



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

LUCAS PORTELA SILVA

**Prevalência da infecção assintomática por *Leishmania infantum*. em doadores
de sangue do hemocentro da cidade do Recife-PE**

RECIFE-PE
2018

LUCAS PORTELA SILVA

Prevalência da infecção assintomática por *Leishmania infantum*. em doadores de sangue do hemocentro da cidade do Recife-PE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como critério para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Dr^a Vláudia Maria Assis Costa
(Universidade Federal de Pernambuco-UFPE)

Co-orientador: Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior
(Instituto Aggeu Magalhães- IAM/Fiocruz)

Recife
2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S586p	Silva, Lucas Portela. Prevalência da infecção assintomática por <i>Leishmania infantum</i>. em doadores de sangue do hemocentro da cidade do Recife-PE / Lucas Portela Silva. – Recife: o autor, 2018. 96 f.; il.; 30 cm. Orientadora: Vláudia Maria Assis Costa. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Inclui referências, apêndices e anexos. 1. <i>Leishmaniose Visceral</i>. 2. Banco de Sangue. 3. <i>Leishmania</i>. I. Costa, Vláudia Maria Assis (orientadora). II. Título. 616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 176)
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

LUCAS PORTELA SILVA

**PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Leishmania sp.* EM DOADORES DE SANGUE
DO HEMOCENTRO DE RECIFE-PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 08/05/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Virginia Maria Barros de Lorena (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira Hernandes (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Maria Edileuza Felinto Brito (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que contribuíram de forma direta e indireta para conclusão dele. Àqueles que nos momentos de dificuldade estiveram do meu lado me dando suporte e forças para continuar a lutar pelo que acreditava. Aos meus pais, Juarez e Elizabeth, que sempre me deram toda a educação e amor essencial para formação de quem sou hoje. Aos meus avôs paternos e maternos. Aos meus tios e tias em especial João e Myrtes que foram peças fundamentais para esta conclusão. A todos os primos e amigos, e aos que me ajudaram que sabem de sua importância. Há....e não poderia deixar de dedicar também ao meu grande irmão Pedro Portela. O meu profundo MUITO OBRIGADO, AMO VOCÊS!!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder sabedoria, discernimento e tolerância durante toda esta caminhada.

Ao meu grande avô Eguinard Portela que terá o privilégio de ter seu primeiro neto com título de mestre.

Aos meus orientadores Dr. Manoel que confiou no meu potencial para o desenvolvimento de toda esta pesquisa, a Dra. Vláudia em que me recebeu de braços abertos.

A Ayla Alves, grande mestre durante minha graduação e que logo se tornou amiga de laboratório me repassando todo o seu conhecimento.

Aos pesquisadores do departamento de imunologia do IAM em especial Dra. Sheila, Dr. Filipe, Dra. Edileuza, Mestre Roberto.

Aos meus colegas e amigos que a UFPE e do AGGEU Jorge, Leyllane, Kamila, Marcela, Gabi, Giselle, Luan, Diego, Michelle, Tiago, Fábiana, Ester, Kamila Sales e por último meu grande amigo Reginaldo.

Aos meus amigos de graduação que sempre estiveram comigo Laura, Elaine, Junior, Dani, Roberta.

Aos meus amigos de colégio em especial Melissa, Joyce, Bruce, Amanda.

As minhas primas Mariana e Juliana que amo muito.

A instituição parceira HEMOPE por abrirem as portas, em especial às técnicas de coletas que sempre me recebiam com um sorriso no rosto.

E a todos aqueles que não foram citados mais que me ajudaram neste processo.

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de diferentes enfermidades, onde os fatores sociais e ambientais vão estar ligados diretamente com a expansão e o desenvolvimento da doença. Nos bancos de sangue no Brasil não há medidas de controle nas bolsas de sangue para detecção do parasito, o que representa um risco potencial para a população. O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar espécies de *Leishmania infantum*, circulante em doadores de sangue do HEMOPE Recife. Para isto foram avaliadas 500 amostras de sangue de doadores onde foram submetidas a uma PCR em Tempo Real. Na população estudada a prevalência foi de 6,2% para presença do DNA circulante do parasito. Destes 54,8% eram do sexo feminino, 54,8% tinha a faixa etária de 18 e 25 anos. Considerando ainda os doadores positivos na PCR em tempo real vimos que apenas 6,4% residiam na zona da mata, 45,1% na capital pernambucana e 48,3% nos demais municípios que compõem a região metropolitana do Recife. No presente estudo foi realizado a identificação da espécie circulante nestes indivíduos, onde de acordo com os resultados, podemos sugerir a presença da *L. infantum*. Diante dos resultados é evidente a necessidade da tomada de medidas de controle para se evitar a infecção transfusional, pois os doadores assintomáticos oferecem riscos aos receptores.

Palavras-Chave: Leishmaniose Visceral. Banco de Sangue. *Leishmania*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of different diseases, where social and environmental factors will be directly linked to the expansion and development of the disease. In blood banks in Brazil there are no control measures in blood bags to detect the parasite, which represents a potential risk for the population. The present study aimed to identify and characterize *Leishmania infantum* species circulating in blood donors from HEMOPE Recife. For this, 500 blood samples from donors were evaluated in which they were submitted to a PCR in Real Time. In the studied population, the prevalence was 6.2% for the presence of the circulating DNA of the parasite. Of these 54.8% were female, 54.8% had the age group of 18 and 25 years. Considering positive donors in real time PCR, only 6.4% lived in the forest area, 45.1% in the Pernambuco state capital and 48.3% in the other municipalities that comprise the metropolitan region of Recife. In the present study the identification of the circulating species was performed in these individuals, where according to the results, we can suggest the presence of *L. infantum*. In view of the results, the need for control measures to avoid transfusion infection is evident, since asymptomatic donors present risks to recipients.

Key Word: Visceral Leishmaniasis. Blood Bank. *Leishmania*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Casos de LV em 2015 distribuídos por estado	16
Figura 2- Óbitos confirmados por LV distribuídos por estado.....	16
Figura 3- Flebotomíneo <i>Lutzomia Longipalpis</i>	18
Figura 4- Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	19
Figura 5- Extração de DNA pelo KIT Wizard® Genomic DNA Purification	37
Figura 1- Mapa do Brasil em destaque Pernambuco e a capital Recife	40
Figura 2- Placas qPCR com as amostras positivas.....	43
Figura 3- Placa de qPCR com a Standard curve qPCR	44
Figura 4- Placa de qPCR com a curva de amplificação.....	45
Figura 5- Mapa de Pernambuco dividido por mesorregiões de acordo com o local de moradia dos doadores infectados	46
Figura 6- Eletroforese em gel de agarose para confirmação de espécie	47
Figura 7- PCR convencional – diluição.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos que identificaram assintomáticos infectados com *Leishmania* nos bancos de sangue do Brasil27

Tabela 1- Características sociodemográficas dos doadores que tiveram a presença de DNA do parasito em sangue periférico..... .45

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

BA	Bahia
CE	Ceará
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IDMR	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IL	Interleucina
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul
NO	Nitric Oxide
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Pernambuco
PR	Paraná
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RK-39	Kalazar Detect Rapid Test
RN	Rio Grande do Norte
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SMS	Sistema de Informações de agravos de notificação
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Epidemiologia	15
2.2 Transmissão direta e Vetorial	18
2.3 Aspectos clínicos das Leishmanioses	20
2.4 Aspectos imunológicos gerais da Leishmaniose	21
2.5 Infecção assintomática	23
2.6 Transmissão Transfusional <i>Leishmania</i>	24
2.7 Diagnóstico	28
2.8 Reação em cadeia de polimerase	29
3 JUSTIFICATIVA	32
4 PERGUNTA CONDUTORA	33
5 OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo geral	34
5.2 Objetivos específicos	34
6 MATERIAIS E MÉTODOS	35
6.1 Tipo de estudo	35
6.2 População Estudada	35
6.3 Amostra	35
6.4 Critérios de Inclusão	36
6.5 Critérios de Exclusão	36
6.6 Técnicas Laboratoriais Empregadas	36
6.6.1 <i>Extração de DNA das amostras</i>	36
6.6.2 <i>PCR em Tempo Real</i>	37

6.6.3 PCR convencional.....	38
7 PLANO DE TABULAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS	38
8 RESULTADOS.....	38
Artigo Prevalência da Infecção assintomática por <i>Leishmania Infantum</i> . Em Doadores De Sangue do hemocentro da cidade do Recife-PE.....	38
9 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICES	74
APÊNDICE A – Artigo: Prevalência da Infecção assintomática por <i>Leishmania Infantum</i> . Em Doadores De Sangue do hemocentro da cidade do Recife-PE	74
ANEXOS	94
ANEXO A – Carta de Anuência da Instituição Parceira.....	94
ANEXO B- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	95

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica e debilitante, causada por protozoário do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos, que afeta a saúde e bem-estar dos seres humanos e animais (LAINSON, 1987; GONTIJO; MELO, 2004).

Estratégias de controle da LV vêm sendo realizadas, todavia a curva ascendente de novos casos e a expansão da LV no Brasil demonstra que os métodos de controle utilizados são pouco efetivos (ZUBEM; DONANALÍSIO, 2016). Sendo a LV uma doença infecto parasitária, endêmica e de fácil expansão, questiona-se a possibilidade de transmissão dessa patologia por outras vias, que não a vetorial (MARTHUR; SAMANTARAY, 2004).

No Brasil, a LV ainda não é considerada uma doença de risco nas agências de banco de sangue (BRASIL, 2004). Sendo isso um fator preocupante, principalmente, devido relatos da possibilidade de transmissão via transfusão (URIAS et al., 2009; PROIETTI et al., 2007; LUZ et al., 1997). Além, da capacidade do parasito sobreviver ao armazenamento do banco de sangue, reforçando assim, a possível transmissão por essa via (DEY; SINGH, 2006).

Diante das dificuldades de diagnóstico, das mudanças do perfil epidemiológico e da escassez de estudos em bancos de sangue, se faz necessário estudos que abordem a infecção assintomática por *leishmania* na população de doadores.

No Brasil, a prevalência de *Leishmania infantum* em doadores de sangue assintomáticos de Monte Carlos-MG (421 pacientes) e de LV em Campo Grande-MS (430 pacientes) foi de 5,5% e 15,6% respectivamente. Os resultados apresentados demonstram a necessidade de se estabelecer métodos de diagnósticos mais eficazes, que passem a ser usados nos bancos de sangue para a exclusão de doadores soropositivos para *Leishmania sp*, garantindo assim a segurança dos envolvidos na doação (URIAS et al., 2009; FRANÇA et al., 2013).

Com o aumento dos casos da doença, e de poucos dados na literatura sobre a transmissão da LV, é de suma relevância identificar e caracterizar a espécie de *Leishmania* encontradas em sangue de doadores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

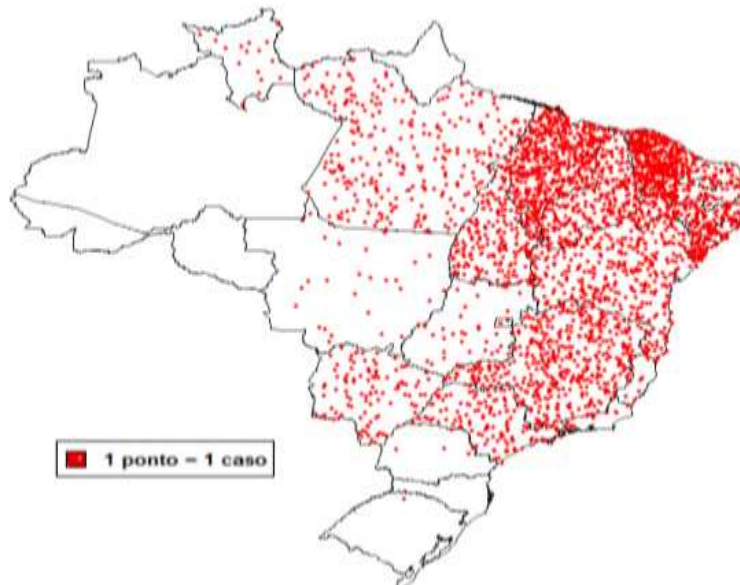
Endêmica em vários países do mundo, a leishmaniose visceral é uma doença com números de morbidade e mortalidade elevados, principalmente nos trópicos e subtropicais (CUERVO-ESCOBAR et al., 2014; MKADA–DRISS et al., 2014).

Países como Brasil, Sudão, Sudão do Sul, Índia, Bangladesh, e Etiópia correspondem juntos mais de 90% de todos os casos de LV no mundo, com número de óbitos chegando a 10%, sendo aproximadamente 20.000 a 40.000 mortes por ano (ALVAR et al., 2012).

No Continente Americano, a LV se mostra presente desde o México até a Argentina, aproximadamente 75% dos casos ocorre em território brasileiro, sendo notificada em todos os estados (VOLPINI et al., 2004; MICHALSKY et al., 2011). Apesar de ser uma doença de característica rural, tem se observado uma expansão em pequenas e grandes áreas urbanas, podemos citar como exemplo a região nordeste brasileiro, na qual apresenta maior incidência (BRASIL, 2009).

Na região nordeste, as leishmanioses possuíam inicialmente uma ocorrência limitada às áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas hoje, encontra-se em franca expansão, sendo responsável por 53% de todos os casos registrados no Brasil. Entre os anos 2000 e 2013, ocorreram 1.570 óbitos, sendo Maranhão, Piauí e Ceará os estados com os maiores índices de mortalidade, Pernambuco se destaca pela grande expansão por todo o estado nos últimos 20 anos (CARVALHO et al., 2007). O que mais chama a atenção, é que apenas nos anos de 2015 e 2016 foram 5,351 casos confirmados da doença no nordeste tendo neste mesmo período um número de 271 óbitos, se destacando em ambas a situação o ano de 2015 com 1.806 casos confirmados e 138 óbitos. Figura 1 e 2. (BRASIL, 2017).

