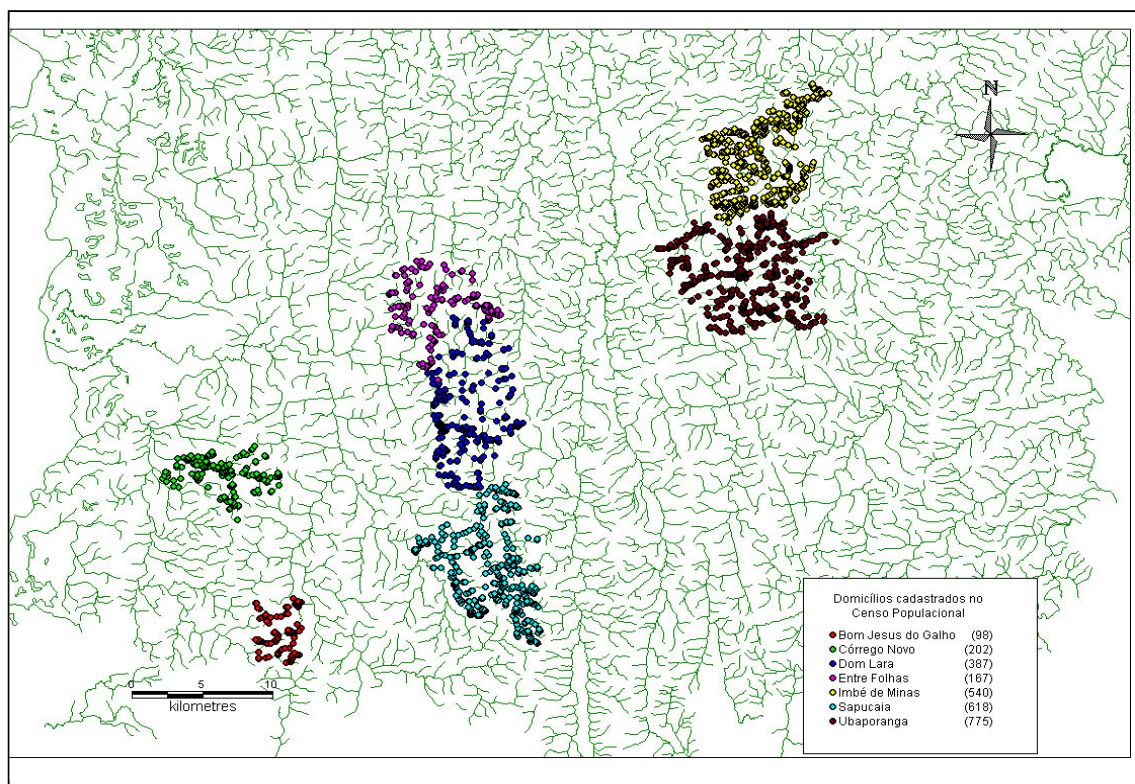


Figura 2 - Domicílios cadastrados, recenseados e georeferenciados durante o censo populacional nas áreas pré-selecionadas para realização do Ensaio Vacinal na microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo a área e hidrografia (córregos).

Baseado no índice comparativo de morbidade da doença (ICM) calculado a partir da razão, para cada área e cada ano, entre o número de casos observados e o número de casos esperados, foi possível identificar sete áreas de maior risco para LTA na microrregião de Caratinga (Bom Jesus do Galho, Córrego Novo, Dom Lara (Caratinga), Entre Folhas, Imbé de Minas, Sapucaia (Caratinga), Ubaporanga). Foram selecionados os setores censitários onde os coeficientes de detecção de LTA nos últimos 20 anos eram mais constantes, com variação de risco de baixo a médio (Quadro 1) (BRASIL, 1998).

Para o cálculo do coeficiente de detecção (CD) utilizou-se o número de casos detectados pelo serviço de saúde local em determinada área em um período definido dividido pelo número de habitantes da área avaliada x 100.000 habitantes, segundo fórmula descrita abaixo:

$$CD = \left(\frac{n_c}{n_{hab}} \right) * 100000, \text{ onde}$$

CD = Coeficiente de detecção de casos de LTA

n_c = Número de casos de LTA identificados na área e diagnosticados pelo serviço de saúde

n_{hab} = Número de habitantes da área avaliada

Quadro1: Parâmetros de classificação dos coeficientes de detecção/100 mil habitantes, segundo o Ministério da Saúde.

Coeficiente de Detecção	Nº casos/100 mil habitantes
Sem caso	0
Baixo	< 3
Médio	3,0 11,0
Alto	11,0 71,0
Muito Alto	> 71

Para o cálculo do coeficiente de detecção utilizado para a seleção prévia das áreas, foi utilizada a população do censo de 1996, conforme mostrado no Quadro 2. No cálculo do coeficiente de detecção dos casos detectados no período de 2002 a 2007, trabalhou-se com os dados populacionais determinados pelo censo domiciliar realizado pela equipe do CTL.

Quadro 2: Setores censitários utilizados como referência para seleção das áreas geográficas do ensaio com o respectivo tamanho populacional e coeficiente de detecção (RESENDE, 2004).

Setor Censitário em 1996	Referência Geográfica	Área	Município	População em 1996	Coeficiente de Detecção (/100 mil hab.)
13	Cór. do Cedro	B. J. do Galho	Bom Jesus do Galho	617	1,07 (baixo)
10	Cór. do Mantimento	Córrego Novo	Córrego Novo	279	1,81 (baixo)
2	Cór. dos Lopes	Sapucaia	Caratinga	398	3,49 (médio)
3	Cór. do Macaquinho	Dom Lara	Caratinga Entre Folhas	361	5,03 (médio)
6	Cór. do Batatal	Ubaporanga	Ubaporanga	902	8,49 (médio)

5.5 – Censo populacional e Georreferenciamento

Após a definição das áreas selecionadas para o estudo foi realizado um censo casa a casa a partir de janeiro de 2002 (Anexo 2), que permitiu identificar a população real de cada uma das localidades que compunham as áreas dos municípios selecionados. Durante a fase do recenseamento foram identificadas as coordenadas geodésicas e altitude de cada domicílio utilizando o sistema GPS (“Global Position System”). Foi utilizado o aparelho da marca

Garmin modelo Etrex III. Os dados foram anotados em uma planilha e posteriormente transferidos a uma planilha do Excel (Anexo 3).

5.6 – Determinação do tamanho populacional anual

O tamanho populacional de cada setor censitário por ano foi calculado a partir da taxa média de crescimento populacional determinada pelo IBGE e ajustada a cada ano de realização do censo (1980, 1991, 1996 e 2000), obtida pela equação abaixo (LIMA, 1982):

$$TG = \left[\left(\frac{V_f}{V_i} \right)^{\frac{1}{n}} - 1 \right] * 100, \text{ onde}$$

TG = Taxa média de crescimento populacional

V_f = População do ano final

V_i = População do ano inicial

n = Número de anos entre o ano final e o ano inicial

Como ao nível de localidades, os dados populacionais não são disponibilizados pelo IBGE, assumiram-se para estas as mesmas taxas de crescimento populacional observada no respectivo setor censitário. Estas taxas foram utilizadas como referência para estimar o tamanho populacional de cada uma das 108 localidades, de forma progressiva a partir de 2002 até o ano de 1980, i.e., a direção temporal realizada para o cálculo populacional por localidade foi a inversa da utilizada para obtenção da população dos setores censitários.

5.7 – Divulgação do trabalho e recrutamento dos voluntários para vacinação

Os educadores de saúde e os líderes comunitários de cada área pré-selecionada foram previamente contactados pela equipe de pesquisadores para esclarecimentos sobre o trabalho a ser realizado junto à comunidade.

Depois de informados sobre os objetivos do projeto, o protocolo, os procedimentos que seriam realizados e os riscos e benefícios da sua participação no estudo, solicitou-se a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por cada voluntário ou seu representante legal (Anexo 4).

Os voluntários residentes nas localidades foram recrutados pelo coordenador do trabalho de campo no momento da visita domiciliar a comporem o grupo vacina ou placebo, baseado no sorteio realizado para determinação do tipo de produto a ser aplicado em cada localidade.

5.8 – Triagem dos indivíduos

No local, na data e na hora agendada e antes da realização da IDRМ pré-vacinal, utilizado para a triagem dos voluntários, a equipe de vacinação realizou uma entrevista com cada um dos indivíduos recrutados para participarem do estudo, a fim de identificar a ocorrência pregressa de LTA (cicatriz suspeita ou lesão ativa).

Nos voluntários que apresentaram história pregressa negativa para LTA e que não apresentavam os critérios de exclusão foi realizado a IDRМ pré-vacinal. Após 48 horas da aplicação dos testes foi realizada a leitura. Os voluntários cuja leitura da IDRМ pré-vacinal mostrou-se não reativa foram considerados elegíveis a participarem do ensaio, recebendo vacina ou placebo.

Como critérios de inclusão dos voluntários na pesquisa foram utilizados os seguintes critérios: Idade de 5 a 59 anos; IDRМ pré-vacinal não reativa; história e exame clínico negativos para leishmaniose cutânea ou mucosa; assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo voluntário, pais ou responsáveis legais (ANEXO 4).

Como critérios de exclusão foram adotados os seguintes critérios: indivíduos com história prévia de leishmaniose cutânea ou mucosa; IDRМ pré-vacinal reativa (naturalmente positiva); doença grave e/ou incapacitante; antecedentes de alergia a mertiolate; desnutrição de 2º ou 3º grau; gestantes e pacientes febris no momento da vacinação (TA > 37.80C).

5.9 – Esquema de vacinação

Foram aplicados duas doses de 1 mL de vacina ou placebo, por via intramuscular a intervalos de 21 dias nos voluntários elegíveis pelo processo de triagem e residentes nas localidades selecionadas a participarem do estudo.

5.10 – Composição da vacina

A vacina usada no estudo foi composta de concentrado de formas promastigotas mortas de *Leishmania amazonensis* cepa pH 8, conforme descrito por Mayrink et al. (1979). Os excipientes utilizados foram: fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, thimerosal, água para injetáveis. A temperatura de conservação foi mantida entre 2 e 8 °C.

5.11 – Composição do placebo

O placebo usado no grupo controle foi constituído por uma substância inerte salina fisiológica, composta por solução tampão fosfato 0,1mμ, pH 7,4, contendo thimerosal 1:10.000.

5.12 – Métodos diagnósticos para identificação dos casos de LTA

A definição da modalidade clínica da LTA foi feita utilizando-se critérios clínicos e exames laboratoriais descritos abaixo. O técnico de saúde da SES, após treinamento, cumpriu o protocolo da pesquisa. Ele seguiu o procedimento do Quadro 3 para coleta de amostras durante o exame clínico. Esse protocolo foi conduzido junto com o exame clínico de rotina.

Quadro 3: Protocolo de procedimentos para identificação de casos de LTA

1)	Anotação da presença, número e características da úlcera e do comprometimento das mucosas e vias aéreas (de acordo com os critérios da OMS).
2)	Diagnóstico imunológico: Intradermoreação de Montenegro com leitura da pápula após 48 horas até 72 horas.
3)	Diagnóstico clínico-laboratorial: Leishmaniose Cutânea, Mucosa.
4)	Tratamento: Número de séries de tratamento, tempo de cura.
5)	História vacinal: Residir em área já vacinada. Ano da vacinação anti-leishmania.

5.13 – Diagnóstico clínico

Pacientes com uma ou mais lesões cutâneas ativas, ulceradas ou não, foram classificados como casos de leishmaniose cutânea (LC). As úlceras cutâneas típicas normalmente se caracterizam por apresentarem-se rasas ou profundas, sendo que nestas as bordas são salientes, endurecidas, com os limites internos talhados a pique, ou mesmo com as margens subminadas. Removido o material necrótico que as recobre, o fundo da úlcera mostra-se granuloso e limpo (REY, 1991; GONTIJO & CARVALHO, 2003, BRASIL, 2006). As úlceras com contaminação bacteriana não apresentam estas características.

A presença, concomitante ou não, de lesões das membranas mucosas e submucosas, tais como lesões da naso-oro-faringe, define o caso de leishmaniose mucosa (LM), portanto, não foram incluídos como casos eleitos para o cálculo da eficácia da vacina.

5.14 – Reação intradérmica de Montenegro

A reação intradérmica de Montenegro (IDRM), baseada na resposta imune celular (hipersensibilidade tardia) dos pacientes, foi executada com o antígeno preparado a partir de cultura de promastigotas de *L. amazonensis*, mortas, sonicadas e suspensas em solução mertiolatada 1/10.000 (MELO et al., 1977; MAYRINK et al., 1993). Foi injetado por via intradérmica 0,1 ml do antígeno de 40 µg de nitrogênio protéico (MELO et al., 1977), na face anterior do antebraço. A positividade foi indicada pelo aparecimento de pápula eritematosa, com base dura, medida 48 horas após a realização do teste. O maior diâmetro da endureção foi utilizado como critério de positividade. Durante todo o trabalho a leitura de todas as IDRM foi realizada por um único técnico experiente.

5.15 – Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico definitivo da infecção ativa por *Leishmania* foi feito pela demonstração dos parasitos nos tecidos biopsiados obtidos ou das bordas inflamadas das lesões cutâneas ou das mucosas. A biópsia foi realizada em cunha com corte de bisturi. Com esse material foi realizada impressão, por aposição, sobre lâminas de microscopia, coradas com Giemsa, para exame ao microscópio (1000x).

5.16 – Processamento dos dados

Todos os pacientes atendidos no CTL de 1966 a 2007 cadastrados no SIL e os dados relativos ao censo populacional e ao ensaio comunitário foram armazenados em planilhas do SPSS.

Os mapas cartográficos do IBGE referentes à microrregião de Caratinga, contendo os limites municipais, censitários e hidrografia foram georeferenciados e digitalizados no programa MAPI-INFO. Mapas temáticos foram confeccionados com a distribuição espacial dos casos de LTA progresso, dos indivíduos com IDRM naturalmente positiva, dos casos de LTA detectados durante o ensaio e dos indivíduos que recusaram a participar do estudo.

Como a delimitação geográfica dos setores censitários não foi mantida pelo IBGE nos diferentes censos, agrupamentos foram realizados para permitir a análise da distribuição espacial das taxas em diferentes períodos. Os agrupamentos realizados foram: 1º agrupamento (setores 3 e 6 e setores 4 e 5 do Distrito de Imbé de Minas), 2º agrupamento (setores 3 e 4 do distrito de Sapucaia), 3º agrupamento (setores 6 e 10 do distrito de Córrego Novo).

5.17 – Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS (Norussis, 1990). Foi realizada a distribuição de frequência das variáveis, permitindo estabelecer um perfil da população estudada quanto ao sexo, idade, área geográfica de procedência, e variáveis clínicas.

Para comparação das taxas de incidência os casos foram agrupados em áreas vacinada (grupo teste) e placebo (grupo controle). A análise de covariância foi usada para comparar a

incidência média anual observada em cada grupo usando como co-variável a incidência do período pré-vacinal, utilizada para ajustamento das taxas.

A eficácia vacinal foi medida a partir da razão entre a diferença entre as taxas de incidência nos indivíduos que receberam placebo ou vacina e, a taxa de incidência da doença entre os indivíduos que receberam placebo, multiplicado por 100. A hipótese nula de igualdade entre o percentual de casos de LTA nos grupos vacinados e placebo foi testada pelo teste do qui-quadrado.

Diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5.18 – Comitê de ética

Este projeto, “Estudo do Impacto da vacina anti-LTA sobre a incidência da leishmaniose tegumentar americana em Caratinga, MG: ensaio comunitário” – foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG em 03 de abril de 2002, sob o parecer no 31/02 e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o parecer no 107/2007.

6. RESULTADOS

6.1 - População recenseada nas 108 localidades selecionadas para o ensaio comunitário

O censo populacional realizado pela equipe de campo da UDS-DRS-CF foi realizado nos 2.787 domicílios localizados nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio. Na Figura 3 é apresentada a distribuição espacial desses domicílios na microrregião de Caratinga e na Figura 4 está apresentado o organograma dos resultados da participação dos 11.773 indivíduos recenseados.

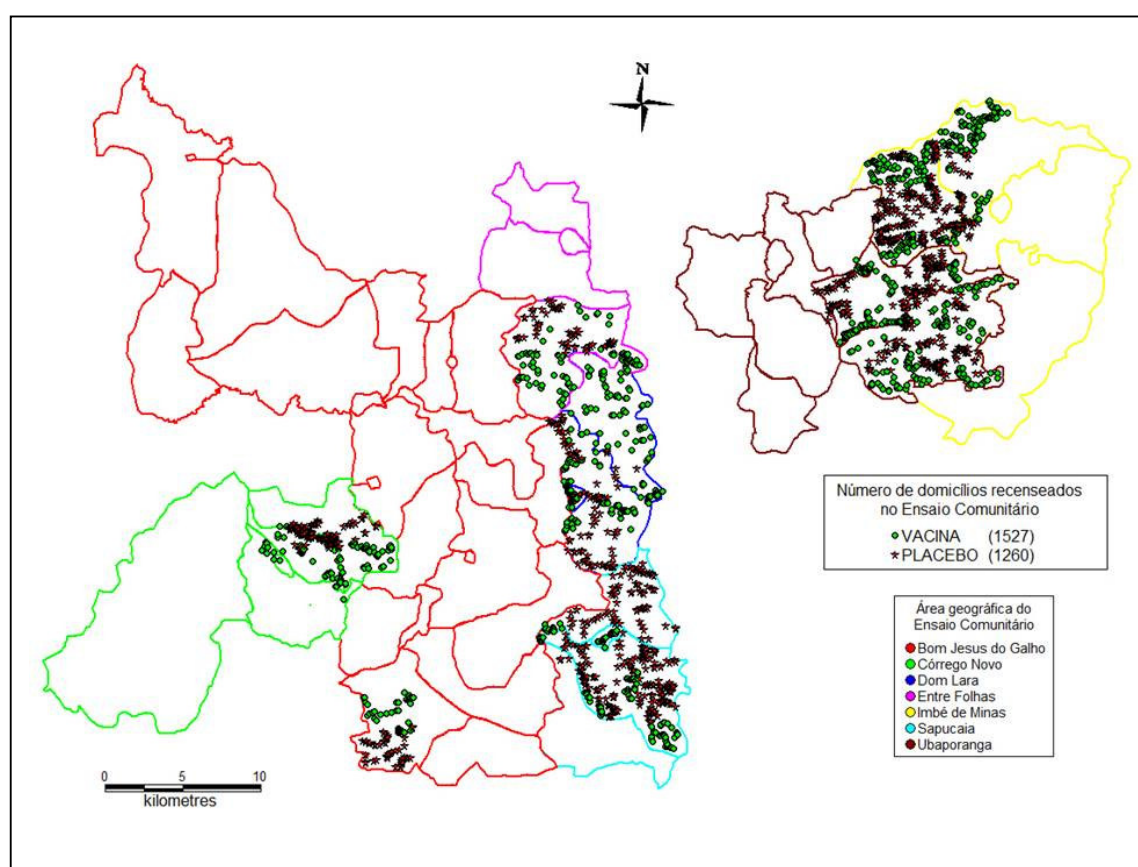


Figura 3: Distribuição geográfica dos domicílios recenseados nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga para a realização do Ensaio comunitário, 2002-2007, segundo a área e o tipo de vacina.

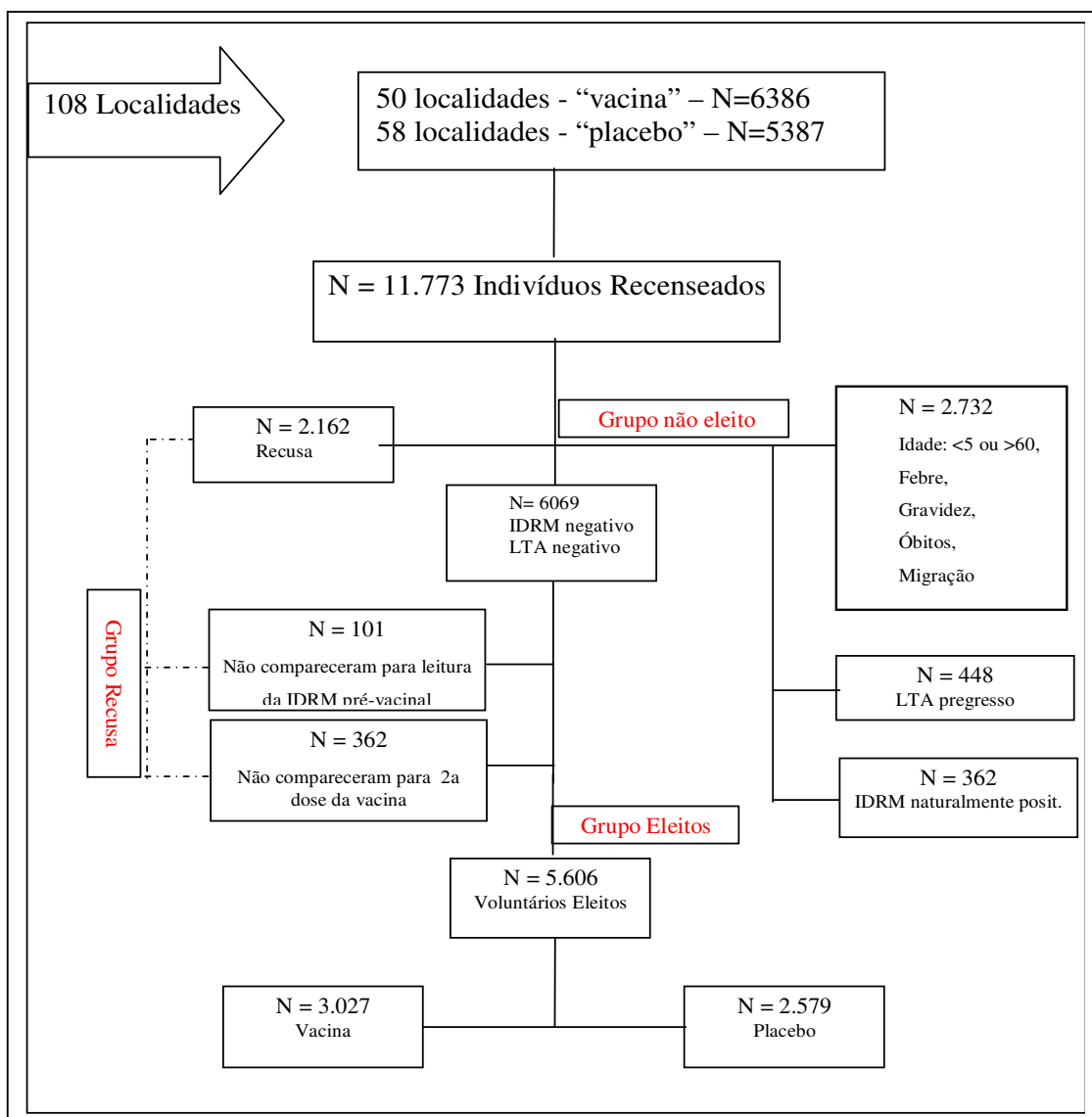


Figura 4: Organograma do estudo

A população total recenseada apresentou idade variando de 1 mês a 96 anos, com média de 28,42 anos e mediana de 24 anos de idade. A distribuição da população recenseada segundo o sexo e faixa etária está apresentada na TABELA 1. Apesar de significativo (P=0,01), foi observada apenas uma proporção levemente maior do sexo masculino em

relação ao feminino a partir da faixa etária de 20 a 29 anos, sendo encontrado o oposto nas faixas etárias menores.

Tabela 1: Distribuição da população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga para o Ensaio Comunitário, 2002-2007, segundo sexo e faixa etária.

Faixa etária	Sexo				Total	
	Feminino		Masculino		N	%
	N	%	N	%		
0-4	521	9,2%	455	7,4%	976	8,3%
5-9	590	10,5%	634	10,3%	1.224	10,4%
10-19	1.284	22,8%	1.300	21,2%	2.584	21,9%
20-29	959	17,0%	1.091	17,8%	2.051	17,4%
30-39	768	13,6%	862	14,1%	1.631	13,9%
40-49	552	9,8%	674	11,0%	1.226	10,4%
50-59	402	7,1%	451	7,4%	853	7,2%
≥60	518	9,2%	609	9,9%	1.127	9,6%
Sem Informação	43	0,8%	58	0,9%	101	0,9%
Total	5.638	47,9%	6.135	52,1%	11.773	100,0%

* $X^2_{gl_6}=16,673$; $p=0,011$

Dos 11.773 indivíduos recenseados, 2.625 indivíduos recusaram a participar do ensaio, 362 indivíduos apresentaram IDRMs naturalmente positiva e 448 apresentaram LTA progressiva. Foram excluídos do ensaio 58 indivíduos que faleceram no decorrer do estudo, 571 que emigraram da área do estudo no período entre o recenseamento e a realização da vacinação, 976 crianças com idade inferior a 5 anos e 1.127 indivíduos com idade igual ou

superior a 60 anos. Portanto, a população final do ensaio comunitário foi composta por 5.606 indivíduos, 47,62% da população recenseada no início do trabalho.

Dos 2.625 (31,90%) indivíduos que recusaram a participar do ensaio, 2.162 (82,36%) não compareceram aos locais de vacinação para realização da etapa de triagem, 101 (3,85%) indivíduos que realizaram a IDR de triagem, mas não retornaram 48 horas após a aplicação para leitura da reação e 362 (13,79%) indivíduos que receberam apenas uma dose da vacina (Figura 4). A distribuição geográfica do grupo populacional que recusou a participação no ensaio está apresentada no Anexo 5.

A área geográfica que apresentou maior percentual de recusa em participar do estudo foi a localizada no município de Córrego Novo (64,3%). O percentual médio de recusa da população recenseada foi de 31,9% (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição populacional por área geográfica do ensaio comunitário na microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo a aceitação em participar do estudo.

Área estudo	Recusa		Eleitos		TOTAL
	Nº	%	Nº	%	
Bom Jesus do Galho	48	16,8%	238	83,2%	286
Córrego Novo	392	64,3%	218	35,7%	610
Dom Lara	396	37,5%	661	62,5%	1.057
Entre Folhas	152	29,6%	361	70,4%	513
Imbé de Minas	480	30,7%	1.085	69,3%	1.565
Sapucaia	572	32,1%	1.208	67,9%	1.780
Ubaporanga	485	24,2%	1.832	75,8%	2.417
TOTAL	2.625	31,9%	5.603	68,1%	8.228

$\chi^2_{gl_6}=407,468; P<0,001$

Dos 2.625 indivíduos que recusaram a participar do ensaio vacinal, 1.552 (59,1%) eram indivíduos do sexo masculino; o grupo etário de 20 a 29 anos foi o que apresentou o maior índice de recusa (24,23%) - não tendo sido encontrada diferença significativa entre a distribuição de recusa por sexo e faixa etária ($p=0,346$) (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição populacional do grupo Recusa segundo o sexo e a faixa etária na população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário da microrregião de Caratinga, 2002-2007.

Faixa Etária	Sexo				TOTAL
	Feminino		Masculino		
	Nº	%	Nº	%	
5-9	95	43,4%	124	56,6%	219
10-19	270	43,7%	348	56,3%	618
20-29	256	40,3%	380	59,7%	636
30-39	175	37,3%	294	62,7%	469
40-49	152	39,5%	233	60,5%	385
50-59	125	41,4%	173	58,1%	298
TOTAL	1.073	40,9%	1552	59,1%	2.625

$\chi^2_{gl_5}=5,609$; $p=0,346$

A população não eleita para o ensaio vacinal foi dividida em três grupos: IDRM naturalmente positiva (IDRM pré-vacinal reativa), LTA pregressa e o terceiro grupo formado pelos demais indivíduos excluídos segundo os critérios de exclusão (Figura 2).

Dos 11.773 indivíduos recenseados, 6.556 (55,69%) realizaram a IDRM pré-vacinal e compareceram para realização da leitura 48 horas após a aplicação; dentre estes 362 (5,5%) indivíduos apresentaram reatividade. O município Bom Jesus do Galho apresentou o maior percentual de IDRM naturalmente positiva (7,2%) (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado da IDRМ pré-vacinal segundo a positividade e as áreas geográficas da população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário da microrregião de Caratinga, 2002-2007.

Área Geográfica	Classificação da IDRМ				TOTAL
	Naturalmente positiva		Negativa		
	Nº	%	Nº	%	
Bom Jesus do Galho	19	7,2%	244	92,8%	263
Corrego Novo	17	6,4%	250	93,6%	267
Dom Lara	34	4,5%	719	95,5%	753
Entre Folhas	16	4,1%	379	95,9%	395
Imbe de Minas	83	6,5%	1.202	93,5%	1.285
Sapucaia	50	3,6%	1.349	96,4%	1.399
Ubaporanga	143	6,5%	2.051	93,5%	2.194
TOTAL	362	5,5%	6.194	94,5%	6.556

$\chi^2_{gl_6}=21,439$; $p= 0,002$

A distribuição dos indivíduos com IDRМ naturalmente positiva (IDRМ pré-vacinal reativa) está apresentada na Figura 5.

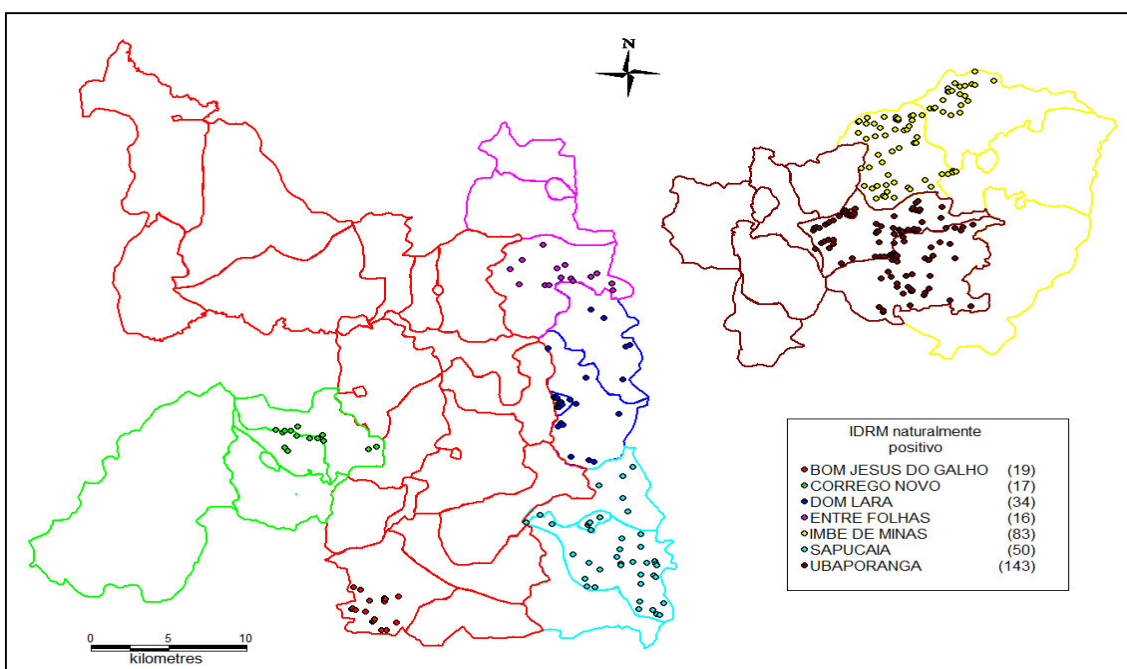


Figura 5: Distribuição geográfica dos indivíduos com IDRМ naturalmente positiva detectadas na fase de triagem do Ensaio Comunitário realizados na microrregião de Caratinga, 2002 e 2004.

Na Tabela 5 observa-se um aumento progressivo da prevalência da IDRМ naturalmente positiva a partir dos 10 anos de idade, sendo maior na faixa etária de 50 a 59 anos (7,84%), não sendo, entretanto, observada diferença na distribuição de resultados positivos segundo sexo e idade (p=0,907).

Tabela 5: Distribuição e prevalência da IDRМ naturalmente positiva na população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário na microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo o sexo e a faixa etária.

Faixa Etária	Pop	Sexo				TOTAL	Prevalência IDRМ
		F		M			
		Nº	%	Nº	%		
5-9	1.011	31	50,8%	30	49,2%	61	6,12%
10-19	1.858	43	53,8%	37	46,3%	80	4,31%
20-29	1.253	24	44,4%	30	55,6%	54	4,31%
30-39	1.103	38	53,5%	33	46,5%	71	6,44%
40-49	795	26	48,1%	28	51,9%	54	6,79%
50-59	536	22	52,4%	20	47,6%	42	7,84%
TOTAL	6.556	184	50,8%	178	49,2%	362	5,52%

$\chi^2_{gl_5}=1,555$; P=0,907

Dos 11.773 indivíduos recenseados, 448 indivíduos foram identificados como já tendo contraído a LTA no passado. As distribuições espaciais dos casos de LTA progresso detectados pelo censo domiciliar nas áreas do estudo são apresentadas na figura 6.