Figura 1- Casos de LV em 2015 distribuídos por estado



Fonte:SVS/MS

Figura 2- Óbitos confirmados por LV distribuídos por estado em 2015



Fonte:SVS/MS

No período de 2010 a 2014, no estado de Pernambuco, foram 3.329 casos notificados, neste mesmo período foram registrados 35 óbitos em decorrência da LV, os municípios que se destacaram por apresentarem uma intensa transmissão foram Tamandaré, Caruaru, Salgueiro, Lagoa Grande, Santa Maria da Boa Vista, Petrolina, Ouricuri e Santa Cruz, Carnaubeira da Penha, Serra Talhada e Goiana (Brasil, 2016).

Em um trabalho inédito realizado em Pernambuco entre os anos de 1934 a 1984, foi observado que a população mais afetada eram as crianças menores de nove anos, porém, este padrão vem sendo modificado (Pereira et al., 1985). Como demonstra um estudo realizado no estado do Ceará, em que verificou uma mudança na faixa etária dos indivíduos, onde a população adulta representou ser a mais infectada (CAVALCANTE; VALE, 2014).

Sendo considerada bastante complexa, a epidemiologia das leishmanioses, devido aos seus ciclos antro-zoonóticos que envolve uma grande variedade de vetores, mamíferos, reservatórios além da grande diversidade das espécies de *Leishmania* (ASHFORD, 2000). Estima-se que a prevalência da doença seja em torno de 12 milhões de casos em todo o mundo, havendo cerca de dois milhões de casos novos a cada ano, destes 500 mil de leishmaniose visceral (BASTIEN, 2011).

O rápido crescimento populacional está relacionado com fatores que contribuem para o aumento de casos da doença. Como exemplo, temos o desmatamento, a falta de saneamento básico, a pobreza e o convívio homem/reservatório (COSTA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2005; WERNECK et al., 2007). Esta expansão da doença é preocupante, o que implica na necessidade de avanços direcionados a aspectos como: identificação de espécies, diagnóstico, tratamento, prevenção, a carência de medidas de controle e de políticas públicas refletem no aumento do número de morbidade e mortalidade (MONTEIRO, 2013).

Nota-se que as precárias condições de vida da população são um dos principais determinantes para o processo saúde-doença (COSTA; VIEIRA, 2001; SILVA; VASCONCELOS, 2003).

Sendo assim, a aproximação dos seres humanos com as áreas de florestas e a criação de animais, são fatores que atraem o vetor ao peridomicílio, se estabelecendo nestes locais a presença do vetor vai contribuir na manutenção do ciclo da doença (MISSAWA et al., 2008). O clima também vai influenciar na presença do vetor, uma vez que foi observado que em épocas de chuvosas a um

aumento da população vetorial (AGRA et al., 2016).

2.2 Transmissão direta e vetorial

As leishmanioses são antroponoses, causadas por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*, apresentando em uma de suas formas clínicas, a forma visceral, afetando principalmente os seres humanos. O vetor envolvido neste processo é o flebotomíneo, presente na zona rural e em ampla expansão na área urbana (VILELA et al., 2011; FONTELES et al., 2009; DANTAS-TORRES et al., 2009).

No Brasil os principais causadores da LV são os flebotomíneos *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis* (Figura 2), popularmente conhecido como mosquito palha (MAIA-ELKHOURY et al., 2008)

O inseto *Lutzomyia longipalpis*, foi descrito pela primeira vez em 1912, após ser encontrado nos estados de São Paulo e de Minas Gerais (LUTZ; NEIVA, 1912). Mais tarde, constatou-se que ele era vetor da LV, podendo ser encontrado em grande parte do continente americano (OVALOS, 2011). Principalmente em localidades próximas a regiões de Mata Atlântica remanescente (DANTAS-TORRES, 2006).

A principal fonte alimentar do vetor hematófago são os vertebrados, contribuindo com o ciclo biológico e transmissão da doença (FONTELES et al., 2009).

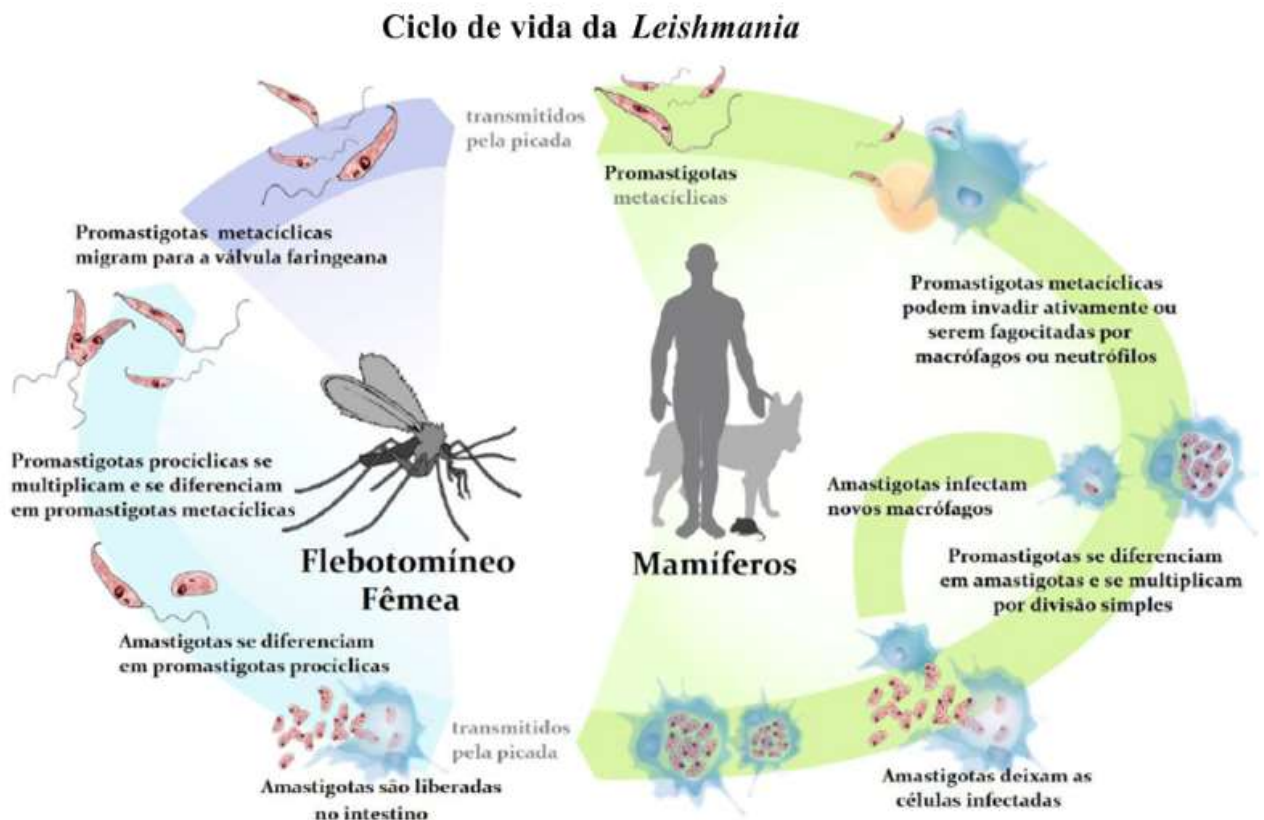
Figura 3- Flebotomíneo Lutzomia Longipalpis



Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lutzomyia_longipalpis-sandfly.jpg

A transmissão ocorre no momento da picada, onde são inoculados no vertebrado as formas promastigotas que são caracterizadas por serem fusiforme, móvel e flagelada com cinetoplasto anterior ao núcleo, tendo 10-15µm de comprimento por 1,5 a 3,5 µm de largura, estas formas promastigotas vão infectar os macrófagos e se desenvolver em amastigotas que são caracterizadas por serem arredondada, imóvel e possuírem uma bolsa flagelar com uma grande abundância de kDNA, seu tamanho é de 2-4 µm, logo irá ocorrer a ruptura do macrófago liberando as formas amastigotas na corrente sanguínea; uma vez o vetor se alimentando do sangue infectado as formas amastigotas vão transformar em promastigotas onde vão se reproduzir no intestino, o ciclo se fecha no momento em que o vetor se alimenta novamente do vertebrado. Figura 3. (PEARSON; SOUSA, 1996, CUNNINGHAM, 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003; RIERA et al., 2008).

Figura 4- Ciclo de vida da *Leishmania*



Fonte: <https://www.google.com.br/search?q=ciclo+leishmaniose+visceral>

Outras vias de transmissão vêm sendo citadas, tanto em animais quanto em seres humanos (TURCHETTI et al., 2014). Na Alemanha, por exemplo, foi descrito o primeiro caso de transmissão vertical de *L. infantum* em cães naturalmente infectados, confirmando essa possibilidade (NAUCKE; LORENTZ 2012). Ainda em cães, SILVA et al., (2009) demonstraram quando não há a presença do vetor, a *L. infantum* pode ser sexualmente transmitida. Morais et al, (2013) destacam os ectoparasitas como possíveis vetores podendo eles servirem como sentinelas ou indicadores da circulação de *Leishmania*. Em humanos, a transmissão congênita, também já foi relatada, sendo descrita pela primeira vez por Low e Cooke (1926). Porém, em regiões endêmicas é difícil distinguir a transmissão congênita da vetorial (MONTOVANI et al., 2005).

Além das transmissões já citadas, na literatura há relatos de transmissão por meio de órgãos transplantados, como é relatado no estudo de Silvia et al., (2015) após um transplante renal. A leishmaniose pode aparecer como uma complicação a longo prazo após o procedimento do transplante, porém tudo vai depender de qual órgão foi transplantado (ANTINORI et al., 2008).

Outra forma também relatada, se dar pelo compartilhamento de seringas por usuários de drogas, sendo caracterizado como um ciclo alternativo, onde a seringa no caso substitui o vetor, porém, ocorrendo à transmissão direta das formas amastigotas (MARQUES et al., 2007)

2.3 Aspectos Clínicos das Leishmanioses

A LV é caracterizada como uma doença sistêmica, crônica e grave (MICHEL et al., 2011). O indivíduo é definido como suspeito ao apresentar sintomas como febre, perda de peso, astenia, hepatoesplenomegalia, anemia e que seja proveniente de área com ocorrência de transmissão. Os casos confirmados são por critérios clínicos-epidemiológicos e laboratoriais, havendo a confirmação o caso será tratado como um caso novo, se em 12 meses houver o ressurgimento de doença o caso será classificado como recidiva (BRASIL, 2014).

A forma mais grave das leishmanioses é a forma visceral, apresentando uma variação muito grande desde uma forma assintomática até uma forma crônica, podendo ser fatal quando não tratado (BADARO, 1996; DEY E SHING 2006)

Em um estudo realizado por Alvez e Fonseca (2018) em um grupo de 174

peessoas com a doença as principais manifestações clínicas apresentadas foram febre, fraqueza, emagrecimento, palidez e hepatomegalia o estudo ainda chama a atenção em relação ao diagnostico tardio no qual pode ter o desfecho de morte.

Vale ressaltar que o período de incubação pode variar de 10 a 24 meses, porém tudo vai depender da suscetibilidade do hospedeiro (PEDROSA e ROCHA, 2013).

Quanto aos perfis clínico-imunológicos da LV, temos infecção sintomática, infecção subclínica resistente, infecção subclínica oligossintomática, e infecção assintomática (BARBOZA et al., 2010). São classificados como indivíduos assintomáticos, todos aqueles que no atual momento se encontram aparentemente saudável, mas que estão infectados pelo parasito da *Leishmania*. A forma assintomática vai ser identificada por meio da resposta imunológica específica para antígenos de *Leishmania*, por RT-PCR ou isolado em cultura (MICHEL et al., 2011; FAKHAR et al., 2008).

Casos de portadores assintomáticos em áreas endêmicas, já foram relatados no Irã por Alborzi et al, (2008) e por Asfaram et al, (2017), Iraque por Souhaila et al, (2010), Singh; Chaudhry;Wali (1996) relatam que cerca de 43,9% das pessoas que apresentam a infecção assintomática, podendo desenvolver a forma sintomática em um período de três meses a um ano. O que se torna preocupante é que se existem casos de assintomáticos em uma determinada região sendo eles reservatório do parasito isto pode ser um fator desencadeante de uma epidemia no futuro, diante disto, a melhor forma de redução da prevalência de assintomáticos é a aplicação de intervenções relacionadas ao vetor, pois, as intervenções voltadas ao tratamento do doente podem reduzir apenas os casos sintomáticos (STAUCH et al.,2011). Vale ressaltar que a evolução da doença vai depender do estado imunológico do indivíduo (BRASIL, 2007).

2.4 Aspectos imunológicos gerais da Leishmaniose

A imunidade frente à *Leishmania* depende do desenvolvimento de um padrão de resposta Th1, dependente da indução inicial via IL-12 produzido pelas células apresentadoras de antígeno . A IL-12 induz a secreção de IFN γ pelos linfócitos Th1. Esta citocina será responsável pelo estímulo da atividade microbicida dos macrófagos, a partir do aumento de produção de moléculas microbicidas como óxido

nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (KAYE e SCOTT.,2011 ; RODRIGUES et al., 2016).

Na Leishmaniose Visceral estudos realizados em camundongos demonstraram que as células T CD4 + e T CD8 + também são responsáveis pelo controle e desenvolvimento da resposta imune específica para o parasito (GOTO e PRIANTI., 2009). Estas células produzem IFN- γ que ativa macrófagos estimulando a produção de óxido Nítrico (NO) e outros radicais livres com atividade microbicida.(KAYE e SCOTT., 2011).

Outro mecanismo importante durante a infecção, é estabelecido a partir de células dendríticas esplênicas que produzem IL23p19 que junto com IL12p40 vão dar origem a IL23 biologicamente ativa. A IL23 junto com outras citocinas promove a diferenciação da população Th17. Estas células têm sido associadas a um papel protetor durante a leishmaniose visceral. Na LV a IL17 atua sinergicamente com IFN γ na ativação de macrófagos e indução de produção de NO. (NASCIMENTO et al.,2015).