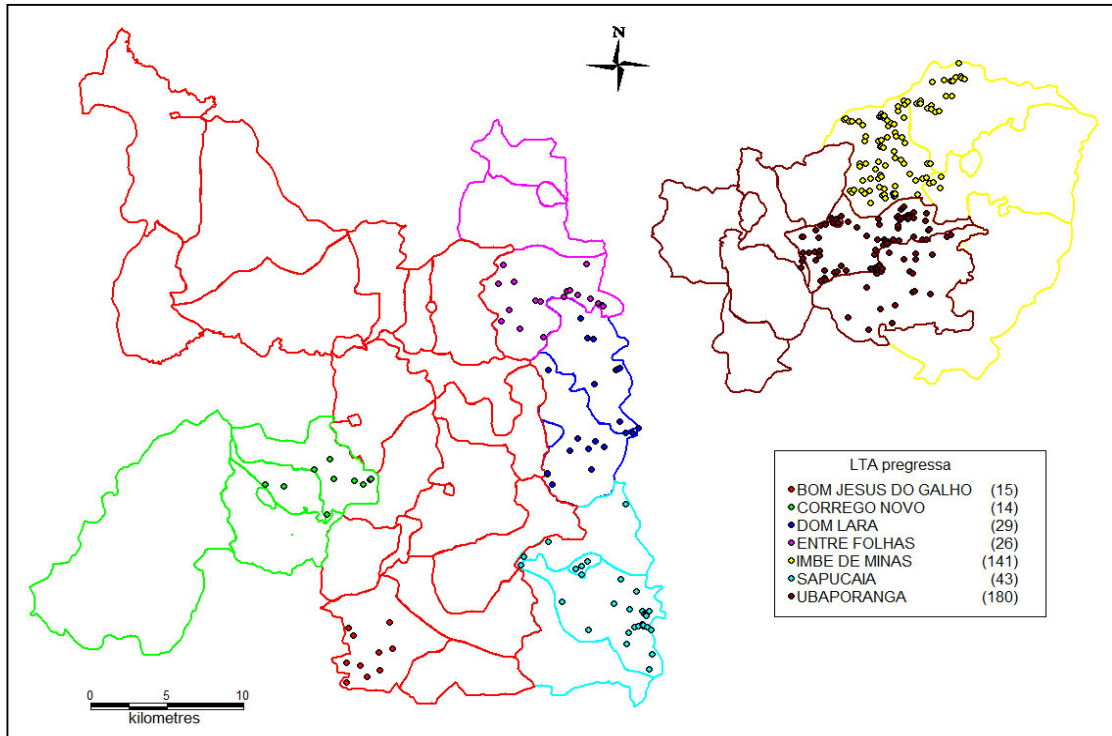


Figura 6: Distribuição espacial dos casos de leishmaniose tegumentar americana pregressa detectados na população recenseada das áreas submetidas ao Ensaio Comunitário, 2002-2007.

Através da distribuição da frequência dos casos de LTA pregressa estratificada por área geográfica de residência e sexo notou-se que aproximadamente 52% dos casos de LTA pregressa ocorreram em indivíduos do sexo masculino. Observou-se também, que a distribuição dos casos de LTA pregressa por sexo foi semelhante em todas as áreas do estudo, exceto para a área do município de Córrego Novo, onde a doença prevaleceu no sexo feminino. Apesar da discrepância observada, não foi observado diferença estatística entre os sexos por área de estudo ($p=0,0696$). A maioria dos casos de LTA pregressa foi detectada em indivíduos residentes nas áreas do município de Ubaporanga, entretanto, a maior prevalência da LTA pregressa ocorreu nas áreas do município de Imbé de Minas (6,24%) (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana pregressa identificados na população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário da microrregião de Caratinga, segundo a área de estudo e o sexo e prevalência da doença.

Área de estudo	Pop.censo 2002	Sexo				TOTAL	Prevalência LTA preg
		Feminino		Masculino			
		Nº	%	Nº	%		
Bom Jesus do Galho	412	8	53,3	7	46,7	15	3,64%
Córrego Novo	763	10	71,4	4	28,6	14	1,83%
Dom Lara	1.545	14	48,3	15	51,7	29	1,88%
Entre Folhas	748	14	53,8	12	46,2	26	3,48%
Imbé de Minas	2.261	69	48,9	72	51,1	141	6,24%
Sapucaia	2.346	19	44,2	24	55,8	43	1,83%
Ubaporanga	3.698	82	45,6	98	54,4	180	4,87%
TOTAL	11.773	216	48,2	232	51,8	448	3,80%

$\chi^2_{gl_6}=4,328$; $p= 0,0632$

A faixa etária de 20 a 29 anos concentrou o maior número de casos de LTA pregressa (23,7%), não sendo observada diferença estatística em relação à frequência de casos de LTA nas áreas estudadas em relação à composição etária ($p=0,214$) (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana progressiva identificados na população recenseada nas 108 localidades pré-selecionadas para o ensaio comunitário da microrregião de Caratinga, segundo a área de estudo e a faixa etária.

Área	Faixa Etária														TOTAL
	0-9		10-19		20-29		30-39		40-49		50-59		>60		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Bom Jesus do Galho	-	-	3	20,0	3	20,0	3	20,0	3	20,0	-	-	3	20,0	15
Córrego Novo	2	14,3	6	42,9	-	-	3	21,4	-	-	1	7,1	2	14,3	14
Dom Lara	-	-	6	20,7	10	34,6	4	13,8	2	6,9	5	17,2	2	6,9	29
Ente Folhas	2	7,7	3	11,5	7	26,9	3	11,5	2	7,7	3	11,5	6	23,1	26
Imbe de Minas	11	7,8	25	17,7	41	29,1	17	12,1	19	13,5	15	10,6	13	9,2	141
Sapucaia	2	4,7	5	11,6	10	23,3	6	14,0	9	20,9	8	18,6	3	7,0	43
Ubaporanga	13	7,3	42	23,5	35	19,6	28	15,6	27	15,1	12	6,7	22	12,3	179
TOTAL	30	6,7	90	20,1	106	23,7	64	14,3	62	13,9	44	9,8	51	11,4	447

$\chi^2_{gl36}=42,422; p= 0,214$

6.2 - Caracterização da população eleita para o Ensaio Comunitário

Dos 11.773 indivíduos recenseados, 5.606 indivíduos foram eleitos e aceitaram participar do ensaio, sendo que 3.027 (54%) indivíduos receberam a vacina e 2.579 (46%) receberam o placebo (Tabela 8). Com exceção das áreas localizadas nos municípios de Bom Jesus do Galho, Córrego Novo e Dom Lara foi observada uma homogeneidade na distribuição de vacina e placebo nas áreas geográficas. Enquanto em Dom Lara houve um predomínio de vacinados em Bom Jesus do Galho e Córrego Novo houve um predomínio de indivíduos que receberam placebo (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição da população eleita para o Ensaio Comunitário nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo o tipo de vacina e as áreas selecionadas a participarem do estudo.

Área geográfica	Tipo vacina				TOTAL
	Vacina		Placebo		
	Nº	%	Nº	%	
Bom Jesus do Galho	94	39,5	144	60,5	238
Córrego Novo	57	26,1	161	73,9	218
Dom Lara	534	80,7	128	19,3	662
Entre Folhas	193	53,5	168	46,5	361
Imbé de Minas	604	55,7	481	44,3	1.085
Sapucaia	680	56,3	528	43,7	1.208
Ubaporanga	865	47,2	969	52,8	1.834
TOTAL	3.027	54,0	2.579	46,0	5.606

$X^2_{gl_6}=316,031; p< 0,001$

A distribuição da vacina na população eleita a participar do estudo segundo o sexo está apresentada na tabela 9, não sendo observada diferença significativa entre estes grupos ($p=0,443$).

Tabela 9: Distribuição da população eleita para o Ensaio Vacinal nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo o tipo de vacina e o sexo.

Sexo	Tipo Vacina				TOTAL
	Vacina		Placebo		
	Nº	%	Nº	%	
Feminino	1.537	54,5%	1.283	45,5%	2.820 (%)
Masculino	1.490	53,5%	1.296	46,5%	2.786 (%)
TOTAL	3.027	54,0%	2.579	46,0%	5.606

$X^2_{gl_1}=0,589$; $p=0,443$

A distribuição da vacina e do placebo dentro das faixas etárias também não apresentou diferença significativa ($p=0,090$) (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição da população eleita para o Ensaio Vacinal nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga, 2002-2007, segundo o tipo de vacina e a faixa etária.

Faixa etária	Tipo vacina				TOTAL
	Vacina		Placebo		
	Nº	%	Nº	%	
5-9	481	54,3%	405	45,7%	886
10-19	856	52,7%	769	47,3%	1.625
20-29	586	56,1%	459	43,9%	1.045
30-39	480	51,6%	451	48,4%	931
40-49	362	53,7%	312	46,3%	674
50-59	262	58,9%	183	41,1%	445
TOTAL	3.027	54,0%	2.579	46,0%	5.606

$X^2_{gl_5}=9,508$; $p=0,090$

A distribuição espacial da população eleita para a avaliação da efetividade vacinal segundo a área geográfica de sua residência e o tipo de vacina recebido (vacina/placebo) está apresentada na Figura 7.

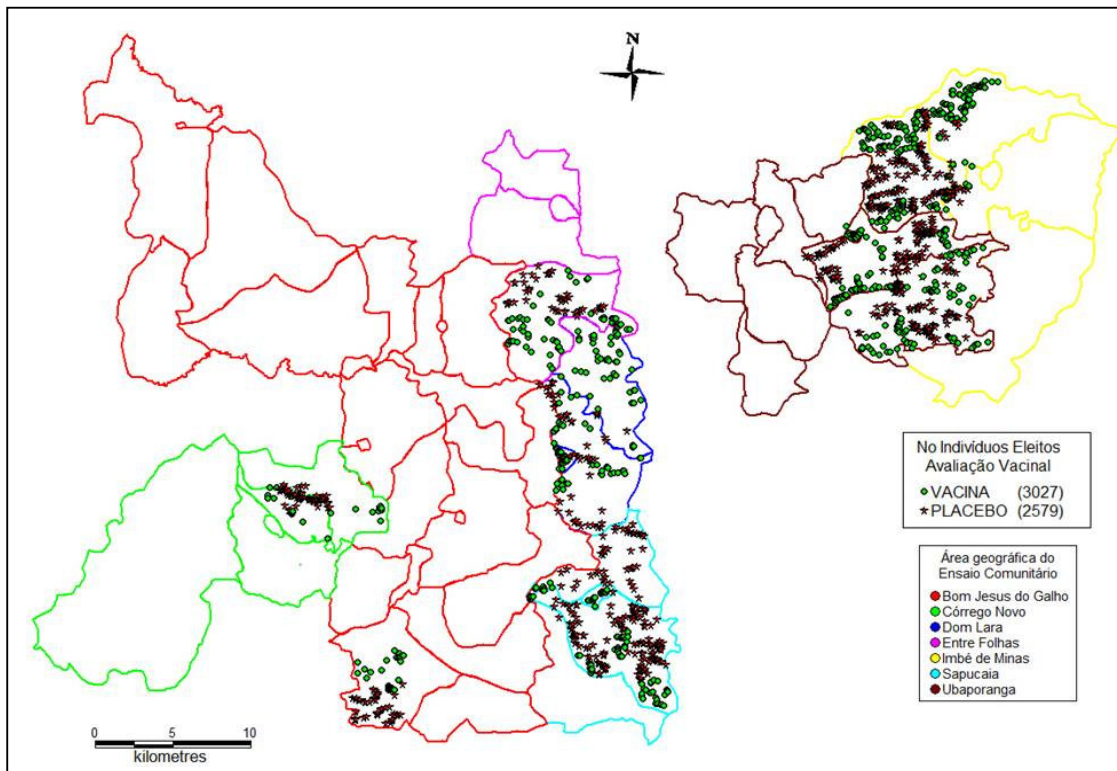


Figura 7: Distribuição espacial da população eleita para a avaliação da efetividade vacinal segundo a área geográfica de residência e o tipo de vacina (vacina/placebo) nas 108 localidades pré-selecionadas da microrregião de Caratinga, 2002-2007.

6.3 - Casos de LTA pós-vacinal identificados na população recenseada

Até setembro de 2007 foram diagnosticados no Ambulatório Paulo Araújo Magalhães, da UDS-Caratinga, 24 casos de leishmaniose cutânea, 1 caso de leishmaniose cutâneo-mucosa (Imbé de Minas) e 1 caso de leishmaniose mucosa (Imbé de Minas) na população recenseada na área do ensaio. Dos 24 casos de LTA cutânea 1 caso ocorreu em uma criança menor de 1 ano (Entre Folhas), 2 casos ocorreram em idosos com idade superior a 70 anos (Imbé de Minas e Dom Lara) e no grupo de indivíduos com a IDRm naturalmente positiva foram detectados dois casos da doença, sendo que em um o diâmetro da IDRm foi igual a 10 x 15 mm (Bom Jesus do Galho) e no outro 20 x 25 mm (Ubaporanga), portanto não eleitos a participarem do estudo.

A Figura 8 apresenta a distribuição espacial dos casos de leishmaniose cutânea pós-vacinal detectados na população recenseada. Os casos detectados apresentaram-se distribuídos em 6 das 7 áreas pré-selecionadas para realização do ensaio comunitário.

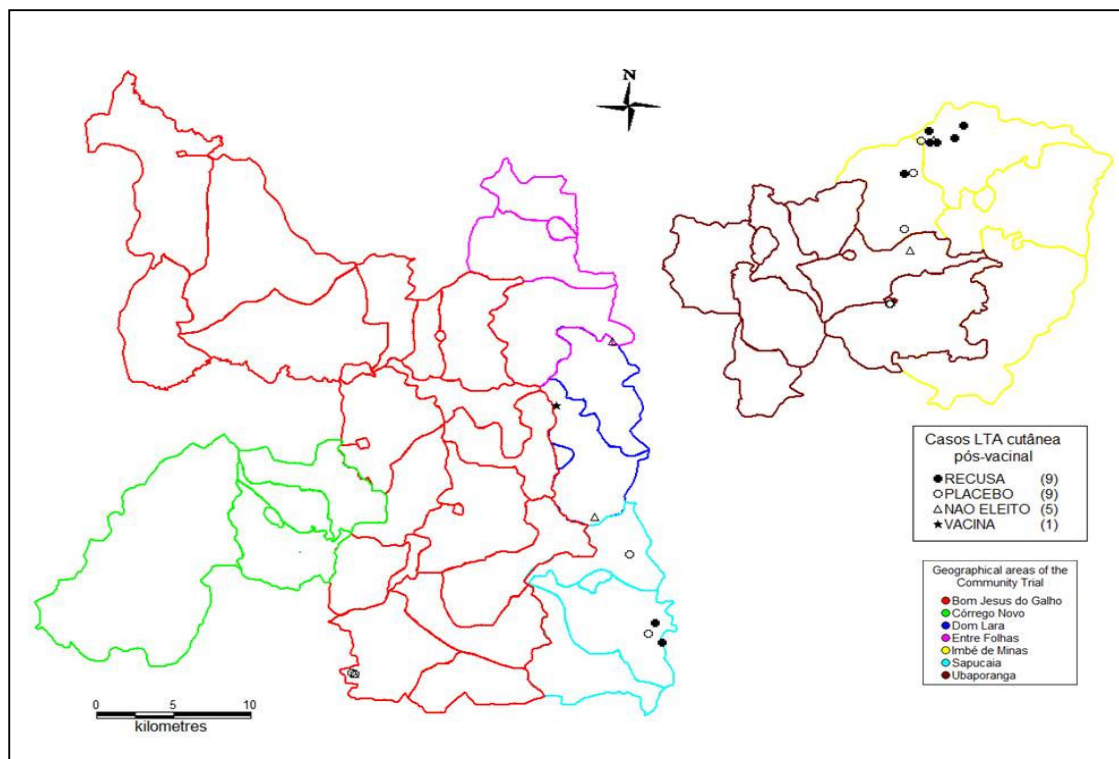


Figura 8: Distribuição espacial dos casos de Leishmaniose cutânea pós-vacinal detectados no Ambulatório Paulo Araújo Magalhães na população recenseada das áreas submetidas ao ensaio vacinal, 2002-2007.

Do total de 19 casos de LTA cutânea pós-vacinal observados na população eleita, 9 casos (47,3%) ocorreram no grupo placebo e somente 1 caso (5,3%) no grupo vacinado. Entre os indivíduos que recusaram a participar do ensaio foram observados 9 novos casos correspondendo a 47,3% do total de casos identificados na população eleita (Tabela 11).

A doença foi observada em todas as áreas do ensaio com exceção das áreas do município de Córrego Novo, onde não foi identificado nenhum caso da doença. O município de Imbé de Minas foi o que contribuiu com o maior número de casos de LTA (10 casos),

sendo que 7 casos ocorreram em indivíduos que se recusaram a participar do estudo e 3 casos ocorreram em voluntários que receberam o placebo. Apenas um caso de leishmaniose cutânea foi diagnosticado dentre a população vacinada, este caso foi detectado na área de estudo do município de Entre Folhas.