Na leishmaniose visceral a IL-10 tem um efeito anti-inflamatório, (OUYANG et a.,2011.) sendo responsável pela desativação dos mecanismos microbicidas do macrófago frente a infecção. Esta citocina também está relacionada à regulação da produção de IFN γ pelas células T levando a diminuição e é capaz de inibir a migração de células dendríticas nos sítios de ativação de linfócitos T. Desta forma esta citocina está associada a maior susceptibilidade a infecção na leishmaniose visceral. (BHATTACHARYYA et al., 2011.)

Em indivíduos assintomáticos o diagnostico torna-se difícil, alguns estudos vem demonstrando a estimulação de sangue total com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), como um bom teste para detectar indivíduos assintomáticos, uma vez sendo avaliadas as concentrações plasmáticas de INF-g e IL-10. Realizando uma combinação destes marcadores com o diagnóstico molecular, os resultados podem ser eficaz para avaliação da prevalência dos assintomáticos em uma determinada população assim como ser uma ferramenta importante para o controle da *Leishmania*. (IBARRA-MENESES et al., 2016; SINGH et al.,2012).

2.5 Infecção assintomática

O primeiro relato de infecção assintomática no mundo ocorreu em 1974, onde foi descrito casos na região Emilia-Romagna localizada no norte da Itália, após um surto da doença (PAMPIGLIONE et al., 1974).

No Brasil, a primeira vez que foi descrito o termo 'assintomático' foi em 1984 por Badaró et al, (1984). Como próprio nome já diz, a forma assintomática é caracterizada por não apresentar nenhum sinal e sintoma da doença, para o diagnóstico é necessário à realização de exames laboratoriais sorológicos, porém, se tratando da forma assintomática, os diagnósticos moleculares são os mais indicados (MARY et al., 2004; SELVAPANDIYAN et al., 2008; MICHAEL et al., 2011).

Moreno et al, (2006) identificaram por meio de diferentes métodos laboratoriais a infecção assintomática por *Leishmania*, em áreas de baixa prevalência, no estudo foi utilizado como método de diagnóstico a PCR e a sorologia (ELISA, rK39, IFAT) nos resultados, foi visto que apesar de haver uma variação de acordo com os testes, é possível realizar o diagnóstico da leishmaniose em assintomáticos; no mesmo estudo também foi relatado a importância de se estudar os casos assintomáticos e relacioná-los com a manutenção da infecção em áreas urbanas e identificar os fatores de risco que levam à progressão da doença.

Diversos fatores podem estar relacionados com o não aparecimento de sinais clínicos, dentre estes fatores podemos destacar os fisiológicos, nutricionais, imunogênicos ate mesmo o parasito pode estar envolvido nesta determinação da sintomatologia (JIMENES-MARCO et al, 2012).

Além disso, HOBOKEN (2007) cita que a predisposição genética pode ter um papel fundamental para o desenvolvimento da doença; (JIMENEZ-MARCO et al., 2012). E o que mostra o artigo de WEIRATHER et al. (2016) que teve como objetivo verificar regiões cromossômicas e relacionar com as manifestações assintomáticas (cromossomo 9) e sintomáticas (cromossomo 15 e 19) da infecção por *L. infantum*. Outro fator, descrito por HIDE et al. (2013) em um estudo realizado no sul da França, é que a virulência pode estar relacionada nesta determinação da sintomatologia.

Em estudo realizado por Singh; Chaudhry; Wali, (1996) relatam que cerca de 43,9% das pessoas que apresentam infecção assintomática, podem desenvolver a

forma sintomática em um período de três meses a um ano. Em um estudo similar na Índia, que foi realizado com 2603 pessoas do distrito de Malda, 185 foram positivos para o teste rápido, deles 96 tinham histórico de leishmaniose e 89 sem histórico. Entre as pessoas assintomáticas infectadas, observou-se o desenvolvimento da doença em 10,39% e a soroconversão em 80,52% casos, 9,09% permaneceram soropositivos mesmo após três anos (SAHA et al., 2017). Diante de todos estes contextos, mais estudos precisam ser aplicados para esta temática, uma vez que um indivíduo assintomático pode ser um potencial transmissor das doenças.

2.6 Transmissão Transfusional por *Leishmania*

Uma vez sendo um indivíduo assintomático um potencial doador de sangue, outra possível forma de transmissão, é a transfusional, na qual já foi relatada por De Freitas et al. (2006), onde eles inocularam sangue total com presença do parasito em animais. Após um período, os animais desenvolveram infecção e sintomas clínicos de leishmaniose visceral. Além disso, a transmissão da leishmaniose pelo transplante de órgãos também vem sendo discutida como é já descrito na literatura por Pego et al. (2013) em que um paciente sem evidências de exposição de alto risco a *Leishmania spp* desenvolveu a infecção após um transplante renal.

O primeiro relato de transmissão via transfusão sanguínea foi na China por Chung et al, (1948), posteriormente outros relatos também foram descritos em países como a Suécia, França, Bélgica (ANDRE et al, 1958; KOSTMAN et al, 1963; COHEN et al., 1991), no Brasil o primeiro relato ocorreu no estado do Rio Grande do Norte (LUZ et al.,1997)

Apesar de já haver relatos de transmissão, até o momento no Brasil não é realizado na triagem para doação de sangue a sorologia para esta infecção. Os testes realizados até então são para doença de Chagas, hepatite, Sífilis, HTLV 1 e 2, HIV 1 e 2 (URIAS et al., 2009; BRASIL, 2004; LIMA et al., 2012).

A Organização Pan-americana de Saúde, aconselha a recusa dos doadores que tiveram infecção por leishmaniose por um período de dois anos, como também recusa aqueles possivelmente assintomáticos, já a Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstra certa preocupação em relação a triagem realizada atualmente (BLOCH; VERMEULEN; MURPHY, 2012).

No estudo de Chung et al. (1948), eles relatam uma aparente transmissão da

leishmaniose após uma mãe ter feito uma doação para às duas filhas, pouco tempo depois da doação ter sido realizada, a mãe foi diagnosticada com a doença, logo foi realizado uma avaliação periódica nas crianças, onde foi constatado que após dez meses as crianças apresentaram-se infectadas.

André et al, (1958) descreveram o desenvolvimento da leishmaniose em recém-nascidos após receberem transfusão sanguínea de indivíduos até então saudáveis antes do tempo da doação do sangue, porém, algum tempo após a doação se iniciou as manifestações clínicas da doença, e logo, após oito meses as crianças também iniciaram a sintomatologia.

Outro caso semelhante ocorreu na Bélgica, sendo o primeiro caso de transmissão de *Leishmaniose* por transfusão sanguínea, este caso foi relatado por Cohen et al, (1991). No estudo é apresentado um caso de uma criança de apenas 11 meses de vida diagnosticada com *leishmaniose*, a criança era moradora de uma área não endêmica e nunca saiu do local de nascimento, na investigação foi observado no histórico da criança que ela havia recebido uma transfusão de sangue logo após o nascimento. No Reino Unido, uma criança após necessitar de uma transfusão sanguínea devido a uma cirurgia cardíaca desenvolveu leishmaniose visceral, tanto a criança como a mãe nunca havia saído do Reino Unido (CUMMINS et al.,1995).

Enquanto no Brasil, LUZ et al, (1997) investigaram a prevalência de anticorpos *anti-Leishmania* em 1500 doadores de sangue politransfundidos em hemodiálise. Em um grupo de um número de 1194 de doadores voluntários a sororeatividade foi de 9%, chegando a 25% nos oriundos da zona peri-urbano. Já nos pacientes politransfundidos e em hemodiálise da cidade de Natal-RN a sororeatividade foi de 37%, valendo ressaltar que na cidade de Natal a leishmaniose se encontrava em baixa endemia ocorrendo surtos esporádicos em localizadas regiões. Para a realização dos testes, foi aplicado o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de fucose-manose no qual apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96%. A transfusão sanguínea foi incluída como um fator de risco, sendo relacionada fortemente com a presença de anticorpos *anti-Leishmania*. Os resultados do estudo demonstram a necessidade do controle da leishmaniose uma vez que é uma possível via de transmissão em áreas endêmicas.

Também no Rio Grande do Norte, Otero et al, (2000) realizaram um estudo no qual foi feita uma relação entre a sororeatividade e a presença de DNA de *L. donovani* em doadores de sangue saudáveis assintomáticos. Como método de diagnóstico foi utilizado o ELISA e o PCR, dos 21 doadores assintomáticos reagentes no ELISA, 24% foram positivos ao ser aplicado o PCR. Mostraram a possibilidade da transmissão da leishmaniose por transfusão de sangue em áreas endêmicas. Esse estudo foi um tanto controverso já que *L. donovani* pertence ao velho mundo, havendo assim necessidade de maiores investigações.

De acordo com Sistema de Informações de agravos de notificação (SIS), é possível observar que no Rio Grande do Norte, no período de 2012 a 2015, foi registrado 367 casos confirmados de leishmaniose visceral, distribuídos em 76 municípios, sendo eles os que apresentam maiores números de casos Natal, Mossoró e Açu. Ocorrendo neste mesmo período, 23 óbitos devido à doença.

Assim como Natal na região nordeste, no sudeste a cidade que se destaca é Montes Claros em Minas Gerais, que entre os anos de 2009-2015 foram 2,682 casos confirmados, destes 464 ocorridos em 2009 (BRASIL, 2015). Neste mesmo ano Urias et al, (2009) realizou um estudo, que teve como objetivo a prevalência de adultos infectados com *L. chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro da cidade de Montes Claros-MG. O estudo teve total de 421 participantes, destes participantes foi coletado 10 ml de sangue para a realização de teste sorológicos. Para a triagem de LV foi utilizado a imunofluorescência indireta para *Leishmania*, todas as amostras positivas foram aplicadas ao Kalazar Detect Rapid Test, sendo estas bolsas de sangue impedidas para doação. Os casos positivos foram submetidos a uma avaliação e não apresentaram nenhuma evidência clínica, sendo considerados como assintomáticos e acompanhados por um período de um ano. Dos 421 doadores 23 apresentaram positividade por meio da imunofluorescência indireta para *L. infantum* e nenhuma para o teste rápido. No estudo também aponta a importância de maiores pesquisas em relação à transmissão transfusional.

Outro estado brasileiro com altos números de casos confirmados é o Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2010 e 2017 foram 1.470 casos confirmados, as cidades que mais se destacam como áreas de intensa transmissão é Campo Grande, Três Lagoas, Corumbá, Aquidauana, Coxim e Anastácio (Brasil, 2017).

Diante deste quadro França et al (2013) realizou um estudo onde teve como objetivo detectar anticorpos *anti-Leishmania* em doadores de sangue do Centro-Oeste. No estudo 430 amostras de doadores de sangue, todas as amostras foram testadas por meio da imunofluorescência, onde 15,6% foram positivas. Quanto à população foi visto que 70,2% eram do sexo masculino com idade média de 32 anos. Por fim é indicado que os métodos para diagnóstico de leishmaniose em banco de sangue devam ser rotina com objetivo de promover maior segurança para os envolvidos.

Fukutani et al, (2014) verificaram a prevalência de infecção assintomática de *Leishmania* entre os doadores de sangue, no estudo realizado foi coletada 700 amostras, todas estas amostras foram submetidas primeiramente ao ELISA, nas amostras reagentes foi aplicado o PCR EM TEMPO REAL (qPCR) a fim de identificar a presença de DNA do parasita e a PCR convencional para a região ITS. Em conclusão os autores relatam que no grupo de doadores de sangue há doadores com a infecção assintomática, o que se faz necessário de uma discussão sobre a necessidade de programar estratégias específicas de rastreamento e, possivelmente, o risco de transmissão de *Leishmania* por transfusão de sangue.

Para uma melhor compreensão montamos uma tabela com os estudos publicados até o momento em que abordam a questão do assintomático o banco de sangue. Tabela 1.

Tabela 1- Estudos que identificaram assintomáticos infectados com *Leishmania* nos bancos de sangue do Brasil.

Técnica	Nº de participantes	Resultados	Local de Estudo	Referência
ELISA	1194	9	Natal-RN	Luz et al., 1997 [18]
ELISA-PCR	116	24-23	Natal-RN	Otero et al., 2000 [19]
RIFI	421	5,5	Monte Claros-MG	Urias et al.,2009 [20]
ELISA	176	11,4	Região Central-PR	Braga et al., 2005 [21]
RIFI	430	15,6	Campo Grande-MS	França et al., 2013 [22]
ELISA	700	5,4	Salvador-BA	ukutani et al., 2014 [23]
PCR-ELISA	431	4,3-12,2	Fortaleza-CE	Monteiro et al., 2016 [24]

2.7 Diagnóstico

Para o diagnóstico das leishmanioses, se faz necessário uma observação de todos os aspectos epidemiológicos e clínicos do paciente e relacioná-los com os exames laboratoriais, podendo ser os parasitológicos, imunológicos e moleculares (HORIMOTO et al., 2009; LEMOS et al., 2003; BRITO et al., 2012; SILVA et al., 2014).

Para LV é preconizado para o diagnóstico imunológico a Imunofluorescência indireta (IFI) sendo positivas todas aquelas amostras que apresentarem reação a partir da diluição de 1:80. Quando os títulos forem iguais à 1:40, com clínica sugestiva de LV, recomenda-se uma nova amostra em 30 dias. A IFI pode ser tanto quantitativa ou qualitativa, a quantitativa vai confirmar os resultados reagentes ou indeterminados dos que foram submetidos a forma qualitativa, que vai definir se é reagente, não reagente ou indeterminada (BRASIL,2009). Também é indicado pelo MS o Ensaio imunoenzimático (ELISA) e os Testes rápidos imunocromatográficos onde vão ser considerados positivos quando a linha controle e a linha teste aparecem na fita ou plataforma (BRASIL, 2014).

O método imunológico ELISA vai se basear na presença de resposta humoral específica (HERWALDT, 1999), apresentando uma sensibilidade e especificidade que vai depender do antígeno utilizado, uma boa parte dos resultados que se mostram promissores utilizam como antígeno o rK39 tendo uma sensibilidade e especificidade de 100% a 96% (ROMERO; BOELAERT, 2010; PALATNIK et al.,1995). Além desses, a DAT (Teste da aglutinação dierta) vai expor o resultado por meio da detecção de anticorpos, que são apresentados nos períodos iniciais da infecção não podendo ser detectados depois da cura, a sensibilidade deste teste varia de 90% a 100% enquanto a especificidade tem uma variação de 72% a 100% (SRIVASTAVA et al.,2011; SINGH; SIVAKUMAR, 2003; SASSI et al.,1999).

O IDMR é baseado por uma reação tardia de hipersensibilidade, este método imunológico identifica a infecção por *Leishmania* em humanos (REAIS et al.,2008). O IDMR é uma técnica no qual o antígeno é inoculado no antebraço do paciente e lida com 48h, será considerada positiva se a endureção formada for maior ou igual a 5 mm, (ANDRADE et al.,2005), esta lesão é caracterizada pelo endurecimento do local da inoculação que é causada pela infiltração de linfócitos e macrófagos (CARVALHO et al,1995).

O Teste rápido imunocromatográfico além de ser empregado para o diagnóstico da doença, vem sendo usado para determinar a proporção de infecções assintomáticas, além de detectar infecção subclínica ou ativa (BARÃO et al., 2007). Este tipo de teste é específico para LV, com ele é possível detectar anticorpos para a sequência específica de 39 aminoácidos que se repetem compondo a proteína recombinante k39 (DOURADO et al., 2007).

Além de todos estes já citados, há também os diagnósticos parasitológicos, que se baseiam na visualização das amastigotas em órgãos, tecidos e sangue periférico (SINGH;SIVAKUMAR, 2003; EGUCHI et al., 2017). No parasitológico quando realizado esfregaço em lâmina as formas amastigotas são vistas facilmente, nesta técnica a sensibilidade é alta, porém a especificidade é muito variável (SHING.,2006).

Vale ressaltar que nas técnicas parasitológicas, para um bom resultado se faz necessário primeiramente usar um material de qualidade, como também ter uma equipe treinada e capacitada para a realização da técnica e leitura dos resultados (SRIVIDYA et al., 2012) .

Outra técnica parasitológica utilizada, é a cultura, onde é possível a identificação por meio do isolamento da promastigota, porém, esta técnica é mais utilizada em laboratórios de pesquisa devido a demora para obtenção dos resultados (SRIVASTAVA et al., 2011).

Outro método de diagnóstico que vem sendo aplicado é indicado para casos assintomáticos é a PCR, que tem como uma de suas grandes vantagens a detecção do parasito, mesmo em cargas muito baixas (FAUCHER; PIARROUX, 2011)

2.8 Reação em Cadeia da Polimerase

Quando os diagnósticos parasitológicos e sorológicos expressam um resultado negativo ou inclusivo, mas ainda há alguma suspeita clínica, é necessário um método alternativo, este método é a PCR. Técnica que se baseia na reação de regiões determinadas de DNA, amplificadas enzimaticamente. (MELLO,2006; ALAM et al., 2009; Ruitter et al.,2014).

Na PCR, para a identificação e quantificação do parasito em lesões e em tecido sanguíneo vem sendo utilizado como alvo o DNA do cinetoplasto (kDNA) (VERGEL et al, 2009). Muito utilizado pelos pesquisadores o kDNA é formado por

uma rede de DNA, onde é encontrada uma grande quantidade de moléculas circulares de DNA (minicírculos). Os minicírculos são cerca de 10.000-20.000 cópias, com sequências de 500 a 2500 pares de base (pb) além da região conservada ampliada ser 10 vezes mais sensível que a da região variável, já os maxicírculos se apresentam em torno de 50 cópias com 20.000 a 35.000 pares de base (pb) (DEGRAVE et al., 1994, CORTES, 2008).

Devido à elevada sensibilidade e especificidade, os métodos moleculares permitem a caracterização de espécies com extrema exatidão, como exemplo dessas técnicas tem-se a PCR-RFLP. A identificação de regiões do DNA do parasito gera perfis de banda na eletroforese e permite a diferenciação entre as espécies com confiabilidade e rapidez, fundamental para se descrever espécies em regiões endêmicas (VOLPINI et al., 2004).

O resultado destas técnicas é através da visualização por meio de um gel de agarose ou poliacrilamida, onde é possível caracterizar os fragmentos que foram separados por meio de peso e tamanho molecular (Auwera & Dujardin 2015).

Em um estudo realizado por Medeiros et al, (2017) para o diagnósticos em assintomáticos foi desenvolvido uma técnica sem o uso de kits comerciais, que permite o teste de varias amostras simultaneamente. Baseada na medição de leituras de absorbância em produtos de PCR, a técnica pode ser aplicada em países endêmicos ajudando no monitoramento das intervenções de controle.

Com o aperfeiçoamento da PCR convencional se desenvolveu a PCR em tempo real apresentando uma maior sensibilidade, especificidade e rapidez além de uma capacidade de quantificar cargas parasitárias em níveis muito baixos (Dantas-Torres et al., 2016).

Uma das grandes vantagens da qPCR é a capacidade precisa de quantificação, e o acompanhamento, em tempo real, do produto quantificado. A técnica vem se demonstrando eficaz para diversos tipos de amostras, sendo possível a identificação da carga parasitária por reação, acompanhamento durante e pós-tratamento além da interação hospedeiro-parasito (BEN ABDA et al., 2011; FRANCINO et al., 2006).

Esta técnica também vem sendo utilizada para diferenciação de espécies de *Leishmania* (KHOSRAVI et al., 2012). Como pode ser observado no estudo de Khosravi et al. (2012) em que foi realizado a diferenciação de diferentes espécies do mesmo subgênero (*Leishmania*). Pita-Pereira et al.(2012), também usou a

técnica para diferenciação de subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.

Durante todo o processo de termociclagem é possível visualizar toda a reação em tempo real através de gráficos apresentados pelo monitor do equipamento. Por meio destes gráficos apresentados temos informações importantes (PAIVA-CAVALCANTI, 2008), como:

- Ciclo threshold- que nos informa o número de ciclos onde a fluorescência passa o threshold;
- Threshold- informa o desvio padrão da intensidade de emissão de fluorescência;
- Curva de amplificação- informa o ciclo das amostras em análise;
- Baseline- Ciclos iniciais da PCR.

Esta técnica é de fácil reprodutibilidade além de rápida, porém se faz necessário cuidados a fim de evitar contaminações (MARY et al., 2004).

Apesar de promissores os resultados da qPCR, a técnica ainda não é viável para aplicação clínica devido aos altos custos operacionais (GALLUZZI et al., 2018).

3 JUSTIFICATIVA

Diante da expansão da LV para regiões antes livres da doença e apresentar um quadro clínico muitas vezes assintomático, a LV vem se tornando uma preocupação para os bancos de sangue, uma vez que até o momento no Brasil não se conhece a real dimensão da transmissão transfusional.

Para a realização da doação de sangue, é necessário que a pessoa esteja se sentindo bem e que não esteja doente, qualquer sinal de doença o indivíduo vai ser impedido de realizar a doação. Porém, doenças como a *Leishmaniose* pode se apresentar muitas das vezes na forma assintomática, sendo o indivíduo um portador da doença, mesmo não apresentando nenhuma sintomatologia.

Sendo o assintomático um possível transmissor, traz consigo um grande risco para os envolvidos no processo de doação, principalmente para os receptores imunocomprometidos, pois a evolução da doença está ligada diretamente com o estado imunológico do indivíduo. A rápida expansão, os diferentes comportamentos de acordo com a região além de questões relacionadas à transmissão evidencia a grande importância da necessidade de métodos de triagem nos bancos de sangue.

Na fase assintomática se torna difícil o diagnóstico uma vez que os pacientes nesta fase apresentam um baixo nível de anticorpos e número reduzido de parasitas circulantes. Sendo assim são necessárias técnicas laboratoriais como a PCR direcionada ao kDNA. Esta técnica irá conseguir realizar a detecção do parasita mesmo em níveis baixíssimos.

Diante disto este estudo objetiva a identificação e caracterização da espécie de *Leishmania infantum* em doadores de sangue do hemocentro de Recife-PE por meios de métodos moleculares para um melhor resultado.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a prevalência da infecção assintomática por *Leishmania sp.* em doadores do hemocentro da cidade Recife-PE?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Estimar a prevalência da infecção assintomática por *Leishmania sp.* em doadores de sangue do hemocentro da cidade de Recife-PE

5.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil sociodemográfico dos doadores.
- Identificar e caracterizar por meio da qPCR DNA de *Leishmania sp.* em sangue periférico de doadores do HEMOPE.
- Confirmar por meio da PCR convencional espécies de *Leishmania infantum*. em doadores de sangue.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal e descritivo. As amostras foram fornecidas pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-HEMOPE unidade Recife. As análises moleculares foram realizadas na FIOCRUZ-Instituto Aggeu Magalhães.

6.2 População Estudada

Foram analisadas 500 amostras de sangue periférico e apenas participou do estudo amostras de sangue de doadores aptos para doação que compareceram no banco de sangue da cidade de Recife entre agosto de 2017 a setembro de 2017.

6.3 Amostra

Para o grupo de amostras foram selecionadas amostras aleatórias e probabilísticas, indivíduos que compareceram ao banco de sangue para realizar doação de sangue, que foram considerados aptos para o processo de doação e que aceitaram a participar da pesquisa.

Para determinar o tamanho amostral necessário de indivíduos doadores de sangue, foi realizado o cálculo para populações infinitas, usando a prevalência média da doença no Brasil que é de 12,74%, realizamos um cálculo com base nos autores Urias (2009) França (2013), Fukatani (2014). Desta forma, teremos a seguinte equação para o cálculo do tamanho amostral com base nas proporções:

$$N = \left(\frac{z_{\alpha} \cdot \sqrt{p \cdot q}}{E} \right)^2$$

Sendo:

n = Número de indivíduos na amostra

$Z_{\alpha/2}$ = Valor crítico, indicando o nível de confiança adotado. (95%)

E = Margem de erro máxima da estimativa. (5%)

p = Proporção de indivíduos que pertencem à categoria em estudo.

q = Proporção de indivíduos que não pertencem à categoria em estudo,

sendo que: $q = 1 - p$.

Nível de confiança de 95% e erro máximo de 5% temos o $n = 174$, porém serão totalizadas no estudo 500 amostras.

6.4 Critérios de Inclusão

Todos aqueles doadores considerados aptos para doação e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .

6.5 Critérios de Exclusão

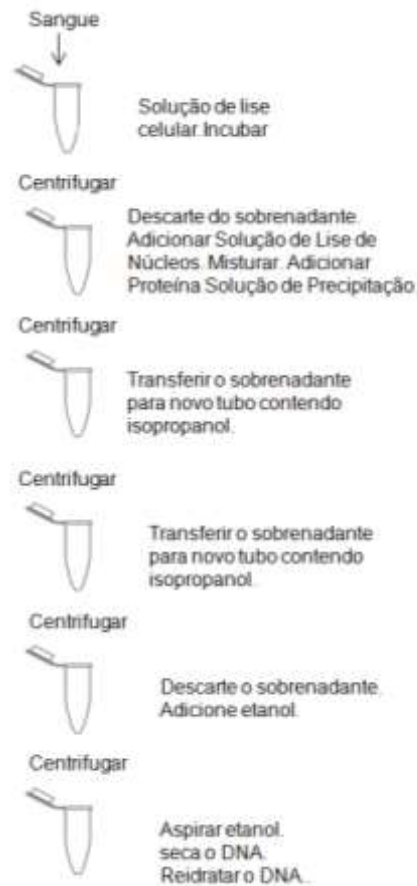
Foram excluídos do estudo todos aqueles positivos em algum teste sorológico realizado pelo HEMOPE.

6.6 Técnicas Laboratoriais Empregadas

6.6.1 *Extração de DNA das amostras*

A extração de DNA genômico das amostras de sangue periférico foram realizadas com a utilização do kit Wizard® Genomic DNA Purification, de acordo com as especificações do fabricante. Fig. 7

Figura 5- Extração de DNA pelo KIT Wizard® Genomic DNA Purification



Legenda 5. Extração realizada de acordo com as especificações do fabricante

6.6.2 PCR em Tempo Real

Para a realização da qPCR foi utilizado um ensaio descrito por Dantas-Torres e colaboradores (2016) com pequenas modificações. Em nosso ensaio modificado é utilizado a TaqMan® Genotyping master mix (Applied Biosystems) e para o processo de termociclagem configuramos as seguintes condições: 50° C durante 2 minutos, 40 ciclos a 95 ° C durante 10 minutos e 95° C durante 15 segundos e 60°C 1 minutos.

As demais condições do ensaio permaneceram como o original, foram utilizados os iniciadores específicos para *L. infantum* LEISH-1 (50- AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-30) e LEISH-2 (50- ACCCCCAGTTTCCCGCC-30) descritos por Francino et al, (2006), sonda TaqMan® FAM-50-

AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-non fluorescente quenche Rmgb.

6.6.3 PCR convencional

Para a confirmação e verificação da sensibilidade do teste foi realizado a PCR convencional. O volume final da reação foi de 25 µL, sendo composta de Tampão 1X, DNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5mM, iniciadores 10 pmol sendo eles o RLC2 (5'-GGGAAATTGGCCTCCCTGAG-3') e FLC2 (5'-GTCAGTGTCTGGAACTAATCCGC-3'), 100pb solução estoque e 10pb solução de uso. Taq Polimerase 0,2 u/µL, DNA 80 a 350 ng/µL, Água 13,75 µL. Como controle foi utilizado *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

No termociclador (Life Eco, Bioer versão 2,04), os ciclos foram de 95°C - 10 min, 35 ciclos de: 94°C – 1 minuto, 56°C - 1 minuto, 72°C - 30 segundos e extensão final de 72°C – 10 minutos.

Os produtos desta PCR foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão tris-borato- EDTA (TBE) 1X pH 8,0 a 150V e 400mA por 1h e 20 minutos, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado em luz ultravioleta.