Tabela11: Distribuição dos casos de Leishmaniose Cutânea pós-vacinal na população eleita para o Ensaio Vacinal nas áreas pré-selecionadas da microrregião de Caratinga submetidas ao Ensaio Comunitário, 2002-2007, segundo a área de estudo e os grupos avaliados: Recusa, Placebo e Vacina.

Área geográfica	Grupos de doentes						TOTAL	
	Recusa		Placebo		Vacina		N	%
	N	%	N	%	N	%		
Bom Jesus do Galho	-	0	2	10,5	-	0	2	10,5%
Córrego Novo	-	0	-	0	-	0	-	0%
Dom Lara	-	0	-	0	-	0	-	0%
Entre Folhas	-	0	-	0	1	5,3	1	5,3%
Imbé de Minas	7	36,8	3	15,8	-	0	10	52,6%
Sapucaia	2	10,5	2	10,5	-	0	4	21,0%
Ubaporanga	-	0	2	10,5	-	0	2	10,5%
TOTAL	9	47,3%	9	47,3%	1	5,3%	19	100%

$\chi^2_{gl=15}$; $p=0,654$

Dos 19 casos de LTA detectados na população eleita, 8 (42,1%) ocorreram no sexo feminino e 11 (57,9%) no sexo masculino. Aproximadamente 70% dos casos de leishmaniose pós-vacinal ocorreram em indivíduos com até 30 anos de idade, sendo a faixa etária de 30 a 39 anos a mais acometida (31,6%). Não foi observada diferença estatística entre a ocorrência de LTA segundo o sexo ($p=0,383$) e as faixas etárias ($p=0,150$).

6.4 - Incidência da LTA na série temporal de 1985 a 2006.

Na tabela 12 está apresentada a incidência média anual da LTA das 50 áreas vacinadas e 58 áreas que receberam placebo, antes e após o ensaio vacinal. Não foi observada diferença significativa ($p=0,357$) entre as incidências no período pré-vacinal em ambas as áreas. No período pós-vacinal a comparação das incidências médias anuais foi ajustada pela incidência do período pré-vacinal. Não foi observada diferença entre as incidências ($p=0,612$) entre os grupos vacina, controle e recusa, apesar da incidência da área vacinada ter sido inferior.

Tabela 12: Incidência média anual (por 1.000 habitantes) no período pré e pós-vacinal de acordo com grupo populacional: vacina, placebo e recusa.

Grupos	Número de áreas	Período pré-vacinal*			Período pós-vacinal**		
		Número de casos	Incidência Média (%)	SD	Número de casos	Incidência Média (%)	SD
Vacina	50	111	3,93	18,63	1	0,16	1,11
Placebo	58	106	1,63	2,95	9	0,57	2,00
Recusa	-	-	-	-	9	1,00	6,70
Total	108	217	2,70	12,84	19	0,69	5,08
P value			0,357			0,612	

* Grupo recusa foi excluído da análise calculada para o período de 18 anos (1985 a 2002).

** Incidência pós-vacinal ajustada pela incidência pré-vacinal

A figura 9 mostra a distribuição dos casos de LTA de acordo o ano calendário de diagnóstico dos casos. O número de casos diagnosticados apresentou uma variação cíclica antes do período de vacinação em ambas as áreas. Uma redução de casos foi observada na área vacinada ($n=1$) em relação a área controle ($n=9$) ou entre o grupo de indivíduos que recusaram ($n=9$) em quatro anos de seguimento.

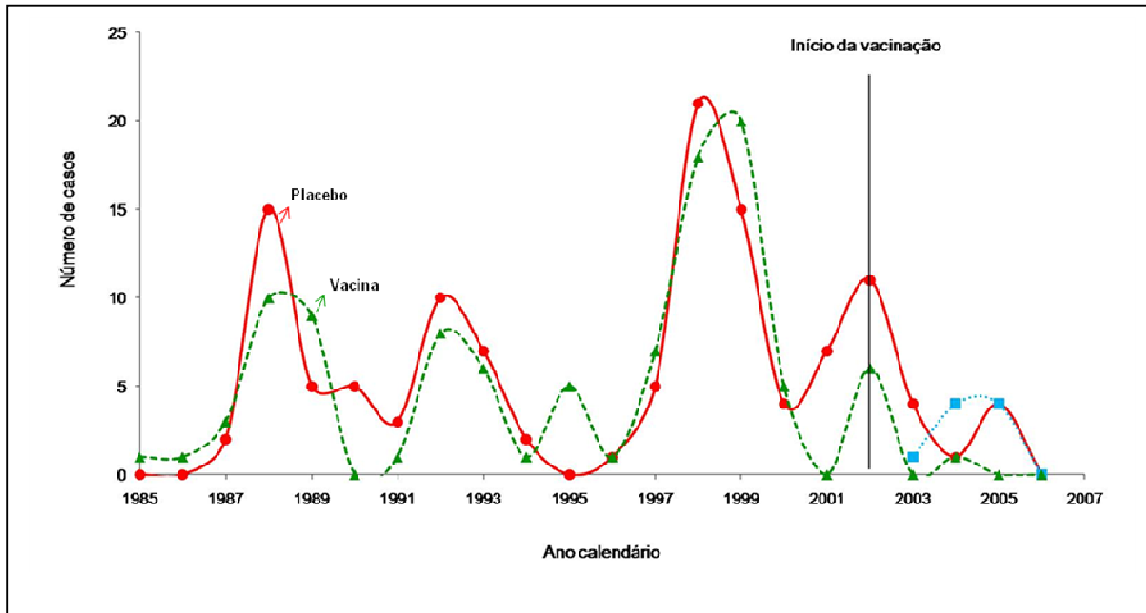


Figura 9: Número de casos de acordo a área selecionada a receber vacina (---▲---) ou placebo (—●—) e entre aqueles indivíduos que recusaram (---■---) a participação no Ensaio Comunitário, realizado na microrregião de Caratinga, 1985-2007.

6.5 – Eficácia da vacina anti-LTA Mayrink e cols (1979) observada no Ensaio Comunitário

Na tabela 13 estão apresentados os dados utilizados para o cálculo da taxa de eficácia vacinal global para os resultados observados neste Ensaio Comunitário. A eficácia observada foi de 90,4% para a vacina anti-LTA Mayrink e cols. (1979), com um amplo intervalo de confiança de 28,5 a 98,7, em função do pequeno número de casos ocorridos nestas áreas geográficas nesta série temporal de cinco anos.

Tabela 13: Cálculo da eficácia da vacina anti-LTA Mayrink e cols. (1979)

Grupos	LTA		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Vacina	1	3.026	3.027
Placebo/Recusa*	18	5.186	5.204
TOTAL	19	8.212	8.231

$$X^2_{gl_1} = 6,83; p = 0,008$$

* Os grupos placebo e recusa foram agrupados para o cálculo da eficácia vacinal.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho realizado na microrregião de Caratinga, a LTA ocorreu em picos, com uma forte evidência da variação anual durante as três últimas décadas até o início da campanha de vacinação, em 2002. Resultados semelhantes foram observados por MAYRINK et al. (1979) e por MACHADO-COELHO et al. (1999). Após este período foi observada uma tendência de redução da incidência de LTA nas áreas geográficas cuja população recebeu somente a vacina, em contraste com o observado nas áreas controle (população que recebeu somente o placebo). Entretanto, em ambas as áreas os casos de LTA continuaram acontecendo, mas nas áreas de vacina só entre os indivíduos que recusaram participar do ensaio comunitário.

Através das análises dos casos de LTA pregressa e da IDRM de triagem reativa na população recenseada, observou-se que a ocorrência da doença não apresenta diferença no acometimento dos sexos, demonstrando indiretamente que tanto homens quanto mulheres apresentam um mesmo padrão de exposição. Isto se deve as características peculiares de trabalho apresentadas na região onde ambos os sexos trabalham em atividades agro-pastoris, conforme já havia sido demonstrado por MAYRINK et al. (1979) e MACHADO-COELHO et al. (1999).

A proporção de indivíduos que recusaram participar do ensaio comunitário foi homogênea em ambos os grupos (vacina e placebo), e também segundo o sexo e faixa etária. A taxa de recusa também foi homogênea segundo a área geográfica, exceto para o município de Córrego Novo, onde o índice de recusa foi muito alto. Portanto, esperar-se-ia que nas localidades desta área geográfica a taxa de proteção vacinal fosse menor. Entretanto, como ainda não houve registros de casos da doença nestas áreas, pode-se suspeitar que Córrego Novo seja uma área de baixa incidência. Os dados do Sistema de Informação de Leishmaniose do Ambulatório Dr. Paulo Magalhães demonstram uma taxa de incidência realmente muito baixa, menor que nas demais áreas.

A característica apresentada pela LTA nesta região, onde a incidência da doença ocorre em forma de surtos epidêmicos focais - com aglomerados de casos no tempo e espaço – demonstra que cada área contribui de forma diferenciada em momentos diferentes para as taxas globais do município, como observado por MACHADO-COELHO et al. (1999) – o que poderia estar ocorrendo em Córrego Novo, naquele momento. Outros autores também observaram essa flutuação de casos no tempo e no espaço. CONVIT (1993), na Venezuela, observou que a LTA ocorria na forma de surtos epidêmicos com picos de ocorrência de casos de 3 a 4 anos. Fato semelhante foi observado por SHERLOCK et al. (1996) para a leishmaniose visceral na Bahia, onde a doença também acontece na forma de aglomerados de casos de 10 em 10 anos aproximadamente.

Os resultados encontrados na redução da incidência da LTA foram concordantes com os estudos de MAYRINK et al. (1978, 1979, 1985, 1986, 1990) e ANTUNES et al. (1986) realizados com a vacina multi-cepa. Mas discordantes dos resultados obtidos por ARMIJOS et al. (2004) no Equador e por VÉLEZ et al. (2005) na Colômbia com a vacina mono-cepa.

Alguns fatores poderiam explicar estas diferenças. Inicialmente é necessário enfatizar as metodologias diferentes utilizadas por estes autores. No Equador, ARMIJOS et al. (2004) usou uma vacina autoclavada de baixa imunogenicidade. Segundo DE LUCA et al. (1999), as vacinas autoclavadas apresentam uma taxa de conversão da IDRM significativamente menor (53%) que as vacinas não autoclavadas (83%). Já, os autores brasileiros utilizaram vacinas não autoclavadas conservadas em merthiolate (MAYRINK et al., 1978, 1979, 1985, 1986; ANTUNES et al., 1986). Na Colômbia, VÉLEZ et al. (2005) não considerou a conversão da IDRM 60 dias após a vacinação para a determinação da eficácia da vacina. De acordo ANTUNES et al. (1986) a vacina multi-cepa de leishmania morta sem adjuvante (Leishvacin®) conferia uma proteção somente entre aqueles que

tinham uma resposta imune adequada para a vacina medida através da conversão da IDRМ após a vacinação. Apesar do cuidado de VÉLEZ et al. (2005), em controlar a exposição usando um grupo controle, a IDRМ só foi realizada um ano após a vacinação, não podendo portanto ser levada em consideração para a análise da eficácia, porque outros fatores como a exposição diferenciada do indivíduo ao parasita poderia explicar a conversão desta IDRМ.

A prevalência das espécies de *leishmania* nos países também poderia explicar a diferença de eficácia observada entre os autores. A maioria dos casos de LTA na Colômbia são devido a *L. panamensis* (CORREDOR et al., 1990; SARAVIA et al., 2002), no Equador são devido a *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. braziliensis* (ARMIJOS et al., 1997) e no Brasil são devido a *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Entretanto, a diferença na prevalência destes agentes etiológicos nestas regiões é a explicação mais frágil para a discordância encontrada entre os autores. VÉLEZ et al. (2000) usando a mesma preparação vacinal observou que quando células mononucleares isoladas de indivíduos vacinados eram cultivadas na presença de antígenos de *L. panamensis*, estas proliferavam e produziam interferon-gama. Resultados similares foram observados em um estudo realizado no Brasil onde os indivíduos que recebiam a mesma vacina apresentavam uma resposta imune Th1 após estimulação com antígenos de *L. braziliensis* (DE LUCA et al., 2001). Estes achados demonstram a possibilidade da existência do desenvolvimento de uma resposta imune cruzada conferida entre diferentes espécies de *leishmania* (LIMA et al., 1999). Entretanto, SILVEIRA et al. (1984) registrando um caso de leishmaniose cutânea mista (*Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*) isoladas de lesões distintas de um mesmo paciente questiona a existência da imunidade cruzada. Outros autores também têm demonstrado a inexistência desta proteção cruzada entre espécies do complexo *Leishmania* e a do Complexo Viannia (LAINSON, 1981; BRASIL, 2000).

Um fator normalmente negligenciado nos desenhos dos ensaios clínicos são os diferentes estados nutricionais apresentados pela população. Evidências clínicas e epidemiológicas sugerem que a deficiência nutricional propicia um alto risco para infecções, relacionado a uma resposta imune deficiente (CHANDRA, 1997). Recentemente, ARAÚJO et al. (2007) observou que indivíduos com deficiência de selênio apresentavam uma conversão mais baixa da IDRM após o recebimento da vacina anti-LTA em comparação aos indivíduos que apresentaram níveis mais elevados deste elemento traço. Os elementos traço apresentam uma relação importante no desenvolvimento da imunidade inata e adaptativa, atuando na produção, maturação e função de células dos mecanismos de defesa do organismo, como macrófagos, células “*natural killer*” (NK) e neutrófilos, na imunidade inata e células B e T, na adaptativa (ERICKSON et al., 2000; IBS & RINK, 2003). Portanto, a deficiência nutricional é um fator limitante para a formulação da resposta imune efetiva após o recebimento da vacina, podendo então induzir a uma baixa proteção vacinal e conseqüentemente a uma baixa eficácia (WEIGLE et al., 1995; GIRODON et al., 1999; KEMP et al., 2002; FARYADI & MOHEBALI, 2003).

Outro fator que poderia explicar a diferença de resultados observados por estes autores é que ambos, ANTUNES et al. (1986), no Brasil, e, VÉLEZ et al. (2005), na Colômbia, realizaram os ensaios em indivíduos jovens em operação militar na floresta amazônica. Entretanto, ao contrário dos brasileiros, os colombianos participam ativamente de operações de guerra durante os ensaios. Alguns autores avaliando a imunidade de soldados que se encontravam em operações militares no Oriente Médio demonstraram uma redução da resposta imune (PERSHIN et al., 1994; HOGE et al., 2004). PERSHIN et al. (1994), comparando a imunidade entre os grupos: I) 450 soldados em operação no Afeganistão, II) 850 pessoas destinadas ao serviço caseiro e III) 578 estudantes de uma escola vocacional, observaram que os distúrbios imunológicos (imunossupressão), tanto

humoral quanto celular, foram maiores no grupo de soldados que se encontravam em operação militar e sob stress da guerra.

Desta forma, uma possível explicação para a baixa da imunidade apresentada pelos colombianos seria a deficiência nutricional e o stress provocado pela guerrilha, isto poderia resultar numa redução da taxa de conversão da IDRM e conseqüentemente induzir a uma baixa efetividade da vacina neste país (VÉLEZ et al., 2005). Ao contrário do observado neste estudo, realizado em soldados em atividades de guerra, outro estudo realizado pelos mesmos autores (VÉLEZ et al., 2000), em estudantes da Universidade de Antioquia e militares colombianos fora da área de operação de guerra, demonstrou uma alta imunogenicidade da vacina, com taxa de conversão de 87,3%. Portanto, deve-se questionar a comparabilidade destes estudos em relação à eficácia vacinal.

A manutenção da ocorrência dos casos de LTA nas áreas vacinadas deve-se fundamentalmente a presença de indivíduos não vacinados nestas áreas. Há fortes evidências de que, após uma infecção clinicamente aparente, a grande maioria dos indivíduos tratados adquire resistência permanente (WEIGLE & SARAVIA, 1996). Entretanto, na América Latina, este fenômeno não induz a uma imunidade de grupo, isto é, imunidade populacional, pois os indivíduos não vacinados não estão protegidos pela alta cobertura vacinal da população. Ao contrário do que acontece com a infecção provocada pela *Leishmania tropica* no Afeganistão, onde o padrão de transmissão é o antrópico, cujo homem é o único reservatório e o responsável pela manutenção do ciclo (KILLICK-KENDRICK et al. 1995; HEWITT et al., 1998; REITHINGER et al., 2003, KOLACZINSKI et al., 2004). No Novo Mundo os padrões de transmissão são enzoonticos, portanto, além do envolvimento do homem, animais silvestres também estão relacionados com a cadeia de transmissão da leishmaniose. A participação dos animais silvestres no ciclo (enzoontico) de transmissão da doença, como reservatórios,

impossibilita a ocorrência da imunidade de grupo, pois permite que o vetor continue perpetuando seu ciclo nestas espécies e infectando o homem ocasionalmente (LAINSON et al., 1981, 1985). Desta forma, é interessante observar que a tendência da ocorrência da LTA entre os indivíduos que recusaram a participar do ensaio foi similar à ocorrência no grupo controle (placebo), confirmando a ausência do efeito deste fenômeno na proteção contra as leishmanioses americanas.

A diminuição da capacidade protetora da vacina ao longo do tempo também poderia explicar a manutenção destes casos nestas áreas. Recentemente, ARMIJOS et al. (2003) observaram uma variação na taxa de proteção em diferentes momentos de seguimento de indivíduos vacinados e placebos. Eles realizaram um estudo controlado duplo cego e randomizado com uma vacina bruta de promastigotas mortas mais o adjuvante bacilo Calmette-Guerin (BCG), em crianças equatorianas. Eles observaram que a redução inicialmente significativa na incidência de LTA no grupo vacinado grupo comparado ao grupo que recebeu somente o BCG, durante os primeiros 13 a 18 meses, deixou de existir após o período de 24 a 60 meses. Os autores sugerem, portanto, que uma administração periódica de um *booster* poderia ser necessária para a manutenção da proteção contra a LTA.

A pequena força de infecção associada à baixa densidade vetorial e conseqüentemente a um baixo poder infectante, poderia explicar as diferenças de resultados entre as áreas amazônicas e as áreas montanhosas do sudeste brasileiro. As espécies *L. whitmani*, *L. intermedia* e *L. migonei* são considerados as principais espécies envolvidas na transmissão de LTA no Brasil (LAINSON et al., 1985). Nas áreas de estudo de Bom Jesus do Galho, Córrego Novo e Caratinga a principal espécie encontrada foi a *L. whitmani*. A *L. intermedia* foi a espécie mais prevalente nas áreas do município de Ubaporanga e *L. migonei* foi a terceira espécie mais prevalente no município de Caratinga (RESENDE,

2004). As espécies encontradas durante este estudo foram concordantes com os trabalhos realizados por MAYRINK et al. (1979) nesta mesma área. O envolvimento destas espécies como possíveis transmissoras de LTA estão de acordo com os critérios estabelecidos por KILLICK-KENDRICK e WARD (1981) e KILLICK-KENDRICK (1990) em definir a competência vetorial dos flebotomíneos na transmissão da doença, no qual se avalia as características antropofílicas, a distribuição do vetor e da doença e o potencial infectante do vetor.

Finalmente é necessário considerar algumas limitações do nosso estudo. A primeira limitação foi a baixa incidência da LTA que reduziu o poder do estudo, dificultando a observação de uma queda mais abrupta na tendência temporal entre o grupo vacinado e o grupo placebo. Foi observado na série temporal pós-vacinação apenas 19 casos de LTA na população elegível; os outros sete casos foram um de forma mucosa, outro de forma cutâneo-mucosa, um caso LC em uma criança de três meses de idade, dois casos de LC em idosos com mais de 74 anos e mais dois casos de LC em indivíduos que apresentavam IDRMs naturalmente positiva. Portanto, excluídos do ensaio por não preencherem os critérios de elegibilidade definida para o ensaio. Apesar de ser esperado uma variação cíclica da doença, é interessante observar que mesmo nesta curta série temporal (cinco anos de seguimento) – em vista de ser atualmente uma área de baixa endemicidade - já se observa uma redução da doença entre os vacinados. Infelizmente, frente ao pequeno número de casos, apesar de significativa ($p=0,008$) taxa de eficácia (90,4%), o intervalo de confiança foi amplo (28,5 a 98,7). Portanto, é fundamental o acompanhamento destas três coortes (grupo vacinado, grupo placebo e grupo recusa) por um período de tempo mais longo para uma melhor determinação da tendência futura do número de casos de leishmanioses nestas áreas da microrregião de Caratinga.

O grande número de indivíduos que recusaram a participar do ensaio em algumas áreas foi o segundo fator limitante. O elevado percentual de recusa apresentado nas áreas do município de Córrego Novo pode ser explicado pela simples desinformação da população em relação à doença ou pode evidenciar também que o risco de contrair a doença nesta área é baixo. Portanto, espera-se, logicamente, que a vacina apresente uma menor efetividade na redução das taxas da doença nestas áreas. No entanto, é importante destacar que este Ensaio Comunitário não apresentou diferença nas proporções de indivíduos vacinados e placebos em ambos os sexos e nas diferentes faixas etárias. Em relação à diferença nas proporções de vacinados e placebos em relação às áreas geográficas, estas só foram significativamente diferentes nos municípios de Bom Jesus do Galho, Dom Lara e Córrego Novo. O predomínio do grupo placebo nas áreas de Bom Jesus do Galho e Córrego Novo e do grupo vacinal na área de Dom Lara, deve-se a uma elevada diferença populacional apresentada por algumas localidades situadas dentro destas áreas. Isto é, grandes agrupamentos populacionais nas áreas urbanas em relação às áreas rurais. Entretanto, quando se avalia a distribuição total da população entre os grupos vacinados e placebos observa-se que o estudo foi homogêneo.

Portanto, apesar destas limitações, inerentes à um ensaio comunitário realizado em área de baixa a média endemicidade, este ensaio trás uma nova esperança assim como um estímulo para a busca de novas formulações vacinais, a fim de aumentar a eficácia vacinal. Isto contribuirá para o controle desta doença que vem ao longo de décadas afligindo as populações rurais de nosso Estado e das Américas.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- 1) A incidência da LTA foi semelhante em homens e mulheres.
- 2) Os grupos avaliados (vacina e placebo) no ensaio comunitário apresentaram-se homogêneos em relação ao sexo e idade.
- 3) A recusa do estudo foi homogênea segundo o sexo e a faixa etária em todas as áreas do estudo.
- 4) As áreas trabalhadas do município de Córrego Novo foram as que apresentaram o maior índice de recusa, portanto, espera-se uma menor efetividade da vacina nestas áreas.
- 5) Na série temporal observada neste ensaio comunitário a vacina anti-LTA Mayrink e cols. (1979) revelou uma tendência a reduzir a incidência de casos da doença.
- 6) A proteção conferida pela vacina foi de 90,4% com diferença significativa de casos de LTA entre o grupo vacinado e o placebo.
- 7) A ausência do fenômeno de imunidade em grupo impediu uma maior redução nas taxas de incidência para a leishmaniose cutânea americana nas áreas do estudo que receberam vacina.

9. RECOMENDAÇÕES

Os resultados deste estudo permitem a formulação das seguintes recomendações:

- (1) Aumentar o tempo de seguimento das populações das áreas selecionadas para participarem deste Ensaio Comunitário, em vista da baixa incidência da doença e conseqüentemente pequeno número de casos.
- (2) Realizar um ensaio quase experimental nas áreas endêmicas do Vale do Rio Doce que não foram contempladas neste ensaio comunitário, a fim de reduzir as taxas de incidência da leishmaniose nesta região.

10. ANEXOS

ANEXO 1



Figura 1: Registro dos pacientes com LTA diagnosticados no Ambulatório Paulo Araújo Magalhães, da UDS-Caratinga, no SIL (Sistema de Informação de Leishmaniose), na plataforma ACESS.

ANEXO 3

Tabela 2: Planilha de anotação das coordenadas geodésicas dos domicílios (GPS).

Data: ___/___/___

Folha: ___/___

Município: _____

Localidade: _____

Categoria: _____ **RG:** _____

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Casa:
Datun: K:
Coord X:
Coord Y:
Elevação:

Responsável pelo Boletim: _____

Órgão: _____

ANEXO 4

Laboratório de Epidemiologia - Escola de Farmácia – UFOP
Laboratório de Leishmaniose - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto:

“Estudo do Impacto da vacina anti-LTA sobre a incidência da leishmaniose tegumentar americana em Caratinga, MG: ensaio comunitário”

Descrição do projeto de pesquisa

OBJETIVO:

Objetivando estudar o impacto da vacina anti-LTA no coeficiente de detecção de casos da doença ao nível de setor censitário, será realizado um ensaio comunitário. Você foi selecionado a participar deste estudo porque mora em área em que há casos de leishmaniose cutânea e a evidências de que você ainda nunca foi exposto a doença.

É importante ressaltar que a vacina que está sendo estudada já foi aplicada em dezenas de outras pessoas e demonstrou ser segura. Não existe risco de adquirir a doença através da vacina.

PROCEDIMENTOS:

Na maioria dos estudos em que envolvem avaliação de vacina nós precisamos comparar dois grupos de pessoas: um grupo que recebe a vacina e o outro que não recebe a vacina, mas um placebo. É isto que será feito neste estudo. Se concordar em participar do estudo, você será sorteado para receber a vacina ou o placebo (substância que é usada para conservar a vacina). Você receberá duas doses de vacina ou placebo que serão administrados em injeções por via intramuscular a intervalos de 21 dias. Você e as pessoas que lhe administrarão as injeções não saberão em que grupo você está (vacina ou placebo) até que termine o estudo.

Antes de vacinar será realizado um teste cutâneo (IDRM) para certificarmos de que você não teve contato prévio com a doença.

Você será acompanhado durante toda etapa do estudo pelo pessoal responsável pelo estudo até completar a vacinação.

RISCOS/DESCONFORTOS:

A vacina teve sua segurança avaliada em mais de 3.000 voluntários em diversos testes clínicos. Discreta dor no local da injeção foi a única reação relatada. Esta é uma reação comum que ocorre após a administração de outras vacinas, é de curta duração, não interfere com as atividades habituais do vacinado e desaparece sem tratamento específico. Qualquer reação resultante da inoculação da vacina será devidamente avaliada e tratada pela equipe de pesquisadores envolvidos no projeto sem despesas para os participantes.

BENEFÍCIOS:

Não há nenhum benefício direto para sua participação. Porém, esperamos que este estudo ajude-nos a entender melhor o funcionamento do sistema imunológico de pessoas vacinadas, o que levará ao desenvolvimento de vacina eficaz na prevenção de leishmaniose, beneficiando milhares de pessoas em todo o mundo.

PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS:

Sua participação é completamente voluntária. Você pode desistir de participar a qualquer momento.

Você pode perguntar ao investigador principal mencionado abaixo, qualquer questão relacionada ao estudo. Os pesquisadores se comprometem a proporcionar informação atualizada durante o estudo.

CONFIDENCIALIDADE

Toda informação obtida sobre você será mantida em poder do pesquisador principal. Apenas pessoas envolvidas no estudo terão acesso a estas informações. Dados de

ANEXO 5

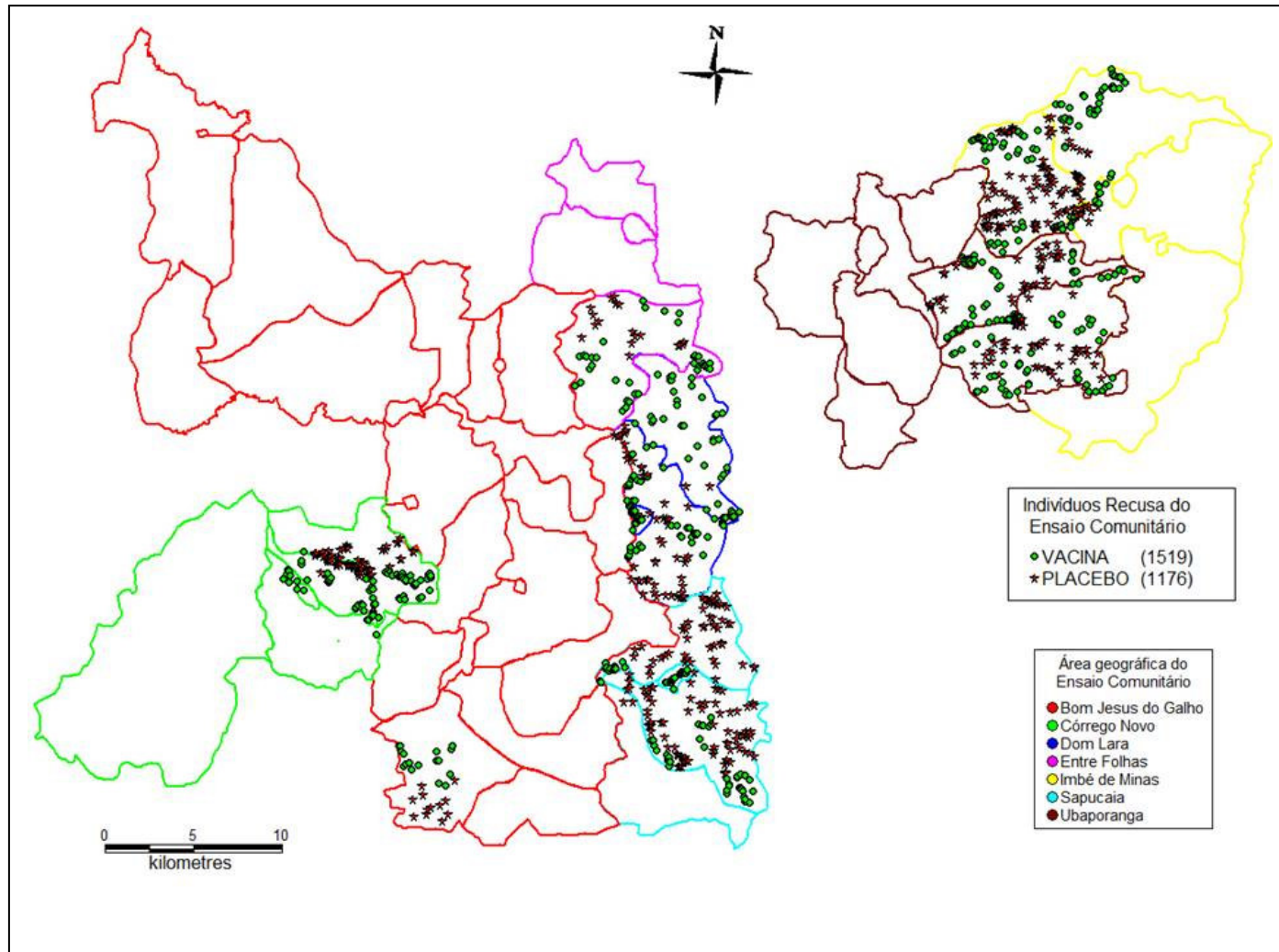


Figura 2: Distribuição geográfica do grupo recusa segundo o tipo de vacina e as áreas geográficas da microrregião de Caratinga pré-selecionadas para realização do ensaio comunitário, 2002-2007.