7 PLANO DE TABULAÇÃO E FIGURA PARA ANÁLISE DE DADOS

Para tabulação dos dados será utilizado a planilha no Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond/Washington/Estados Unidos) e analisados pelo programa Epi-info™ 7.1.1.14 (Centers for Diseases Control and Prevention,Atlanta/Geórgia/Estados Unidos).

8 RESULTADOS

Artigo a ser submetido a revista POLS Neglected Tropical Diseases

Introdução

A Leishmaniose é uma doença negligenciada causada por diferentes espécies de *Leishmania*. As leishmanioses podem envolver três manifestações clínicas principais, que incluem lesões cutâneas, mucocutânea ou uma patologia visceral. Conhecida também como kala-azar a leishmaniose visceral (LV) é uma

doença endêmica tropical, que acomete cerca de 200 a 400 mil pessoas por ano mundialmente, sendo os países mais afetados, o Brasil, Índia, Sudão, Etiópia e Bangladesh [1]. A LV é uma doença causada pelo complexo *Leishmania donovani* no Leste da África e na Índia, e pela *Leishmania infantum* na Europa, Norte da África e América Latina e que pode ser fatal se não tratada [3,4]

A doença classificada nas formas assintomáticas, oligossintomática ou subclínica, aguda e crônica, podendo ter uma evolução para a forma grave [43].

Dentre o perfil clínico-imunológico o que mais vem chamando atenção é a forma assintomática, uma vez que os indivíduos assintomáticos podem estar atuando como reservatórios da doença, sendo isto um potencial fator para contribuição da expansão da infecção [2]; principalmente em relação aos bancos de sangue, uma vez que o assintomático morador de uma área endêmica pode ser um potencial doador de sangue [5].

Vários estudos em países como Bélgica, França, Índia, Brasil, Suécia e Reino Unido já relataram a transmissão vias transfusão sanguínea [45]. O primeiro caso relatado no mundo foi em 1948 na China [16]. No ano de 1991 a Organização Mundial da Saúde (OMS) levantou este alerta para os bancos de sangue [28]

Mesmo já havendo relatos na literatura sobre a transmissão transfusional da doença, no Brasil ainda não é realizado a triagem laboratorial para leishmaniose [7]. O que se torna um risco para os receptores destas bolsas de sangue uma vez que a doença está diretamente ligada a estado imunológico do indivíduo [8,9,10].

Diante do exposto e do aumento dos casos da doença, o presente estudo teve como objetivo verificar a prevalência da LV em doadores de sangue de um banco de sangue localizado na cidade de Recife, capital do estado de Pernambuco, localizado no Nordeste Brasileiro.

Métodos

Local de estudo e amostra

O estudo foi realizado agosto de 2017 a setembro de 2017 no banco de sangue da cidade do Recife (8° 3' 15" sul, longitude: 34° 52' 53" oeste) capital do estado de Pernambuco (fig 1).

Figura 1. Mapa do Brasil em destaque Pernambuco e a capital Recife



Mapa do Brasil em destaque a região Nordeste e estado de Pernambuco.

Participaram do estudo 500 doadores de sangue considerados aptos para doação que compareceram ao banco de sangue HEMOPE (Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco) no período supracitado. Os doadores eram de diferentes áreas do estado, não apenas da capital Recife, local de endereço onde o banco de sangue fica localizado.

A abordagem ao doador foi feita no momento do procedimento de doação, onde se realizava o convite a participação da pesquisa, após todos os esclarecimentos e assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), o doador respondia a um questionário sociodemográfico sobre idade (18 a 25 anos, 26 a 33 anos, 34 a 41 anos, 42 a 50 e 51 a 60), cor (Branco, Negro, Pardo, Amarelo, outra) escolaridade (1º ao 5º ano, 6º ao 9º ano, ensino médio e ensino superior), renda por salário mínimo (1-2 salários, 3-4 salários, 5-6 salários, mais de 7 salários, local moradia de acordo com a divisão das mesorregiões do estado de Pernambuco (Recife- Capital, Região Metropolitana, Zona da Mata, Agreste, Sertão, Outro estado), logo em seguida era realizado a coleta sanguínea a ser analisada em laboratório. Todo o estudo foi aprovado nos comitês de ética e pesquisa das instituições envolvidas (65770317.9.0000.5190).

Amostras

As amostras de sangue foram coletadas em tubos com EDTA (ácido etileno diamina tetra acético) previamente identificadas com o código de barra do doador, onde após toda a triagem laboratorial do banco de sangue, eram recolhidas

alíquotas de 600µL, sendo transferido para um eppendorf para transporte no qual era realizado em caixa térmica com gelo seco e encaminhado para o Instituto Aggeu Magalhães – IAM - FIOCRUZ-PE. Todas as alíquotas ficaram sobre refrigeração -80 °C até serem analisadas. As referidas amostras eram colhidas após a triagem do banco de sangue

Extração de DNA das amostras

A extração de DNA genômico das amostras de sangue periférico foram realizadas com a utilização do kit Wizard® Genomic DNA Purification, de acordo com as especificações do fabricante.

PCR em tempo real

Para a realização da qPCR foi utilizado um ensaio descrito por Dantas-Torres et al (2016) com pequenas modificações [11]. Em nosso ensaio modificado é utilizado a TaqMan® Genotyping master mix (Applied Biosystems) e para o processo de termociclagem configuramos as seguintes condições: 50° C durante 02:00 (minutos), 40 ciclos a 95° C durante 10:00 (minutos) e 95° C durante 15 segundos e 60°C 01:00 (minutos). As demais condições do ensaio permaneceram como o original, foi utilizado os iniciadores específicos para *L. infantum* LEISH-1 (50-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-30) e LEISH-2 (50-ACCCCCAGTTTCCCGCC-30) e TaqMan® FAM-50-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-non fluorescente quenche rMGB de acordo com Francino et al [12].

Para a análise das amostras foi realizada em duplicata inclusive a curva de diluição também em duplicatas (10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg).

PCR convencional

As amostras positivas na qPCR foram submetidas a PCR convencional para confirmação da espécie. O volume final da reação foi de 25 µL, sendo composta de tampão 1X, DnTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5mM, iniciadores 10 pmol sendo eles o RLC2 (5'-GGGAAATTGGCCTCCCTGAG-3') e FLC2 (5'-GTCAGTGTCGGAACTAATCCGC-3') 100pb solução estoque e 10pb solução de

uso. Taq Polimerase 0,2 u/μL, DNA 80 a 350 ng/μL, Água 13,75 μL. Como controle foi utilizado *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*. No termociclador (Life Eco, Bioer versão 2,04), os ciclos foram de 95°C - 10 min, 35 ciclos de: 94°C - 1 minuto, 56°C - 1 minuto, 72°C - 30 segundos e extensão final de 72°C - 10 minutos, os produtos desta PCR foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X pH 8,0 a 150V e 400mA por 1h e 20 minutos, os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5μg/mL) e visualizado em luz ultravioleta.

Resultados

Foram analisadas amostras de sangue periférico de 500 doadores de sangue, 42,6% (214) eram do sexo feminino e 57,4% (287) do sexo masculino. 35,0% (175) consideravam-se pardos, seguido por brancos 30,4% (152) e negros 25,0% (127), enquanto aos demais juntos somaram 9,2% (46).

Em relação à idade observamos o grupo de 18 – 25 anos corresponderam a 50,2% (251) dos doadores, 26-33 anos 27,4% (137), 34-41 12,2% (61), 42-50 8,2% (41) e por fim de 51-60 2,0% (10). A partir dos dados, observamos que os grupos de 18 a 25 anos e o grupo de 26 a 33 correspondem a mais de 70% do grupo total de doadores.

Quanto à escolaridade a predominância daqueles que tinham ensino superior e médio correspondeu a 95,8% (479) dos doadores, aqueles que tinham apenas o ensino fundamental I e II corresponderam a 4,2% (21).

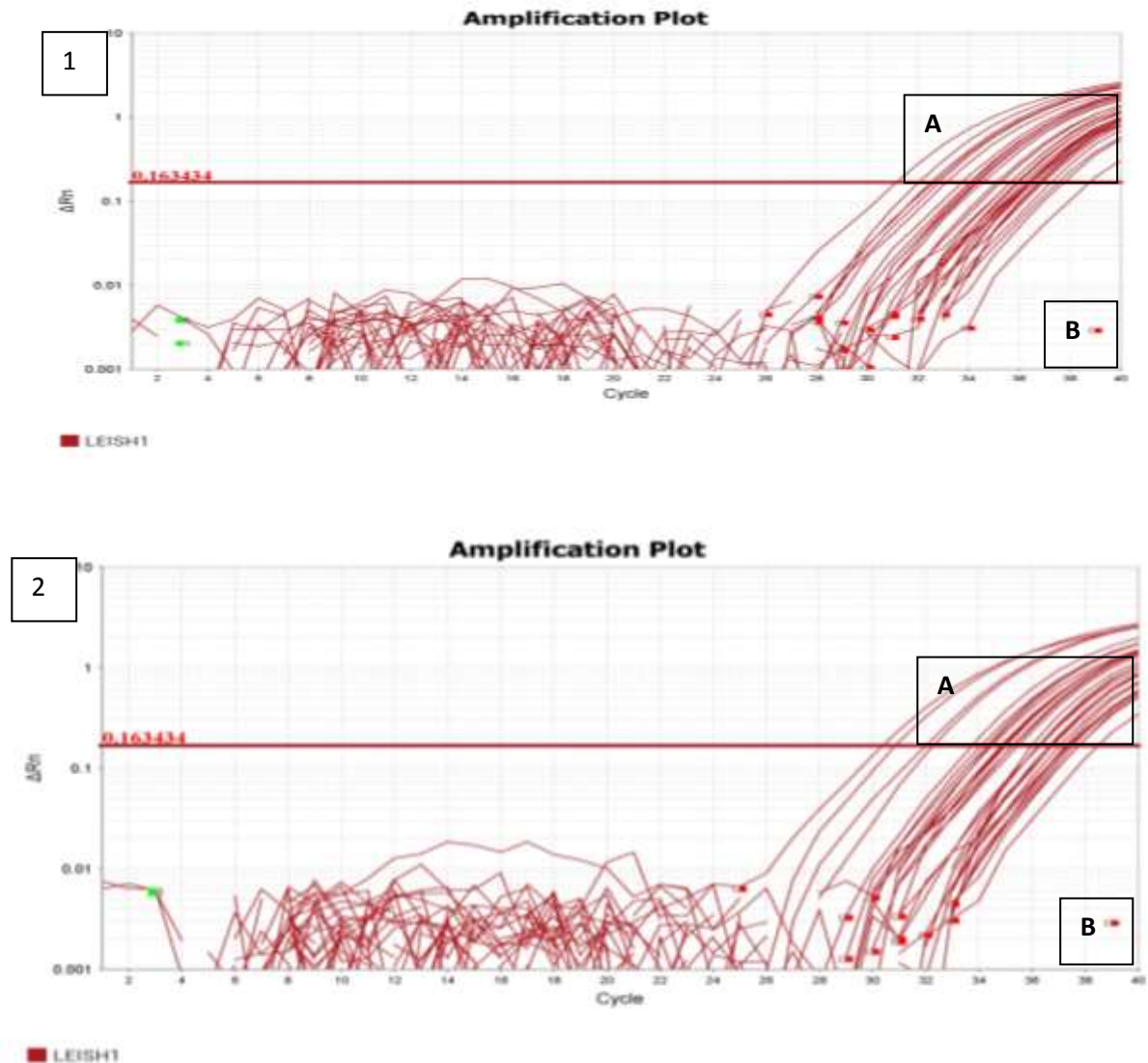
Apesar de ser localizado na cidade do Recife 45,5% (227) dos doadores residem na capital pernambucana. Já os residentes dos demais municípios da região metropolitana corresponderam a 42,0% (210), oriundos da zona da mata 9,8% (49), do agreste 2,2% (11), já do sertão pernambucano 0,4% (2) e de outro estado 0,2% (1).

Ao serem perguntados sobre o fornecimento de água encanada, 99,6% (498) afirmaram ter acesso. Apenas 0,4% (2) afirmaram não ter acesso ao fornecimento de água. Enquanto ao tipo de rede de esgoto 87,2% (436) informaram ter acesso a saneamento básico, 5,2% (26) não tinham acesso e 7,6% (38) não sabiam informar.

Detecção por meio da qPCR

Ao submeter as amostras a qPCR foram identificadas 31 amostras de sangue com a presença do DNA do parasito da *L. infantum*.