ANEXO 6

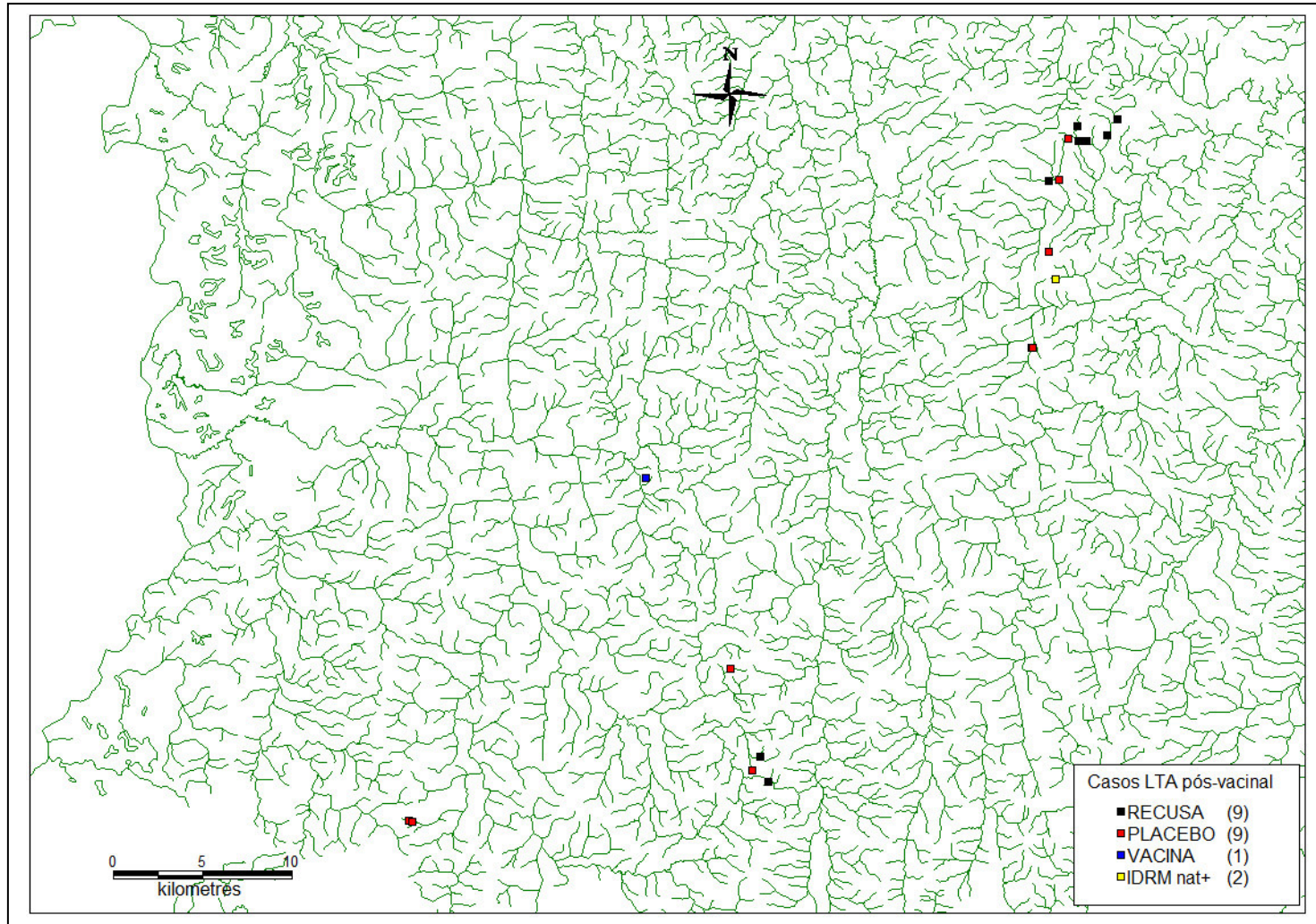


Figura 3: Casos de LTA pós-vacinal segundo os grupos: Recusa, Placebo, Vacina e IDRМ Naturalmente positivo e a hidrografia (córregos) das áreas de estudo.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramson, M.A.; Dietze, R.; Frucht, D.M.; Schwantz, R.; Kenney, R.T. 1995. Comparison of New and Old World leishmaniasis in an endemic region of Brazil. *Clinical Infectious Disease*. 20, 1292-1297.
- Afonso, L.C.; Scott, P. 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*. 61(7), 2952-2959.
- Afonso, L.C.C.; Scharon, T.M.; Vieira, L.Q.; Wysocka, M.; Trinchieri, G.; Scott, P. 1994. The adjuvant effect of Interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. 263, 235-237.
- Aguilar, C.M.; Rangel, E.F.; Grimaldi, F.G.; Momen, H. 1987. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania Leishmania braziliensis* in endemic area in the state of Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 82(1), 143.
- Aguilar, C.M.; Rangel, E.F.; Garcia, L.; Fernandez, E.; Momen, H.; Grimaldi, G.; Vargas, Z. 1989. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 84(1), 19-28.
- Alexander, J.B. 1987. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: *Psychodidae*) in a Colombian coffee plantation. *Journal of Medicine and Entomology*. 24, 552-558.
- Alexander, J. Leishmaniasis. 1989. The current status and new strategies for control. New York, Plenum Press.
- Alexander, B.; Young, D.G. 1992. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: *Psychodidae*) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87, 123-130.

- Alexander, B.; Oliveria, E.B.; Haigh, E.; Almeida, L.L. 2002. Transmission of *Leishmania* in Coffee Plantations of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(5), 627-630.
- Andrade, Z.A.; Reed, S.G.; Roters, S.B. 1984. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Pathology*. 144, 137-148.
- Andrade, M.S.; Brito, M.E.F.; da Silva, S.T.; Lima, B.S.; Almeida, E.L.; Albuquerque, E.L.; Júnior, J.F.M.; Ishikawa, E.; Cupolillo, E.; Brandão-Filho, S.P. 2005. Leishmaniose tegumentar Americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 38(3), 229-233.
- Andresen, K.; Gaafar, A.; El-Hassan, A.M.; Ismail, A.; Dafalla, M.; Theander, T.G. 1996. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *leishmania major* a lesions. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 90, 133-135.
- Antunes, C.M.; Mayrink, W.; Magalhães, P.A.; Costa, C.A.; Melo, M.N.; Dias, M.; Michalick, M.S.; Williams, P.; Lima, A.O.; Vieira, J.B. 1986. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Epidemiology*. 15(3), 572-580.
- Araújo, A.P.; Rocha, O.G. F; Mayrink, W.; Machado-Coelho, G.L.L. 2007. The influence of copper, selenium and zinc on the response to the Montenegro skin test in subjects vaccinated against American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (in press).
- Araújo-Filho, N.A. 1978. *Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Ilha Grande, Rio Janeiro. Estudos da infecção humana, reservatórios e transmissores. Tese de Mestrado (Universidade Federal do Rio de Janeiro), Rio Janeiro: ENESP.*

- Arias, J.; Beltrán, F.; Desjeux, P.; Walton, B. 1996. Epidemiologia y control de la Leishmaniasis em las Américas, por pais o territorio. Washington, DC, Organização Panamericana de Saúde, cuardeno técnico 44.
- Armijos, R.X.; Weigel, M.M.; Izurieta, R.; Racines, J.; Zurita, C.; Herrera, W.; Veja, M. 1997. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador. *Tropical Medicine and International Health*. 2 (2), 140-152.
- Armijos, R.X.; Weigel, M.M.; Aviles, H.; Maldonado, R.; Racines, J. 1998. Field trial of vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at risk child population: safety, immunogenicity and efficacy during the first 12 months of follow up. *The Journal of Infectious Diseases*. 177, 1352-1357.
- Armijos, R.X.; Weigel, M.M.; Romero, L.; Garcia, V.; Salazar, J. 2003. Field Trial of a Vaccine against New World Cutaneous Leishmaniasis in an At-Risk Child Population: How Long Does Protection Last? *The Journal of Infectious Diseases*. 187, 1959-1961.
- Armijos, R.X.; Weigel M.M.; Calvopina M.; Hidalgo, A.; Cevallos, W.; Correa, J. 2004. Safety, immunogenecity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 22, 1320-1326.
- Áviles, H.; Belli, A.; Armijos, R.; Monroy, FP.; Harris, E. 1999. PCR detection and identification of *leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical methods. *Journal of Parasitology*. 85, 181-187.
- Awasthi, A.; Mathur, R.K.; Saha, B. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*. 119(6), 238-258.

- Basano, S.A.; Camargo, L.M.A. 2004. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Revista brasileira de epidemiologia*. 7(3), 328-337.
- Barbosa, F.S.; Mello, D.; Coura, J.R. 1970. Nota sobre a infecção natural de roedores por *Leishmania* sp nos limites dos municípios Teresópolis-Nova Friburgo, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. IV (2), 113-115.
- Barral, A.; Pedral-Sampaio, D.; Grimaldi Jr, G.; Momem, H.; McMahon-Pratt, D.; Ribeiro-de-Jesus, A.; Almeida, R.; Badaró, R.; Barral-Neto, M.; Carvalho, E.M.; Johnson Jr, R.D. 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical diseases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 44(5), 536-546.
- Barros, G.C.; Sessa, P.A.; Mattos, E.A.; Carias, V.R.D.; Mayrink, W.; Alencar, J.T.A.; Falqueto, A.; Jesus, A.C. 1985. Foco de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista de Saúde Publica*. 19, 146-153.
- Berman, J.D. 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*. 24(4), 684-703.
- Bittencourt, A.; Barral, A.; Jesus, A.R.; Almeida, R.P.; Grimaldi Jr. G. 1989. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 84(4), 585-586.
- Borges, V.C.; Ruiz, M.C.M.; Gomes, P.M.; Colombo, A.R.; Silva, L.A.; Romero, H.D.; Prata, A. 2002. Montenegro intradermoreaction after the test sequential

- repetitions in Porteirinha, Minas Gerais State, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36 (2), 249-251.
- Brandão-Filho, S.P.; Campbell-Lendrum, D.; Brito, M.E.; Shaw, J.J.; Davies, C.R. 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 93, 488-494.
- Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Guia de vigilância epidemiológica. 4ed Brasília, 1998.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2000. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Segunda Edição, Brasília-DF, 1-162.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2004. Informações disponíveis em Portal da Saúde: [HTTP://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22151](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22151).
- Brasil. Ministério da Saúde. 2006. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana e Diagnóstico Clínico e Diferencial. Primeira Edição, Brasília-DF, 1-136.
- Brujin, M.H.L.; Barker, D.C. 1992. Diagnosis of New World Leishmaniasis: specific detection of species of the *L. braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, 52, 45-58.
- Camargo-Neves, V.L.F.; Gomes, A.C.; Antunes, J.L.F. 2002. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera *Psychodidae*) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(4), 299-306.
- Campbell-Lendrum, D.; Dujardin, J.P.; Martinez, E.; Feliciangeli, M.D.; Perez, J.E.; Silans, L.N.; Desjeux, P. 2001. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96, 159-162.

- Carvalho, E.M.; Johnson, W.; Barreto, N.; Marsden, P.D.; Costa, J.L.M.; Reed, S.; Rocha, H. 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journal of the Immunology*. 135, 4144–4148.
- Castes, M.; Blackwell, J.; Trujillo, D.; Formica, S.; Cabrera, M.; Zornilha, G.; Rodas, A.; Castellanos, PI.; Convit, J. 1994. Immune response in healthy volunteers vaccinated with killed leishmanial promastigotas plus BCG. Skin test reactivit, T cell proliferaion and interferon gamma production. *Vaccine*. 12, 1041-1051.
- Castro, EA.; Luz, E.; Telles, F.Q.; Pandey, A.; Biseto, A.; Dinaiski, M.; Sbalqueiro, I.; Thomaz-Soccol, V. 2005. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Amercam cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Ata tropica*. 93, 141-149.
- Castro, E.A.; Thomaz-Soccol, V.; Augur, C.; Luz, E. 2007. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). *Exp Parasitol*. Article in Press.
- Chandra, R.K. 1997. Nutrition and the immune system: an introduction. *American Journal of Clinical Nutrition*. 66, 460S-463S.
- Chiari, A.C.; Mayrink, W.; Magalhães, P.A. 1973. Reação de imunofluorescência no controle do tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 15, 298-303.
- Chiller, T.M.; Samudio, M.A.; Zoulek, G. 1990. IgG antibody reactivity with *Trypanossoma cruzi* and *leishmania* antigens in sera of patients with Chagas disease and leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 41, 250-256.
- Convit, J.; Castelhanos, PL.; Ulrich, M.; Castes, M.; Rondon, A.; Pinardi, M.E.; Rodriguez, N.; Bloom, B.R.; Fórmica, S.; Valecillos, L.; Bretana, A. 1989.

Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*. 160(1), 104-115.

Convit, J.; Ulrich, M.; Fernandez, C.T.; Tapia, F.J.; Cáceres-Dittmar, G.; Cástes, M.; Rondon, A.J. 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 87, 444-448

Convit, J. 1996. Leishmaniasis: Immunological and clinical aspects and vaccines in Venezuela. *Clinics in Dermatology*. 14, 479-487.

Coffman, R.L.; Carty, J. 1986. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *The Journal of Immunology*. 136(3), 949-954.

Corredor, A.; Kreutzer, R.D.; Tesh, R.B.; Boshell, J.; Palau, M.T.; Caceres, E.; Duque, S.; Pelaez, D.; Rodriguez, G.; Nichols, S.; Hernandez, C.A.; Morales, A.; Young, D.G.; De Carrasquilla, C.F. 1990. Distribution and Etiology of Leishmaniasis in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42(3), 206-214.

Coura, J.R.; Galvão-Castro, B.; Grimaldi Jr, G. 1987. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 82(4), 581-582.

Coutinho, S.G.; Oliveira, M.P.; Da-Cruz, A.M.; De Luca, P.M.; Mendonça, S.C.F.; Bertho, A.L.; Soong, L.; McMahon-Pratt, D. 1996. T-Cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to Purified *Leishmania pifanoi* Amastigote Antigens and *Leishmania braziliensis* Promastigote Antigens: Immunologic Patterns Associated with Cure. *Experimental Parasitology*. 84(2), 144-155.

- Cuba-Cuba, C.A.; Marsden, P.D.; Barretto, A.C.; Jones, T.C.; Richards, F. 1985. The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed-hypersensitivity in American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 18, 231-236.
- Cunningham, A.C. 2002. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*. 72, 132–141.
- Da-Costa, C.A.; de Toledo, V.P.; Genaro, O.; Williams, P.; Mayrink, W. 1996. Montenegro skin test-evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 91, 193-194.
- Davies, C.R.; Llanos-Cuentas, E.A.; Sharp, S.J.; Canales, J.; Leosn, E.; Alvarez, E.; Roncal, N.; Dye, C. 1997. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms, response to treatment, and parasite isolation rate. *Clinical Infectious Diseases*. 25(2), 302-310.
- Da-Cruz, A.; Conceição-Silva, F.; Bertho, A.L.; Coutinho, S.G. 1994. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 62, 2614-2618.
- Dedet, J.P. 1993. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Annals do Institute Pasteur*. 4(3), 25.
- De Luca, P.M.; Mayrink, W.; Alves, C.R.; Coutinho, S.G.; Oliveira, M.P.; Bertho, A.L.; Toledo, V.P.; Costa, C.A.; Genaro, O.; Mendonça, S.C.F. 1999. Evaluation of stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparation of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*. 17, 1179–85.
- De Luca, P.M.; Mayrink, W.; Pinto, J.A.; Coutinho, S.G.; Santiago, M.A., Toledo, V.P., Costa, C.A., Genaro, O., Reis, A.B., Mendonça, S.C.F., 2001. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a

candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Tropica*. 80, 251-260.

De Luca, P.M.; Mayrink, W.; Santiago, M.A.; Conceição-Silva, F.; Mélo, G.; Mendonça, S.C.F. 2003. Randomized, double-blind, placebo-controlled study on the immunogenicity of the leishmanin skin test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 97, 709-712.

Descoteaux, A.; Turco, S. J. 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*. 1455, 341-352.

Desjeux, P. 1992. Human leishmaniasis : epidemiology and public health aspects. *World Health Statistics Annual (WHO)*. 45(2/3), 267-275.

Desjeux, P., 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol*. 14, 417-423.

Desjeux, P., 2001. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med. Microbiol Immunol*. 190, 77-79.

Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27 (5), 305-318.

Dias, E.S.; França-Silva, J.C.; Silva, J.C.; Monteiro, É.M.; de Paula, K.M.; Gonçalves, C.M.; Barata, R.A. 2007. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(1), 49-52.

Dias, M.; Mayrink, W.; Deane, L.M.; Costa, C.A.; Magalhães, P.A.; Melo, M.N.; Batista, S.M.; Araújo, F.G.; Coelho, M.V.; Willians, P. 1977. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana. I - Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 19(6), 403-410.

- Dias-Lima, A.; Bermúdez, E.C.; Medeiros, J.F.; Sherlock, I. 2002. Estratificação vertical da fauna de flebótomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*. 18(30) Rio de Janeiro.
- Dowlati, Y. 1996. Cutaneous Leishmaniasis: Clinical Aspects. *Clinics in Dermatology*. 14, 425-431.
- Erickson, K.L., Medina, E.A., Hubbard, N.E., 2000. Micronutrients and innate immunity. *Journal Infectious Diseases*. 182 (suppl 1), S5-10.
- Etges, R.; Muller, I. 1998. Progressive disease or protective immunity to *leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. *Journal of Molecular Medicine*. 76, 372-390.
- Faber, W.R.; Oskam, L.; Gool, T.V.; Kroon, N.C.M.; Knecht-Junk, K.J.; Hofwegwn, H.; Van der Wal, A.C.; Kager, P.A. 2003. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 49(1), 70-74.
- Falqueto, A.; Coura, J.R.; Barros, G.C.; Grimaldi JR. G.; Sessa, P.A.; Carias, V.R.D.; Jesus, A.C.; Alencar, J.T.A. 1986. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 81(2), 155-163.
- Falqueto, A.; Varejão, J.B.M.; Sessa, P.A. 1987, Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic área in the State of Espírito Santo, Brazil. 1987. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 82 (3), 443.
- Falqueto, A.; Sessa, P.A.; Varejão, J.B.M.; Barros, G.C.; Momen, H.; Grimaldi, G. Jr. 1991. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. . *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* . 86, 499–500.

- Falqueto, A. 1995. Especificidade Alimentar de Flebotomíneos em Duas Áreas Endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.
- Falqueto, A.; Sessa, P.; Ferreira, A.L.; Vieira, V.P.; Santos, C.B.; Varejão, J.B.M.; Cupolillo, E.; Porrozzzi, R.; Carvalho-Paes, L.E.; Grimaldi, G. 2003. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 98, 1003–1010.
- Faryadi, M., Mohebbali, M., 2003. Alterations of serum Zinc, Copper and Iron Concentrations in Patients with Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis. Iranian Journal of Environmental Health. 32, 53-58.
- Ferreira, A.L.; Sessa, P.A.; Varejão, J.B.M.; Falqueto, A. 2001. Distribution of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Different Altitudes in an Endemic Region of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 96(8), 1061-1067.
- Forattini, O.P. 1960. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2(4), 195-203.
- Forattini, O.P.; Pattoli, D.B.G.; Rabello, E.X.; Ferreira, C.A. 1972. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo. 6, 255-261.
- Forattini, O.P.; Pattoli, D.B.G.; Rabello, E.X.; Ferreira, C.A. 1973. Nota sobre a infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo. 7, 181-184.