Fig 2. Placa qPCR com as amostras positivas



Legenda: Gráficos de amplificação que representam as curvas das amostras positivas para a presença de DNA de *Leishmania infantum*, 1 e 2 representam a duplicata das amostras na mesma placa. (A – amostras, B- Controle negativo)

Fig 3. Placa de qPCR com a Standard Curve

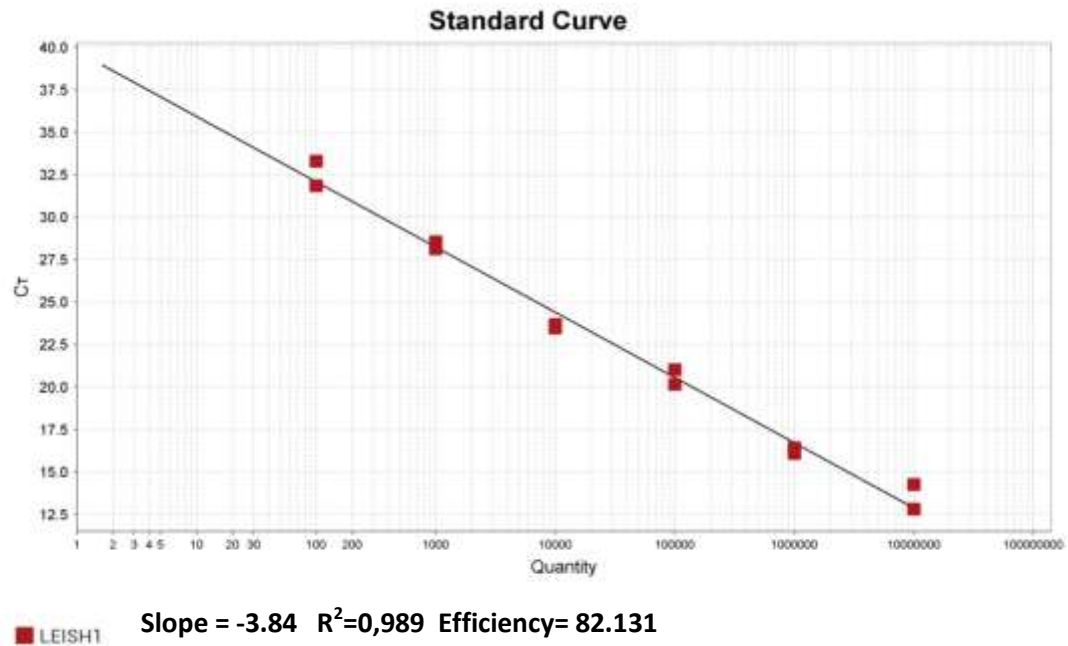
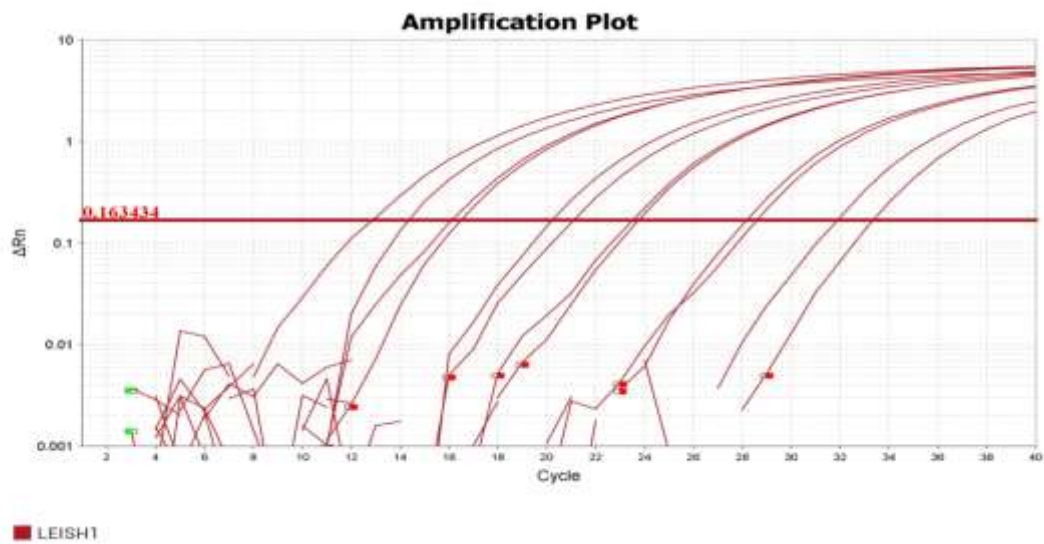


Fig 4. Placa de qPCR com a curva de diluição



Legenda: Gráficos de amplificação que representam a curvas padrão (de 10 ng, 100pg, 10pg, 1pg,100fg, 10fg) com DNA de *Leishmania infantum*.

Perfil dos doadores de sangue com presença de DNA do parasito

Tabela 1. Características sócio-demográficas dos doadores que tiveram a presença de DNA do parasito em sangue periférico

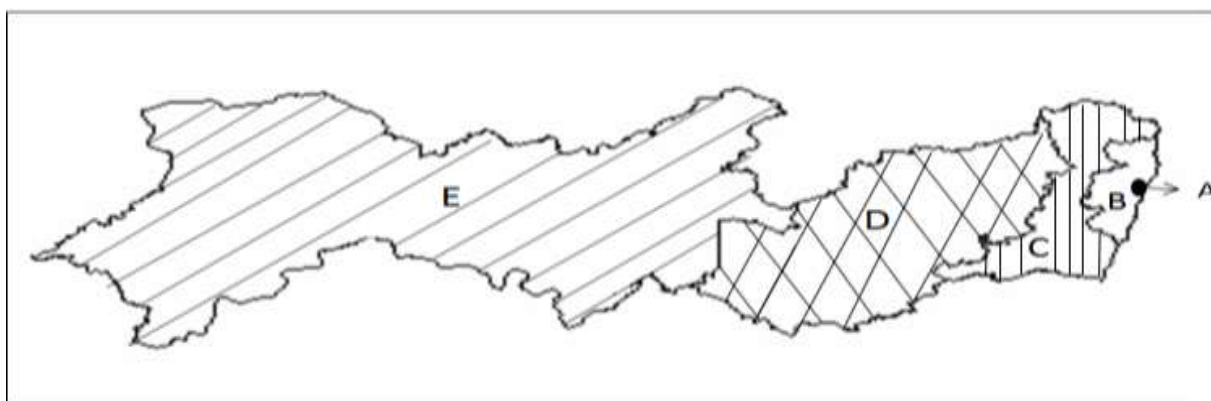
CASOS 31		
	Nº	%
GÊNERO		
Feminino	17	54,8
Masculino	14	45,2
RAÇA		
Branca(o)	10	32,3
Negra(o)	10	32,3
Amarela(o)	1	3,1
Parda(o)	10	32,3
IDADE		
18-25 anos	17	54,8
26-33 anos	9	29,0
34-41 anos	2	6,5
42-50 anos	3	9,7
ESCOLARIDADE		
1º ao 5º ano	0	0
6º ao 9º ano	0	0
Ensino Médio	11	35,5
Ensino Superior	20	64,5

Renda familiar		
1 – 2 salários mínimos	16	51,6
3 – 4 salários mínimos	12	38,7
5 – 6 salários mínimos	2	6,5
Mais de 7 salários mínimos	1	3,2

Local de moradia

A localidade da residência dos doadores foi predominante na região metropolitana, seguido pela capital Recife e Zona da mata (fig.4).

Figura 5. Título: Mapa de Pernambuco dividido por mesorregiões de acordo como o local de moradia dos doadores infectados.

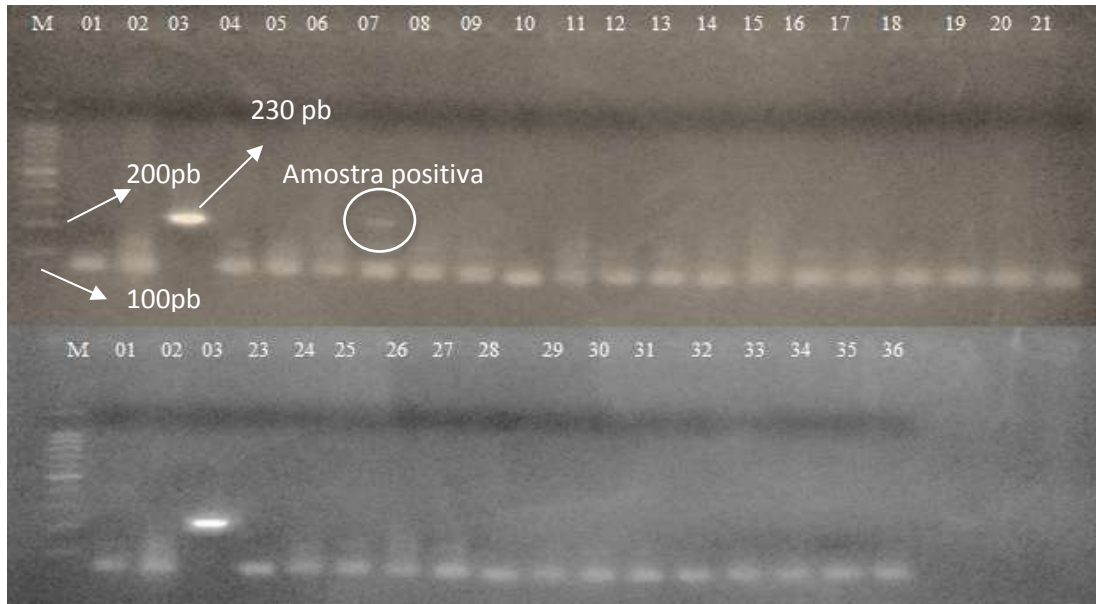


Legenda: A- Recife (14 doadores), B- Região Metropolitana do Recife (15 doadores), C- Zona da Mata (2 doadores), D- Agreste e E- Sertão não houve doadores infectado com o parasito.

Identificação das espécies

As amostras de DNA de doadores que foram positivas para presença de DNA de *L. infantum* por meio da qPCR, foram submetidos a PCR convencional para confirmação da *L. infantum*, utilizando *primers* específicos. Apenas em uma amostra foi possível confirmar a espécie *L. infantum*, as demais possivelmente pela carga parasitária, não foi possível realizar a confirmação, demonstrando-se não ser um método eficiente para ser aplicado em assintomáticos (Fig.6)

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose para identificação de espécie.



Legenda: Corrida com as amostras dos infectados para identificação de espécie. M - marcado de 100pb, 01 e 36-Controle negativo, 02-Controle positivo (*L.b*), 03-Controle positivo (*L.i*) e de 04 até 35 amostras.

Em outro gel foi realizado uma corrida apenas com uma diluição 8X (10ng, 1ng, 100pg, 1 pg, 100fg, 10 fg, 1 fg) de um controle positivo de *L. infantum* onde foi observado que a PCR convencional só conseguiu detectar aquelas amostras com até 1pg de DNA (fig.5).

Figura 7. Título: PCR convencional-Diluição.



Legenda: Corrida em gel de agarose com a diluição 7x do controle positivo *L. i*. 1- Marcador; 2- 10 ng; 3- 1ng ; 4-100 pg; 5- 10 pg; 6- 1 pg; 7 -100 fg; 8- 10 fg; 9- Controle negativo

Discussão

A primeira vez que foi utilizada a definição de “assintomático” foi no ano de 1974 em uma região do norte da Itália, após um surto da doença [13]. Já no Brasil a primeira vez em que foi utilizado o termo “assintomático” foi no ano de 1986 em um estudo realizado no município de Jacobina no estado da Bahia [14].

Sendo um indivíduo assintomático e um potencial transmissor da doença, estudos começaram a abordar o papel deste indivíduo nos bancos de sangue. O primeiro trabalho que relata transmissão via transfusão sanguínea foi em 1948 na China, o estudo relata que uma mãe foi diagnosticada com a doença pouco depois de realizar uma doação de sangue para os seus dois filhos, sendo realizado o acompanhamento destas crianças foi visto que após nove meses de transfusão as crianças desenvolveram a doença [16].

Outros casos de transmissão começaram a serem descritos em países como Bélgica, França também envolvendo crianças [17,18]. No Brasil o primeiro estudo publicado em que levanta a hipótese da transmissão da doença ocorreu em 1997. O estudo foi realizado no Rio Grande do Norte com 1500 doadores de sangue [19].

No presente estudo, verificamos a prevalência da *Leishmania sp.* em doadores de sangue, assim como também realizamos a identificação do parasito circulante e relacionamos todos resultados com as características sociodemográficas dos participantes da pesquisa. O objetivo do trabalho foi verificar esta prevalência em doadores de sangue de um banco de sangue localizado na cidade de Recife-PE.

Nossos resultados demonstraram que a prevalência da infecção assintomática por *leishmania infantum* em doadores de sangue foi de 6,2%, utilizando os métodos moleculares.

Em um estudo anterior, realizado Ceará. Em uma população de 438, a prevalência foi menor utilizando o diagnóstico molecular, porém foi utilizado a PCR convencional [24]. Esta variação da prevalência também é observada quando aplicado os diagnósticos sorológicos, como podemos observar no estudo do Rio Grande do Norte (RN) com 438 a prevalência foi de 12,2% sendo aplicado o ELISA [25]; em um outro estudo também realizado no RN onde uma população de 1.194 doadores 9% foram positivos [19]; a maior prevalência de 15,6% foi observada no Mato Grosso do sul em uma população de 430 doadores [23]. Toda esta variação

da prevalência está dentro dos números esperados uma vez que no panorama mundial há uma variação na prevalência da infecção assintomática de 0,05% a 73,4% dependendo da população estudada e a técnica de diagnóstico utilizada [10].

O que chama a atenção é a quantidade de estudos que utilizam os métodos sorológicos para diagnósticos, isto devido a fácil e rápida reprodutibilidade dos testes em questão. Entretanto, o diagnóstico sorológico apresentam algumas limitações que pode passar despercebido uma vez que utilizamos amostras de indivíduos assintomáticos. Por este motivo realizamos apenas o diagnóstico molecular devido à boa sensibilidade e especificidade que podem atingir até 95,7% [30]; além de ser uma técnica utilizada para identificação de espécies [31].

Faz-se importante destacar que em casos de pesquisa de anticorpos contra *Leishmania* quando reagente, não quer dizer que este indivíduo esteja com uma infecção ativa. O que pode ocorrer para esta reação positiva é a exposição deste indivíduo em algum momento ao parasito [39,40,41]. Isso explica a razão da prevalência deste estudo ter um valor menor ao ser comparado com os estudos que realizaram métodos sorológicos, pois foi utilizado a qPCR, método muito mais específico e sensível.

No presente estudo foi realizado também a caracterização da espécie por meio da qPCR, sendo confirmada pela PCR convencional, entretanto, das 31 amostras positivas para *L. infantum* na qPCR, apenas uma positivou na PCR convencional, já que a curva de diluição a sensibilidade foi até 1 pg de DNA, esse resultado sugere a baixa parasitemia, fato este observado por Fisa et al, (2001) e Mona et al, (2004) [49;50]. Além disso, de acordo com Lachaud et al, (2002) os resultados desta técnica podem ter variação muito grande de acordo com o tipo da amostra e até com o prime utilizado [48]. Diante disto, nota-se que a PCR convencional não é indicada para assintomáticos, uma vez que não vai ocorrer a detecção em baixas cargas parasitárias.

Para isto o mais indicado é a Tempo Real, como mostra o estudo de Dantas-Torres (2016) que em seu ensaio a PCR em Tempo Real conseguiu realizar a detecção até 1 fentograma de DNA, utilizando um volume de apenas 15 µL por reação, e com um tempo 34 minutos [11]. Devido as modificações do ensaio realizado neste estudo, não foi possível reproduzir com exatidão o estudo citado, porém, mesmo assim os resultados obtidos foram satisfatório.