- Forattini, O.P.; Rabello, E.X.; Serra, O.P.; Cotrim, M.G.; Galati, E.A.; Barata, J.M. 1976. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brazil. *Revista de Saúde Pública*. 10, 31–43.
- Franke, C.R.; Ziller, M.; Staubach, C.; Latif, M. 2002. Impact of the El Nino/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 8, 914-917.
- Furtado T. 1980. Critérios para diagnóstico de LTA. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 65: 51-86.
- Garcia-Miss, M.R.; Andrade-Narvaez, F.J.; Equivel-Vinãs, R.E.; Simmonds-Dias, E.B.; Canto-Lara, S.B.; Cruz-Ruiz, A.L. 1990. Localized cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) in México: sensitivity and specificity of ELISA for IgG antibodies to *leishmania mexicana mexicana*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84, 356-358.
- Genaro, O.; Coheto, V.P.; da Costa, C.A.; Hemeto, M.V.; Crocco, L.C.; Mayrink, W. 1996. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clinics in Dermatology*, 14, 503-512.
- Genaro, O. 2000. Leishmaniose Tegumentar Americana In Neves, D. et al. *Parasitologia Humana*. 10^a ed. São Paulo: ED. Atheneu. Cap.8,p.36-53.
- Gil, L.H.S.; Basano, S.A.; Souza, A.A.; Silva, M.G.S.; Barata, I.; Ishikawa, E.A.; Camargo L.M.A.; Shaw, J.J. 2003. Recent observations on the sand fly (Diptera: *Psychodidae*) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: The importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 751-755.
- Girodon, F.; Galan, P.; Monget, A.; Boutron-Ruault, M.; Brune-Lecomte, P.; Preziosi, P.; Arnaud, J.; Manuguerra, J-C.; Hercberget, S. 1999. Impact of trace elements

and vitamin supplementation on immunity and infections in institutionalized patients: a randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*. 159(7), 748-54.

Gomes, L.S. 1939. A intradermorreação de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afins. *Brasil-Médico*. 49, 5-15.

Gomes, A.C.; Rabello, E.X.; Santos, F.L.F.; Galati, E.A.B. 1983. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3 - Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade do *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. *Revista de Saúde Pública*. 17, 23-30.

Gomes, A.C.; Barata, J.M.S.; Rocha e Silva, E.O.; Galati, E.A.B. 1989. Aspecto ecológico da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 31(1), 32-39.

Gomes, A.C.; Yamamoto, Y.I.; Capinzaiki, A.N.; Amaral, N.M.M.; Guimarães, A.J.G. 1992. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 9. Prevalência/incidência da infecção humana nos municípios de Pedro Toledo e Miracatu, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 34(2), 149-158.

Gomes, A.C. 1994. Sandfly vectorial ecology in the State of São Paulo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89, 457-460.

Gomes, A.C.; Neves, V.L.F.C. 1998. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31(6), 553-558.

- Gontijo, B.A. 1997. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina-Universidade Federal de Minas Gerais – Brasil. 91p.
- Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. 2003. Leishmaniose Tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36(1), 71-80.
- Gramiccia, M.; Gradoni, L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. International Journal for Parasitology. 35(11-12), 1169-1180.
- Grevelink, S.A.; Lerner, E. 1996. Leishmaniasis. Journal of the American Academy of Dermatology. 34: 2 (Part 1), 257-272.
- Grimaldi-Junior, G.; Tesh, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and implications for future research. Rev Microbiology. 6(3), 230-250.
- Grogl, M.; Thomason, T.N.; Franke, E.D. 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 47 (1), 117-126.
- Guerra, M.O.P.; Furtado, T.; Barros, G.C.; Sessa, P.A.; Carias, V.R.D. 1985. Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. Anais brasileiros de Dermatologia, 60, 365-369.
- Guimarães, T.M.P.D.; Toledo, V.P.C.P.; Costa, C.A.; Costa, R.T.; Genaro, O.; Willians, P.; Mayrink, W. 1996. Assessment of immunity induced in mice by glycoproteins derived from different strains and species *leishmania*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 91 (1), 63-70.
- Hamerman, J.A.; Ogasawara, K.; Lanier, L.L. 2005. NK cells in innate immunity. Current Opinion in Immunology. 17, 29-35.

- Hermeto, M.V.; Dias, D.V.; Genaro, O.; Rotondo-Silva, A.; Costa, C.A.; Toledo, V.P.C.P.; Michalick, M.S.M.; Williams, P.; Mayrink, W. 1994. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Doce valley, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89, 519-521.
- Hewitt, S.; Reyburn, H.; Ashford, R.; Rowlandi. 1998. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: vertical distribution of cases in apartment blocks. 92, 273-274.
- Hoge, C.W.; Castro, C.A.; Messer, S.C.; McGurk, D., Cotting, D.I.; Koffman, R.L. 2004. Combat duty in Iraq and Afghanistan, mental health problems, and barriers to care. *New England Journal of Medicine*. 351 (1), 13-22.
- IBGE. Balanço hídrico e clima da região dos cerrados, Rio Janeiro, 1989.
- IBGE. Censo demográfico Minas Gerais/ Fundação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio Janeiro, 1960, 1970, 1991, 1982, 2000.
- Ibs, K.H., Rink, L., 2003. Zinc-altered immune function. *The Journal of Nutrition*. 133, 1452S-1456S
- Jones, T.C.; Johnson, W.D.; Barreto, A.C.; Lago, E.; Badaro, R.; Cerf, B. 1987. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Journal of Infectious Diseases*. 156, 73-83.
- Jose, F.F.; Silva, L.M.; Silva, L.M.; Araújo, M.L.; Almeida, R.P.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M. 2001. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34(6), 537-542.
- Kane, M.M.; Mosser, D.M. 2000. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current Opinions in Hematology*. 7, 26-31.

- Kar, K. 1995. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*. 21(2), 123-152.
- Karl, T.R.; Knight, R.W.; Easterling, D.R.; Quayle, R.G. 1996. Indices of climate change for the United States. *Bulletin of the American Meteorology Society*. 77, 279-292.
- Kar, S.; Metz, C.; McMahon-Pratt, D. 2005. CD4⁺ T Cells Play a Dominant Role in Protection against New World Leishmaniasis Induced by Vaccination with the P-4 Amastigote Antigen. *Infection and Immunity*. 73(6), 3823–3827.
- Kawa, H.; Sabroza, P.C. 2002. Espacialização da Leishmaniose Tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública*. 18(3), 853-865.
- Khalil, E.A.G.; Hassan, A.M.E.; Zijlstra, E.E.; Mukhtat, M.M.; Ghalib, H.W.; Musa, B.; Ibrahim, M.E.; Kamil, A.A.; Elsheikh, M.; Babiker, A.; Modabber, F. 2000. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. 356(9241), 1565-1569.
- Khamesipour, A.; Dowlati, Y.; Asilian, A.; Hashemi-Fesharki, R.; Javadi, A.; Noazin, S.; Modabber, F. 2005. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*. 23, 3642-3648.
- Kedzierski, L.; Zhu, Y.; Handman, E. 2006. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology*. 133(Suppl), S87-112.
- Kemp, F.W.; DeCandia, J.; Li, W.; Bruening, K.; Baker, H.; Rigassio, D.; Bendich, A.; Bogden, J.D. 2002. Relationships between immunity and dietary and serum antioxidants, trace metals, B vitamins, and homocysteine in elderly men and women. *Nutrition Research*. 22(1-2), 45-53.

- Killick-Kendrick, R.; Ward, D.H. 1981. Transmission of leishmaniasis by the bait of phlebotomine sandfly: possible mechanism. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 75 (SI), 152-154.
- Killick-Kendrick, R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. 1990. Medical and Veterinary Entomology. 4 (S.I.), 1-24.
- Killick-Kendrick, R.; Killick-Kendrick, R.; Tang, Y. 1995. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: the high susceptibility of *Plebotomus sergenti* to *Leishmania tropica*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 89, 477.
- Koff, A.B.; Rosen, T. 1994. Treatment of cutaneous leishmaniasis. Journal of the American Academy of Dermatology. 31, 693-708.
- Kolaczinski, S.; Brooker, S.; Reyburn, H.; Rowland, M. 2004. Epidemiology of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Afghan refugee camps in northwest Pakistan. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 98, 373-378.
- Lago, L.; Vieira, J.B.; Costa, J.L.; Marsden, P.D. 1990. Prevalence of mucocutaneous leishmaniasis in littoral Bahia, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 84, 241.
- Lainson, R.; Shaw J. J. 1970. Leishmaniasis in Brazil. V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 64 (5), 654-667.
- Lainson, R.; Shaw, J.J. 1972. Leishmaniasis of New World: taxonomic problems. British Medical Bulletin. 28, 44-48.

- Lainson, R.; Shaw, J.J. 1979. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: Biology of the Kinetoplastida (LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A., orgs.), p. 1-116. London: Academic Press.
- Lainson, R. 1981. Epidemiology and ecology of tegmental leishmaniasis in Amazonia. *Hiléia Médica*. 3(1):35-40.
- Lainson, R. 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 77 (5), 569-596.
- Lainson, R. 1985. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the amazon region of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 18 (1), 47-56.
- Lainson, R.; Shaw, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1. Academic Press, London, 1-120.
- Lainson, R. 1989. Demographic changes and their influence on the Epidemiology of the American Leishmaniasis. In *Demography and vector borne diseases*. Florida CRC Press Boca Raton. p.85-106.
- Lainson, R.; Shaw, J.J. 1989. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasyus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 64(1):3-9.
- Lainson, R.; Shaw, J.J.; Silveira, F.T.; Braga, R.R.; Ishikawa, E.A.Y. 1990. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 282-284.

- Lainson, R.; Shaw, J.J. 1992. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Ciência e Cultura*. 44, 94-106.
- Lainson, R.; Shaw, J.J.; Souza, A.A.A.; Silveira, F.T.; Braga, R.R.; Ishikawa, E.A.Y. 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89, 435-443.
- Lainson R. 1997. *Leishmânia* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*. 11(1): 29-40.
- Lainson, R.; Shaw, J. 1998. New world leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. In Feg Cox, JP Kreier, D Wakelen (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Arnold, London, Auckland, Sydney. 241-266.
- Lemos, J.C.; Lima, S.C.; Costa, M.B.; Magalhães, M.J. 2001. Leishmaniose Tegumentar Americana: Fauna fletomínica em áreas de transmissão no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Caminhos de Geografia*. 2(3), 57-73.
- Leonardo, F.S.; Rebelo, J.M.M. 2004. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37(3), 283-284.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Deroux, G.; Grain, J.; Ronigberg, B.M.; Lieedale, G.F.; Leoblich, A.R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vávra, J.; Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the PROTOZOA. *Journal of Protozoology*. 27, 37-58.
- Liew, F.Y. 1989. *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. New York, Plenum Press, 1989.

- Lima, M.A.P. O processo de acumulação de capital no Brasil: um estudo da tendência à crise fiscal – período 1948-1980. Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional, Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1982. (Tese de doutorado).
- Lima, H.C.; Dekrey, G.K.; Titus, R.G. 1999. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 94(1), 71-76.
- Lima, A.P. 2000. Distribuição da leishmaniose Tegumentar e análise da sua ocorrência em ambientes antrópicas, no estado do Paraná, Brasil. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina) Programa de Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Llanos-Cuentas, E.A.; Marsden, P.D.; Lago, E.L.; Barreto, A.C.; Cuba, C.C.; Johnson, W.D. 1984. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia – Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. II. Cutaneous disease. Presentation and evolution. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 17, 169-177.
- Lohoff, M.; Prechtel, S.; Sommer, F.; Roellinghoff, M.; Schmitt, E.; Gradehandt, G.; Rohwer, P.; Stride, B.D.; Cole, S.P.C.; Deeley, R.G. 1998. A Multidrug-resistance Protein (MRP)-like Transmembrane Pump Is Highly Expressed by Resting Murine T Helper (Th) 2, but Not Th1 Cells, and Is Induced to Equal Expression Levels in Th1 and Th2 Cells after Antigenic Stimulation In Vivo. Journal of Clinical Investigation. 101(3), 703–710.
- Luz, E.; Membrive, N.; Castro, E.A.; Dereure, J.; Pratlong, F.; Dedet, J.A.; Pandey, A.; Thomaz-Soccol, V. 2000. *Lutzomyia whitnani* (Diptera Psychodidae) as

vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Parana State, Brazil. *Journal of Vector Ecology*. 27, 207-214.

Machado-Coelho, G.L.L.; Assunção, R.; Mayrink, W.; Caiaffa, W.T. 1999. American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. *International Journal of Epidemiology*. 22, 982 - 989.

Machado-Coelho, G.L.L. 1999. Fatores geo-ambientais, sócio-demográficos e nutricionais associados a leishmaniose tegumentar americana: Estudo epidemiológico no vale do Rio Doce, Minas Gerais. 210f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

Machado-Coelho, G.L.L.; Caiaffa, W.T.; Genaro, O.; Magalhães, P.A.; Mayrink, W. 2005. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 99, 56-61.

Machado-Pinto, J.; Pinto, J.; Costa, C.A.; Genaro, O.; Marques, M.J.; Modabber, F.; Mayrink, W. 2002. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *International Journal of Dermatology*. 41, 73-78.

Magalhães-Rocha, N.M.; Melo, M.N.; Babá, E.H.; Willians, P.; Dias, M.; Michalick, M.S.; Costa, C.A.; Mayrink, W.; Távora, P.T.C. 1987. Isoenzymatic characterization of *Leishmania* isolated from six rodents captured in the Rio Valley, Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 82(suppl), 95.

Mapinfo corporation. 2005. MapInfo Professional Version 8.0. New York: MapInfo Corporation.

- Marcondes, C.B. 1997. Morfometria e DNA mitocondrial de populações sul americanas de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- Marcondes, C.B.; Lozovei, A.L.; Vilela, J.H. 1998. Geographic distribution of phlebotomine sandflies of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) complex (Diptera, Psychodidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31(1), 51-58.
- Marques, M.J.; Volpini, Â.C.; Genaro, O.; Mayrink, W.; Romanha, A.J. 2002. Simple form of clinical sample preservation and *leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis via polymerase chain reactions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 65(6), 902-906.
- Marques, M.J.; Volpini, Â.C.; Machado-Coelho, G.L.L.; Machado-Pinto, J.; da Costa, C.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Romanha, A. 2006. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 54(1), 37-43.
- Marsden, P.D. 1985. Pentavalent Antimonials: Old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 18(3), 187-198.
- Marzochi, M.C.A.; Coutinho, S.G.; Sabroza, P.C.; Souza, W.J. 1980. Reação de imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Revista do Instituto de Medicina de São Paulo*, 22, 149-155.

- Marzochi, M.C.A., 1992. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 63, 82-104.
- Marzochi, M.C.A.; Marzochi, K.B.F. 1994. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Caderno de Saúde Pública*. Rio de Janeiro. 10 (2), 359-375.
- Marzochi, K.B.F.; Marzochi, M.C.A.; Silva, A.F.; Gravitol, N.; Duarte, R.; Confort, E.M.; Modabber, F. 1998. Phase I study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93, 205-212.
- Mayrink, W.; Magalhães, M.; Dias, M.; Da-Costa, C.A.; Melo, M.N.; Oliveira-Lima, A. 1978. Response to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72, 676.
- Mayrink, W.; da Costa, C.A.; Magalhães, P.A.; Melo, M.N.; Dias, M.; Lima, A.O.; Michalick, M.S.; Williams, P. 1979. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 73, 385-387.
- Mayrink, W.; Williams, P.; Costa, C.A.; Magalhães, P.A.; Melo, M.N.; Dias, M.; Michalick, M.S. 1985. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 79(3), 259-269.
- Mayrink, W.; Genaro, O.; Dias, M.; da Costa, C.A.; Michalick, M.S.; Melo, M.N.; Williams, P.; Costa, R.T.; Nascimento, E.; Oliveira-Lima, A. 1990. Vaccination of dogs against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 32(1), 67-69.