Ao identificar as amostras positivas para presença do DNA do parasito, relacionamos estes resultados com as características sociodemográficas desta população. Com isto foi identificado que a presença do DNA do parasito foi maior no sexo feminino do que no sexo masculino, a diferença entre os sexos apesar de não ser significativa também foi relatada em um estudo realizado no Paraná [22]; assim como também foi descrita e no estudo de Urias et al,(2009) em que a prevalência foi de 52,2% o sexo feminino [21]. Porém, o que chama a atenção são os estudos que divergem onde a prevalência maior é no sexo masculino, como exemplo no estudo realizado por Fukutani et al, (2014) que de 38 doadores assintomáticos 81,5% eram do sexo masculino [24]; prevalência parecida com a de Monteiro (2013) nesse estudo com 58 assintomáticos, 75,9% eram do sexo masculino [32].

Nossos resultados quanto à raça demonstram um equilíbrio entre as raças, negra, branca e parda. Vale ressaltar que estes dados são referentes a população assintomática. Este cenário muda quando comparamos os nossos resultados com uma população sintomática como podemos verificar no estudo de Lisboa e colaboradores (2016) em que 65% do seu grupo de estudo se declaravam pardos [46], está maior prevalência em pardos também foi relatada por Barbosa e Costa (2013) [47]. Nosso estudo diverge dos demais, pois estamos trabalhando com assintomático e até o momento na literatura não foi achado esta comparação com esta determinada população.

No Brasil, de acordo com os dados disponibilizados pelo ministério da saúde a taxa de letalidade entre os anos de 2001 a 2015 chega a 6,89%. Das regiões brasileiras, as que tiveram uma maior porcentagem de letalidade foram o Centro-Oeste (9,34%) seguido da região sudeste (9,23%), a região nordeste teve uma porcentagem de 6,36% e a região norte 4,89% [5]. O que demonstra a negligência e ausência de medidas efetivas em todas as regiões do Brasil.

Apesar de o nosso estudo não ter localizado doadores positivos residentes no sertão e no agreste isto não representa que nestas regiões a doença esteja ausente. Isso se deve à baixa demanda de doadores provenientes destas localidades. Apenas no ano de 2016 em Pernambuco foram 473 casos notificados e confirmados, os municípios que mais se destacaram foram Tamandaré, Goiana (Zona da Mata), Caruaru, Salgueiro (Agreste), Santa Cruz, Lagoa Grande, Santa Maria da Boa Vista, Petrolina, Ouricuri e Carnaubeira da Penha, Serra Talhada (Sertão) [5]. Atualmente LV encontra-se expandida em todas as regiões do estado

[26]. Os resultados do presente estudo condizem com os trabalhos em que descrevem o ambiente urbano como um lugar onde as características sociais e demográficas têm um grande impacto para a expansão da doença [32]. O que justifica a doença na capital Recife e no restante da Região metropolitana. Apesar de existirem estudos que demonstram a distribuição da doença no estado se faz necessários estudos focados principalmente nos assintomáticos.

Quando analisado os dados referentes à idade, foi observado uma concentração maior no grupo de 18-25 anos, ou seja, no grupo mais jovem, o nosso resultado chama a atenção uma vez que a maior prevalência da doença se concentra na população com mais idade [35]. Assim como é demonstrado no estudo de Braga et al, (2015) em que na população de doadores assintomáticos 20% tinham mais de 50 anos [22]. O grupo mais jovem se destacou no estudo por ser o grupo que realiza o maior número de doação nos bancos de sangue, refletindo diretamente nos resultados.

Diante do exposto, pode-se observar a real possibilidade de transmissão transfusional da doença visto que atualmente no Brasil não é realizado a triagem para *Leishmania* spp. [36]. Com isto, observamos o quanto os envolvidos no processo de doação estão expostos ao risco de infecção, vale ressaltar que a prevalência presente neste estudo se deu principalmente pelo fato da localização do HEMOPE/Recife ser centralizada e de fácil acesso. Em um estudo realizado por Asfaram et al, (2017) apontam a real necessidade de realização de testes sorológicos e moleculares, mesmo assim na presença de positividade a bolsa não precisa ser descartada, pode-se fazer a leucodepleção com sistema de filtros que impedem a passagem do parasito, evitando assim a transmissão do parasito pela bolsa de sangue [37].

Mesmo não existindo conhecimento sobre o risco real de transmissão transfusional, é necessário medidas profiláticas comprometidas com a saúde pública e dessa forma, a adoção da triagem para *Leishmania* spp. nos bancos de sangue no Brasil é indispensável.

Agradecimentos

Ao Instituto Aggeu Magalhães FIOCRUZ-Recife por disponibiliza toda a estrutura para realização da pesquisa, ao HEMOPE por aceitar ser uma instituição parceira, ao fundo de financiamento FACEPE e a CNPq pela bolsa concedida.

Referências

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
2. ALVES, Waneska Alexandra; FONSECA, Darises Soares. Leishmaniose visceral humana: Estudo do perfil clínico-epidemiológico na região leste de Minas Gerais, Brasil. Journal of Health & Biological Sciences, 6,2, 133-139, 2018.
3. Stauch A, Sarkar RR, Picado A, Ostyn B, Sundar S, Rijal S, et al. Visceral leishmaniasis in the indian subcontinent: Modelling epidemiology and control. PLoS Negl Trop Dis 2011;5. doi:10.1371/journal.pntd.0001405.
4. de Carvalho MR, Lima BS, Marinho-Júnior JF, da Silva FJ, Valença HF, Almeida FDA, et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. Cad Saude Publica / Minist Da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica 2007;23:1227–32. doi:10.1590/S0102-311X2007000500024.
5. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano Integrado de Ações para o Enfrentamento às Doenças Negligenciadas-Programa SANAR, 40-42, 2016
6. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 2007;5:873–82. doi:10.1038/nrmicro1748.
7. Brasil.MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue. Brasília, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 110p.
8. Jimenez-Marco T, Fisa R, Girona-Llobera E, Cancino-Faure B, Tomás-Pérez M, Berenguer D, et al. Transfusion-transmitted leishmaniasis: A practical review. Transfusion 2016; 56: S45–51. doi:10.1111/trf.13344.
9. Cardo LJ. *Leishmania*: risk to the blood supply. Transfusion 2006;46(9):1641–5.

10. Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop* 2011;119:69–75. doi:10.1016/j.actatropica.2011.05.012.
11. Dantas-Torres F, da Silva Sales KG, Gomes da Silva L, Otranto D, Figueredo LA. Leishmania-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *Mol Cell Probes* 2016;6–10. doi:10.1016/j.mcp.2016.08.006.
12. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006;137:214–21. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.011.
13. Pampiglione S, Manson-Bahr PEC, Giungi F, Giunti G, Parenti A, Trotti GC. Studies on mediterranean leishmaniasis: 2. asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974;68:447–53. doi:10.1016/0035-9203(74)90067-4
14. Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986;154:639–49. doi:10.1093/infdis/154.4.639..
15. Andre, et al. Leishmaniose cutanee-ganglionnaire et kala-azar transfusional. *Tropical Diseases Bulletin*, 55, 379-381,1958.
16. Chung, H., Chow, H., Lu, J., 1948. The first two cases of transfusion kala-azar. *Chin. Med. J.* 66, 325–326.
17. Kostman et al. Kala-azar transferred by exchange blood transfusion in two Swedish infants. In: *Proceedings of the seventh international congress of tropical medicine and malaria*. World Health Organization: Geneva, Switzerland p. 384; 1963.
18. Cohen C, Corazza F, De Mol P, Brasseur D. Leishmaniasis acquired in Belgium. *Lancet* 1991;338:128. doi:10.1016/0140-6736(91)90129-D.
19. Luz KG, Da Silva VO, Gomes EM, Machado FCS, Araujo MAF, Fonseca HEM, et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:168–71. doi:10.4269/ajtmh.1997.57.168.
20. Otero ACS, Da Silva VO, Luz KG, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O, et al. Short report: Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:128–31. doi:10.4269/ajtmh.2000.62.128.
21. Urias, Elaine V. R. et al. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania Leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de

- Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. São Paulo, v. 31, n.5, p. 348-354, 2009.
22. Braga LS, Navasconi TR, Leatte EP, Skraba CM, Silveira TGV, Ribas-Silva RC. Presence of *anti-leishmania (viannia) braziliensis* antibodies in blood donors in the west-central region of the state of Paraná, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2015;48:622–5. doi:10.1590/0037-8682-0043-2015.
 23. França A de O, Castro VL de, Junior MS da CL, Pontes ERJC, Dorval MEC. *Anti-Leishmania* antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. Transfus Apher Sci 2013;49:627–30. doi:10.1016/j.transci.2013.07.009.
 24. Fukutani KF, Figueiredo V, Celes FS, Cristal JR, Barral A, Barral-Netto M, et al. Serological survey of Leishmania infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. BMC Infect Dis 2014;14:422. doi:10.1186/1471-2334-14-422.
 25. Monteiro, D.C. et al. *Leishmania infantum* Infection in Blood Donors, Northeastern Brazil. Emerg Infect Dis. 2016 Apr;22(4):739-40. doi: 10.3201/eid2204.150065.
 26. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco TT - Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 2006;39:352–6.
 27. Cardo, Lisa J. Leishmania: risk to the blood supply. Transfusion, v. 46, 9, 1641-1645, 2006.
 28. WHO. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Technical Report Series 811, pp. 1-95.
 29. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. Lancet Infect Dis 2008;8:191–9. doi:10.1016/S1473-3099(08)70043-4.
 30. REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008
 31. Silva MAL da, Medeiros RA, Filho SB-, Melo FL de, Medeiros Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Rev Eletrônica Farmácia 2010;7:15. doi:10.5216/ref.v7i3.12947.
 32. Monteiro, D.C.S. Prevalência de leishmaniose visceral assintomática em doadores de sangue, em área endêmica do Ceará. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará- Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós Graduação em Patologia, Fortaleza, 2013.

33. Freire, S. M.; Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. [Mestrado] Universidade Federal do Piauí, 2010
34. Queiroz, P. V.S. de. Aspectos clínicos e imunológicos da infecção por *Leishmania Infantum chagasi* em cães do Rio Grande do Norte. Natal/RN, 2012. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde.
35. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A, Romano A, Ferroglio E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. J Clin Microbiol 2010;48:131–6. doi:10.1128/JCM.00416-09.
36. de Andrade AL, Martelli CM, Pinheiro ED, Santana CL, Borges FP, Zicker F. Rastreamento sorológico para doenças infecciosas em banco de sangue como indicador de morbidade populacional. Rev Saude Publica 1989;23:20–5. doi:10.1590/S0034-89101989000100004.
37. Asfaram S, Fakhar M, Soosaraei M, Hosseini Teshnizi S, Mardani A, Banimostafavi ES, et al. Global status of visceral leishmanial infection among blood donors: A systematic review and meta-analysis. Transfus Apher Sci 2017. doi:10.1016/j.transci.2017.09.007.
38. França-Silva JC, Barata RA, Da Costa RT, Monteiro ÉM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. Vet Parasitol 2005;131:213–20. doi:10.1016/j.vetpar.2005.05.006.
39. Sirvent-von Bueltzingsloewen A, Marty P, Rosenthal E, Delaunay P, Allieri-Rosenthal A, Gratecos N, et al. Visceral leishmaniasis: A new opportunistic infection in hematopoietic stem-cell transplanted patients [1]. Bone Marrow Transplant 2004;33:667–8. doi:10.1038/sj.bmt.1704396.
40. Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of Leishmaniasis. Adv Parasitol 1993;32:161–259. doi:10.1016/S0065-308X(08)60208-0.
41. Riera C, Fisa R, Lopez-Chejade P, Serra T, Girona E, Jimenez M, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). Transfusion 2008;48:1383–9. doi:TRF01708 [pii]r10.1111/j.1537-2995.2008.01708.x.
42. Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Júnior G, Momen H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz 1985;80:349–57. doi:S0074-02761985000300012.

43. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004;7:338–49. doi:10.1590/S1415-790X2004000300011.. [1]
44. Gama MEA, Costa JML, Gomes CMC, Corbett CEP. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:889–93. doi:10.1590/S0074-02762004000800018.
45. Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol* 2006;24:165–70.
46. Lisboa, A. R., Leite, F. C., Dantas, A. E. F., de Oliveira, I. B., Evangelista, T. R., & de Sousa, J. B. G. (2016). Análise epidemiológica de leishmaniose visceral em Municípios do Sertão Paraibano. *Revista Brasileira de Educação e Saúde*, 6(3), 05-12
47. Barbosa, I. R., Silva Neto, R. D., Souza, P. P., Silva, R. A., Lima, S. R., Cruz, I. D. S., & Costa, Í. D. C. C. (2014). Aspectos da Coinfecção Leishmaniose visceral e HIV no Nordeste do Brasil. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 37(3), 672-687.
48. Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., & Bastien, P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*, 40(1), 210-215.
49. Fisa, R., Riera, C., Gallego, M., Manubens, J., & Portús, M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, 99(2), 105-111.
50. Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L. M., Della Morte, R., ... & Gravino, A. E. (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 125(3-4), 251-262.

9 CONCLUSÃO

Os indivíduos assintomáticos infectados por *Leishmania* sp. estão presentes na população de doadores de sangue em Recife-PE, sem haver nenhum sistema de triagem para *Leishmania*, facilitando assim uma eventual transmissão transfusional.