- Mayrink, W.; Melo, M.N.; da Costa, C.A.; Hermeto, M.V.; Genaro, O.; Toledo, T.P.C.P.; Guerra, H. 1993. Multinational development of a standard skin antigen in América: Preliminar results in the Minas Gerais State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88 (suppl.), 226.
- Mayrink, W.; Pinto, J.A.; da Costa, C.A.; Toledo, T.P.C.P.; Guimarães, T.M.P.D. 1999. Evaluation of the potency and stability of a candidate vaccine against American Cutaneous Leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61, 294-295.
- Mayrink, W.; dos Santos, G.C.; Toledo, T.P.C.P.; Guimarães, T.M.P.D.; Machado-Coelho, G.L.L.; Genaro, O.; Da Costa, C.A. 2002. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous leishmaniasis using killed promastigotas of different strains and species of *Leishmania*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(2),125-132.
- Mayrink, W.; Botelho, A.C.C.; Magalhães, P.A.; Batista, S.M.; Lima, A.O.; Genaro, O.; da Costa, C.A.; Melo, M.N.; Michalick, M.S.M.; Williams, P.; Dias, M.; Caiaffa, W.T.; Nascimento, E.; Machado-Coelho, G.L.L. 2006. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39, 14-21.
- Mayo, R.C.; Casanova, C.; Mascarini, L.M.; Pignatti, M.G.; Rangel, O.; Galati, E.A.B.; Wanderley, D.M.V.; Corrêa, F.M.A. 1998. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31(4), 339-345.
- Mehregan, D.R.; Mehregan, A.H.; Mehregan, D.A. 1999. Histologic Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*. 17, 297-304.

- Melo, M.N.; Mayrink, W.; da Costa, C.A.; Magalhães, P.A.; Dias, M.; Willians, P.; Araújo, F.G.; Coelho, M.V.; Batista, S.M. 1977. Padronização do antígeno de Montenegro. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19 (3), 161-164.
- Mendonça, S.C.; Coutinho, S.G.; Amendoeira, R.R.; Marzochi, M.C.A.; Pirmez, Z.C. 1986. Human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clinical Experimental Immunology*. 64, 269-276.
- Mendonca, S.C.F.; De Luca, P.M.; Mayrink, W.; Reston, T.G.; Conceição-Silva, F.; Da-Cruz, A.M.; Bertho, A.L.; Costa C.A.; Genaro, O.; Toledo, V.P.C.P.; Coutinho, S.G. 1995. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against american tegumentar leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 53 (2), 195-201.
- Montenegro, J. 1926. A cútis-reação na leishmaniose. *Annals da Faculdade de Medicina de São Paulo*. 1, 323-330.
- Nadim, A.; Javadian, E.; Tahvildar-Bidruni, G.I.M. 1983. Effectiveness of leishmanization in the in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales*. 76(4), 377-383.
- Nascimento, E.; Mayrink, W.; Costa, C.A.; Michalick, M.S.M.; Melo, M.N.; Barros, G.C.; Dias, M.; Antunes, L.M.F.; Lima, M.S.; Taboada, D.C. 1990. Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis cellular and humoral immune response. *Infection and Immunity*. 5(7), 2198-2203.
- Nascimento, M.D.; Alcantara-Neves, N.M.; Muniz, M.E.; Nunes, S.F.; Paranhos, M.; de Carvalho, L.C. 1993. Induction and modulation of the immune response to

Leishmania by Montenegro's skin test. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 87(1), 91-93.

Norussis, M.J. SPSS/PC+: Statistical package for social science. (computer program) Chicago:SPSS Inc 1990.

Oliveira, C.C.G.; Lacerda, H.G.; Martins, D.R.M.; Barbosa, J.D.A.; Monteiro, G.R.; Queiroz, J.W.; Sousa, J.M.A.; Ximenes, M.F.F.M.; Jerônimo, S.M.B. 2004. Changing epidemiology of american cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. Acta tropica. 90, 155-162.

Oliveira-Neto, M.P.; Pirmez, C.; Rangel, E.; Schubach, A.; Grimaldi, J.R.G. 1988. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Rio de Janeiro: clinical and epidemiological. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 83, 427-435.

Passos, V.M.A.; Falcão, A.L.; Katz, N. 1990. Urban american cutaneous leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 85(2), 243-244.

Passos, V.M.A.; Falcão, A.L.; Marzochi, M.C.; Gontijo, C.M.; Dias, E.S.; Barbosa-Santos, E.G.; Guerra, H.L.; Katz, N. 1993. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 88, 103-110.

Passos, V.M.A.; Fernandes, O.; Lacerda, P.A.F.; Volpini, A.C.; Gontijo, C.M.F.; Defrave, W.; Romanha, A.J. 1999. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta tropica. 72(3), 251-258.

- Passos, V.M.A.; Barreto, S.M.; Romanha, A.J.; Krettli, A.U.; Volpini, A.C.; Gontijo, C.M.F.; Falcão, A.L.; Lima-Costa, M.F.F. 2001. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 34(1), 5-12.
- Pershin, B.B.; Kuzmin, S.N.; Filatov, N.N. 1994. Immunological criteria for the selection of servicemen for service under extreme conditions. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii. 3, 92-96.
- Pessoa, S.B. 1941. Segunda nota sobre a vacinação preventiva na Leishmaniose Tegumentar Americana com leptomonas mortas. Revista Paulista de Medicina. 19, 1-9.
- Pessoa, S.B.; Pestana, B.R. 1940. Ensaio sobre a vacinação preventiva na Leishmaniose Tegumentar Americana com germes mortos. Rev Biol Higiene. 10, 112-118.
- Pimenta, P.F.P.; Turco, S.J.; McConville, J.J. et al. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotas to the sandfly midgut. Science. 256, 1812-1815.
- Pirmez, C.; Oliveira-Neto, M.P.; Franco, A.; Meneses, C.; Rangel, E.; Mayrink, W.; Silva-Gonçalves, A.J.; Fernandes, O.; Grimaldi, G. 1997. Edentates as a possible reservoir of *L.(V.) braziliensis* in a endemic area of Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 92, 119.
- Rangel, O.; Vido, A.A. Fauna flebotomínia de leishmaniose tegumentar americana na região de São João da Boa Vista - SP / American cutaneous leishmaniasis sandfly fauna in the region of São João da Boa Vista - São Paulo state. 1997. Revista de Patologia Tropical. 26(1),17-25.
- Rangel, E.F.; Lainson, R. 2003. Ecologia das leishmanioses. Transmissores de leishmaniose tegumentar Americana. In EF Rangel, R Lainson (eds), Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-309.

- Rath, S.; Trivelin, L.A.; Imbrunite, T.R.; Tomazela, D.M.; de Jesús, M.N.; Marzal, P.C. 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da Arte. *Quimica Nova*. 26(4), 550-555.
- Rebelo, J.M.M.; Oliveira-Pereira, Y.N. 2001. Flebotomíneos (Diptera, *Psychodidae*) de matas de terra firme e de várzea, do município de Paragominas, Estado do Pará, Brasil. *Acta Amazonica*. 31(1), 145-154.
- Reithinger, R.; Davies, C.R., 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 61, 530–541.
- Reithinger, R.; Mohsen, M.; Aadil, K.; Sidiqi, M.; Erasmus, P.; Coleman P.G. 2003. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis, Kabul, Afghanistan. *Emerging Infectious Diseases*. 9(3), 727-729.
- Resende, S.M. Análise eco-epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma área endêmica da Microrregião de Caratinga, Minas Gerais (Brasil), submetida a Ensaio Comunitário com Vacina Anti-LTA. 54f. 2004. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Rey, L. 1991. Parasitologia: Parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2^aed. Guanabara Koogan, Rio Janeiro.
- Ribeiro-de-Jesus, A.; Almeida, R.P.; Lessa, H.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M. 1998. Cytocine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31, 143-148.

- Rodrigues, N.; Guzman, B.; Rodas, A.; Takiff, H.; Bloom, B.R.; Convit, J. 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 32, 2246-2252.
- Rogers, K.A.; Dekrey, G.K.; Mbow, M.L.; Gillespie, R.D.; Brodskyn, C.I.; Titus, R.G.; 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters*. 209, 1-7.
- Romero, H.D.; Prata, A.; Silva-Vergara, M.L.; Silva, L.A. 2004. A comparison of two antigens for Montenegro skin test. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37(6), 508-509.
- Rosa, A.C.; Cuba, C.C.; Vexenat, A.; Barreto, A.C.; Marsden, P.D. 1988. Predominance of *Leishmania Leishmania braziliensis* in the regions of Três Braços and Corte da Pedra, Bahia, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 82, 409-410.
- Ross, R. 1903. Further Notes on Leishmania's bodies. *British Medical Journal* 11:1401.
- Ryan, P.; Aran, B.; Rayan, J.; Wirtz, R.; Wortmann, G.; Rizzo, N. 2003. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. *Veterinary Parasitology*. 115, 1-7.
- Sabroza, P.A. 1983. O domicílio como fator de risco na leishmaniose tegumentar americana. Estudo epidemiológico em Jacarepaguá, município do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1983. [Dissertação de Mestrado — Escola Nacional de Saúde Pública].
- Saldanha, A.C.R.; Romero, G.A.S.; Merchan-Hamann, E.; Magalhães, A.V., Macedo, V.O. 1999. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88^R e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea: I. Eficácia

e segurança. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 32(4), 383-387.

Salles-Gomes, L. 1939. A intradermorreação de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afins. Brasil Méd. 49, 5-15.

Sanchez, J.L.; Diniega, B.M.; Small, J.W.; Miller, R.N.; Andujar, J.M.; Weina, P.J.; Lawyer, P.G.; Ballou, W. R.; Lovelace, J.K. 1992. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 47, 47-54.

Santos, J.B.; Lauand, L.; Souza, G.S.; Macedo, V.O. 2000. Fatores economicos e atitudes em relacao a prevencao domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma area endemica do sul da Bahia, Brasil. Caderno de Saúde Pública. Rio de Janeiro. 16(3), 701-708.

Saravia, N.G.; Weigle, K.A.; Segura, I.; Giannini, S.H.; Pacheco, R.; Labrada, L.A.; Gonçalves, A. 1990. Recurrent lesions in human *leishmania braziliensis* infection – reactivation or reinfection? Lancet. 336(8712), 398-402.

Saravia, N.; Weigle, K.; Navas, C.; Segura, I.; Valderrama, L.; Valencia, A.Z.; Escorcia, B.; MacMahon-Pratt, D. 2002. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of *Leishmania Viannia* in Colombia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 66, 738-744.

Scharton-Kersten, T.; Afonso, L.C.C.; Wysocka, M.; Trinchieri, G.; Scott, P. 1995. IL-12 is required for natural Killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. Journal of Immunology. 154, 5320-5330.

- Sharifi, I.; Fekri, A.R.; Aflatonian, M.R.; Khamesipour, A.; Nadim, A.; Mousavi, M.R.; Momeni, A.Z.; Dowlati, Y.; Godal, T.; Zicker, F.; Smith, P.G.; Modabber, F. 1998. Randomised vaccine trial of single dose of killed *leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam. Iran. Lancet. 351, 1540-1543.
- Shaw, J.J.; Lainson, R. 1987. Ecology and epidemiology: New World. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London. Academic Press.
- Shaw, J.J. 1999. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In Burger, J., (Ed.), Contributions to the Knowledge of Diptera, Associated Publishers, Gainesville. 503-517.
- Sherlock, I.A. 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 91(6), 671-683.
- Silveira, F. T.; Lainson, R.; Shaw, J.J.; Ribeiro, R.S. 1984. Leishmaniose cutanea na Amazonia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de leishmanias: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 26(5), 272-275.
- Silveira, F.T.; Shaw, J.J.; Braga, R.R.; Ishikawa, E.A.Y. 1987. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp., a new parasite from the State of Pará. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 82, 289-292.
- Silveira, F.T.; Lainson, R.; Shaw, I.L.; De Souza, A.A.; Ishikaea, P.A.; Braoa, R.R. 1991. Cutaneous Leishmaniasis due to *Leismmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 35, 735-738.

- Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C.E.P. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99(3), 239-251.
- Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C.E.P. 2005. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 100(5), 525-534.
- Silveira, T.G.V.; Teodoro, U.A.; Lonardoni, M.V.C.; Dias.; M.L.G.G.; Shaw, J.J.; Ishikawa.; E.A.Y.; Lainson., R. 1990. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* LAINSON & SHAW, 1972 from the north of Paraná State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 85(4), 475-476.
- Silveira, T.G.V.; Teodoro, U.; Lonardoni, M.V.C.; Guilherme, A.L.F.; Toledo, M.J.O.; Ramos, M.; Arraes, S.M.A.A.; Bertolini, D.A.; Spinoza, R.P.; Barbosa, O.C. 1996. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. *Caderno Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 12(2);:141-147.
- Sosa-Estani, S.; Segura, E.L.; Gomez, A.; Salomon, O.D.; Peralta, M.; Coutada, V.; Ruiz, L.M. 2001. Leishmaniose cutanea no norte da Argentina fatores de risco identificados num estudio caso-corte em tres municipios de Salta. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34(6), 511-517.
- Steindel, M.; Shaw, J.J.; Ishikawa, I.A.Y.; Carvalho-Pinto, C.J.; Toma, H.K.; Grisard, E.C.; Lima, J. H. 1997. *Leishmania* species identification from autochthonous case

of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 92 (suppl. I), 126.

Sundar, S. 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*. 6(11), 849-854.

Tafuri, W.L.; de Oliveira, M.R.; Melo, M.N.; Tafuri, W.L. 2001. Canine visceral leishmaniose: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 96, 203-212.

Taniguchi, H.H.; Tolezano, J.E.; Corrêa, F.M.A.; Moraes, R.H.P.; Veiga, R.M.; Marassa, A.M. 1991. Epidemiologia da leishmaniose americana no Estado de São Paulo, Brasil. 1. Composição da fauna flebotomínica no município de São Roque, região de Sorocaba. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 51, 23-30.

Teodoro, U.; Kulh, J.B.; Santos, D.R.; Santos, S. 1999. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotomíneos no sul do Brasil. *Caderno de Saúde Pública*. 15, 901-906.

Thomaz-Soccol, V.; Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Pratlong, F.; Martini-Dumas, A.; Serres, E. 1993. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 68(2), 104-106.

Tolezano, J.E. 1994. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89, 427-434.

Tolezano, J.E.; Taniguchi, H.H.; Elias, C.R.; Larosa, R. 2001. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no estado de São Paulo. III. Influência da ação antropica na sucessão vetorial; da LTA. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 60 (1), 47-51.

- Torres, M.; Lopez, M.; Le Pont, F.; Martinez, E.; Munoz, M.; Hervas, D.; Yaksic, N.; Arevaldo, J.; Sossa, D.; Dedet, J.P.; Dujardin, J.P. 1998. *Lutzomia nunextovari anglesi* (Diptera Psychodidae) as probable vector of *leishmania braziliensis* in the Yungas, Bolivia. *Acta Tropica*. 71, 311-316.
- Valim, C. 1993. Transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Ceará. Características da transmissão em diferentes formações paisagísticas com particular referência ao local de transmissão para o homem. Tese de Mestrado - Escola Nacional de Saude Publica, Fundacao Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: ENSP.
- Vélez, I.D.; Agudelo, S.del P.; Arbelaez, M.P.; Gilchrist, K.; Robledo, S.M.; Puerta, J.A.; Zicker, F.; Berman, J.; Modabber, F. 2000. Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L.) amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 94(6), 698-703.
- Vélez, I.D.; Gilchrist, K.; Arbelaez, M.P.; Rojas, C.A.; Puerta, J.A.; Antunes, C.M.F.; Zicker, F.; Modabber, F. 2005. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 99(8), 593-598.
- Vexenat, A.C.; Santana, J.M.; Teixeira, A.R.L. 1996. Cross reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania braziliensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 38,177-85.
- Volpini, Â.C.; Marques, M.J.; Lopes dos Santos, S.; Machado-Coelho, G.L.; Mayrink, W.; Romanha, A.J. 2006. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clinical Microbiology & Infection*. 12(8), 815-818.

- Young, D.G., Arias, J.R. 1982. A new plebotomine sandfly in the *Lutzomyia flaviscutellata* complex from northern Brazil (Diptera: *Psychodidae*). *Journal of Medical Entomology*. 19(2), 134-138.
- Weigle, K.A.; Dávalos, M.; Heredia, P.; Molineros, R.; Saravia, N.G.; D'Alessandro, A. 1987. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 36, 489-496.
- Weigle, M.M., Armijos, R.X., Zurita, C., Racines, J., Reddy, A., Moquera, J., 1995. Nutritional status and cutaneous leishmaniasis in rural Ecuadorian children. *Journal of Tropical Medicine*. 41: 22-28.
- Weigle, K.A.; Saravia, N.G. 1996. Natural history, clinical evolution and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*. 14, 433-450.
- Weigle, K.A.; Labrada, L.A.; Lozano, C.; Santrich, C.; Barker, D.C. 2002. PCR based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 601- 606.
- WHO - World Health Organization – Expert Committee. Control of the leishmaniasis. Geneva, 1990. World Health Organization Technical Report Series, 793.
- WHO - WHO - World Health Organization. 2000. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases. WHO/CDS/CSR/IRS/2000.1. Accessed em 19/07/2007 no site www.who.int/emc.
- WHO - World Health Organization. 2006. Control of the leishmaniases. Report by the Secretariat. EB118/4, 1-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)