A presença de *L. infantum* nos doadores aptos a doação requer acompanhamento médico uma vez que os assintomáticos não podem ser tratados.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. C. R. et al. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an urban area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 698–702, 2016.
- ALAM et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine International Health**, v.14, n.5, p. 499-503, 2009.
- ALBORZI, Abdolvahab et al. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in the whole blood of asymptomatic individuals by PCR-ELISA and comparison with other infection markers in endemic areas, southern Iran. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 6, p. 839-842, 2008.
- ALBUQUERQUE, M. F. P. M. Urbanização, favelas e endemias: A produção da filarioseno Recife, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 487-497, 1993.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. 356-71, 2012.
- ALVES. W., A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n.1, p. 259-265, 2004.
- ANDRADE, Bruno B. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.
- ANDRE, R. et al. Leishmaniose Cutanee. Leishmaniose cutanee-ganglionnaire et kala-azar transfusional. **Trop Dis Bull**, v. 55, p. 379-81, 1958.
- ANTINORI, S.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; BIANCHI, R.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **Lancet Infect Dis**, v.8, p.191–99, 2008.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

BADARO, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.

BARBOSA et al. Novas evidências sobre o valor diagnóstico da reação de imunofluorescência indireta e reação intradérmica de hipersensibilidade tardia na infecção humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi* na Amazônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 33-44. 2010.

BARRAL, Aldina et al. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 4, p. 947, 1995.

BASTIEN, Patrick; PROCOP, Gary W.; REISCHL, Udo. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1897-1900, 2008.

BELL, Andrew S.; RANFORD-CARTWRIGHT, Lisa C. Real-time quantitative PCR in parasitology. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 338-342, 2002.

BEN ABDA, I. et al. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 1, p. 17-22, 2011.

BHATTACHARYYA, Sandip et al. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. **Infection and immunity**, v. 69, n. 3, p. 1499-1507, 2001.

BIGLINO, A et al. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont Region) where such infections are traditionally nonendemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 131-136, Jan. 2010.

BRAGA, Lais de Souza et al. Presence of *anti-Leishmania (Viannia) braziliensis* antibodies in blood donors in the West-Central region of the State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 622-625, 2015.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. **Sistema Nacional de Agravos e Notificações**. Situação Epidemiológica Dados. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de->

a-z/leishmaniose-visceral/11334-situacao-epidemiologica-dados acessado em 11-03-2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. . **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Ceará. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde**, p. 38, Brasília, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. .**Plano Integrado de Ações para o Enfrentamento às Doenças Negligenciadas-Programa SANAR**, p. 40-42, 2016

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica. Serie A. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue**. Brasília, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 110p.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**. 2007.

BRAZIL. Cadernos de saúde publica, v. 24, p. 2445-2448, 2008.BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 2006.

BRITO, Maria Edileuza Felinto de et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

BRITO, Veruska Nogueira de et al. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Jaciara,Mato Grosso, Brazil, 2003 to 2012. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal , v. 23, n. 1, p. 63-68, Mar. 2014 .

CARDO, Lisa J. Leishmania: risk to the blood supply. **Transfusion**, v. 46, n. 9, p. 1641-1645, 2006..

CARVALHO, Edgar M. et al. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 3, p. 273-277, 1995.

CARVALHO, Fernanda Torres de et al. Cadernos de Saúde Pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 2023-2033, 2007.

CASTELLUCCI, Léa et al. IL6- 174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 4, p. 519-527, 2006.

CAVALCANTE, Ítalo José Mesquita; VALE, Marcus Raimundo. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo , v. 17, n. 4, p. 911-924, Dec. 2014

COHEN, C.; CORAZZA, F.; DE MOLL. P.; BRASSEUR, D. Leishmaniasis acquired in Belgium. *The Lancet*, v. 338, n. 8759, p.128, July 1991.

COSTA, Jackson Mauricio Lopes et al. **Epidemiologia das leishmanioses no Brasil**. 2005.

CUERVO-ESCOBAR, et al. T-cell populations and cytokine expression are impaired in thymus and spleen of protein malnourished BALB/c mice infected with *leishmania infantum*. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114584. 2014.

CUMMINS,et al. Visceral leishmaniasis after cardiac surgery. **Archives of Disease in Childhood**, v. 72, n. 3, p.235-236, Mar. 1995.

CUNNINGHAM, Anna C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DABIRZADEH, et al. "Study of Genetic Variation of *Leishmania Major* Based on Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) in Chabahar, Iran." **Jundishapur Journal of Microbiology** 9.6 (2016): e33498. PMC. Web. 4 Jan. 2017.

DANTAS-TORRES, Filipe. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. S1, 2009.

DANTAS-TORRES, Filipe; BRANDÃO-FILHO, Sinval P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DANTAS-TORRES; et al. *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Rev Molecular and Cellular Probes**. v.31,n.,p 65-69.2016

DAS, V. N.; et al. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to ka-lazar elimination programs. **The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 11, p. 661-666, Nov. 2011

DE FREITAS BALANCO, José Mario et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**, v. 11, n. 23, p. 1870-1873, 2001.

DE FREITAS, et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.159-67, 2006.

DE MORAIS, Rayana Carla Silva et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and applied acarology**, v. 59, n. 4, p. 473-481, 2013.

DE RUITER, C. M. et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3147-3155, 2014.

DE RUITER, C. M. et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3147-3155, 2014.

DEGRAVE, Win et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. **Indian journal of medical microbiology**, v. 24, n. 3, p. 165, 2006.

DOURADO et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, set./dez.2007.

EGUCHI, G.U. et al . Ceratoconjuntivite nodular em um caso de leishmaniose visceral canina: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 69, n. 6, p. 1480-1484, Nov. 2017 .

EL TAI, N. O.; et al. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of sudanese isolates revealed by PCR- based analyses and DNA sequencing. **Experimental Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 35-44, Jan. 2001.

FAKHAR, M. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 102, n. 7, p. 577-583, 2008.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. **La revue de médecine interne**, v. 32, n. 9, p. 544-551, 2011.

FONTELES, Raquel Silva et al. Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 647-650, 2009..

FRAGA, T. L., et al . Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 310-313, May 2010

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006

FRANÇA A DE O et al. *Anti-Leishmania* antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 49, n. 3, p. 627-630, 2013.

FUKUTANI, Kiyoshi F. et al. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 422, 2014.

GALLUZZI, Luca et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, 2018.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, MLR de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004..

GREEN SJ, NACY CA, MELTZER MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *leishmania* and other intracellular pathogens. **Journal of Leukocyte Biology** 50: 93-103, 1991.

HERWALDT BL. Leishmaniasis. **Lancet**; v.354,p.1191–1199. 1999

HIDE, M.;MARION, E.; POMARES, C.; FISA, R.; MARTY, P.; BAÑULS, A.L. Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. **Int J Parasitol**, v. 43, p. 389-397, 2013.

HORIMOTO,Alex Magno Coelho; COSTA, Izaias Pereira da. Frequency of autoantibodies and serum complement levels in patients with visceral or cutaneous leishmaniasis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 5, p. 529-546, 2009.

IBARRA-MENESES, A. V. et al. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 739. e1-739. e4, 2016.

JERONIMO, Selma MB et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 36, n. 6-7, p. 443-449, 2004.

JERONIMO, Selma MB et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 386-388, 1994.

JIMENEZ-MARCO, et al. The utility of pathogen inactivation technology: a real-life example of *Leishmania infantum* inactivation in platelets from a donor with an asymptomatic infection. **Blood Transfus.**, v.10, p.536-541, 2012.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604, 2011.

KEMP, Michael et al. *Leishmania donovani*-reactive Th1-and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 61, n. 3, p. 1069-1073, 1993.

KOSTMAN, R. et al. Kala-azar transferred by exchange blood transfusion in two Swedish infants. In: **Proceedings of the seventh international congress of tropical medicine and malaria**. 1963.

LAINSON, Ralph. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine, p. 1-120, 1987.

LEMOES, Elenice Moreira et al. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 36-38, 2003.

LIEW, Foo Y. et al. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European journal of immunology**, v. 21, n. 12, p. 3009-3014, 1991.

LIMA JUNIOR, Manoel Sebastião da Costa et al . Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Uberaba** , v. 42, n. 3, p. 303-308, June 2009.

LIMA Laryssa Manso de et al . Prevalence of Chagas disease in blood donors at the Uberaba Regional Blood Center, Brazil, from 1995 to 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Uberaba** , v. 45, n. 6, p. 723-726, Dec. 2012.

LOW, G.C.; COOKE, W.E.; A congenial infection of kala azar. *Lancet*. p.1209–1211, 1926 apud MEINECKE, C.K.; SCHOTTELIUS, J.; OSKAM, L.; FLEISCHER, B. Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar) from an asymptomatic mother to the child. **Pediatrics**, v.104, p.65, 1999.

LUZ, K. G., et al. Prevalence of *anti-Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and polytransfused hemodialyzed patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 2, p. 168-171, Aug. 1997.

MAGALHÃES-MATOS, Paulo Cesar et al. Molecular detection of *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *procyonids* (Carnivora: Procyonidae) in Eastern Amazon, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 663-668, 2016.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, v.158, p.274-287, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, p.2941-2947, 2008.

MANTOVANI, R.M. et al. Leishmaniose Visceral Congênita – Revisão da Literatura. **Rev. Med. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 15, n. 1, supl. 1, p. 39-43, 2005.

MARQUES, N.; CABRAL, S.; COELHO, F.; OLIVEIRA, J.; SARAIVA DA CUNHA, J.G.; MELIÇO-SILVESTRE, A. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana. **Acta Med Port**, v.20, p.291-298, 2007.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, Nov. 2004.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J. C. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, v. 14, n. 4, p. 319-321, 2004.

MEDEIROS, Fernanda Alvarenga Cardoso et al. Development and Validation of a PCR-ELISA for the Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. **Journal of tropical medicine**, v. 2017, 2017

MELO, F. L. Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em pcr para a detecção de *Schistosoma Mansoni*. Tese (Doutorado) - **Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

MICHALSKY, Érika Monteiro et al . Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 58-62, Feb. 2011.

MICHEL, G.; POMARES, C.; FERRUA, B.; MARTY, P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (L. chagasi) in human. **Acta Tropica**, v.119p. 69-75, 2011

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n.4, p. 365-368, jul./agst, 2008.

MKADA–DRISS, Imen et al. Screening and Characterization of RAPD Markers in Viscerotropic *Leishmania* Parasites. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109773, 2014.

MONTEIRO, E.M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.38, n.2, p.147-152, 2005.

MORADIN, Neda; DESCOTEAUX, Albert. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 121, 2012.

MOSMANN, T. R. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2346, 1996.

MOSMANN, T. Rv; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual review of immunology**, v. 7, n. 1, p. 145-173, 1989.

MURBACK, Nathalia Dias Negrão et al . Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 86, n. 1, p. 55-63, Feb. 2011

MURRAY, Henry W. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. **Infection and immunity**, v. 76, n. 9, p. 4088-4091, 2008..

NASCIMENTO, Manuela Sales Lima et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015-1026, 2015.

NASEREDDIN, A.; JAFFE, C. Rapid diagnosis of old world leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. **The Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2240-2242, 2010.

NAUCKE LORENTZ, S.. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v.5, p.67, 2012.

NEVES DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. 2004

OLIVEIRA, et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Caderno de Saúde Pública**; v.19,n.4, p. 933-44. 2000.

OTERO, A. C. et al. occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 62, n. 1, p. 128-131, 2000.

OUYANG, Wenjun et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.

OVALLOS, F. G.; Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* Cunha & Chagas. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – **Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública**, Universidade São Paulo, São Paulo.

PALATNIK-DE-SOUSA, Clarisa B. et al. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral

leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 390-393, 1995.

PEARSON, R.D.; QUEIROZ SOUZA, A. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**, v.22, p. 1-13, 1996.

PEDROSA, Célia Maria Silva; ROCHA, Eliana Maria Mauricio da. Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 300-304, 2004.

PEGO, C et al . Visceral leishmaniasis: an unexpected diagnosis during the evaluation of pancytopenia in a kidney transplant recipient. **Port J Nephrol Hypert**, Lisboa , v. 27, n. 2, p. 119-123, abr. 2013

PEREIRA, Geraldo et al. Leishmaniose visceral em Pernambuco: dados epidemiológicos. **Bol. trimest. clin. doenças infecc. parasit**, v. 5, n. 1, p. 53-70, 1985.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Programa SANAR. **Plano Integrado de Ações para o Enfrentamento às Doenças Negligenciadas –Série A**. Normas e Manuais Técnicos Tiragem: 1.^a edição – 2015.

PROIETTI, A. B. F. C.; LOPES, M. S. N.; URIAS , E. V. R. Outras doenças infecciosas transmitidas pelo sangue. In. Bordin José O, Langli Junior, Dante M, Covas Dimas T. **Hemoterapia Fundamentos e Prática**. 1º edição. São Paulo: Atheneu. P.525-31 , 2007

QUEIROZ MFM, Varjão JR, Moraes SC, Salcedo GE. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barrado Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. ;45(3): 313-17. 2012

REED, Steven G.; SCOTT, Phillip. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current opinion in immunology*, v. 5, n. 4, p. 524-531, 1993.)90033-O

REINER, Steven L. et al. TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. **Science**, v. 259, n. 5100, p. 1457-1460, 1993.

REIS, Sônia Rolim et al. Intradermorreação de Montenegro em cães (Mammalia: Canidae) experimentalmente inoculados por *Leishmaniaguyanensis* e *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), principais agentes causadores de Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. **Acta Amaz.**, v. 38, n. 3, 2008

RIERA, C. et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 102-110, 2004.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

ROMERO, et al. Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 4, n. 9, p. 819, Sept. 2010.

RUIZ, R. M. et al. Detección de *Leishmania sp.* en *Rattus rattus* de la ciudad de Corrientes, Argentina. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 47, n. 3, p. 401-407, 2015.

SAHA, Pabitra et al. Asymptomatic leishmaniasis in kala-azar endemic areas of Malda district, West Bengal, India. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005391, 2017.

SASSI A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A, Dellagi K. *Leishmanin* skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. **Clin Exp Immunol**. V.116,p.127–32,1999.

SATOW, Marcela M. et al. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, p. 393-399, 2013.

SCHÖNIAN, Gabriele et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples¹. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SCOTT P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J Immunol** 1991;147:3149-55.

SCOTT P. Th cell development and regulation in experimental cutaneous leishmaniasis. **Chem Immunol**.n.63v.,p:98-114.1996

SCOTT, JAG et al Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia by psaA PCR Aanalysis of Luns Aspirates from Adult Patients in Kenya.J. **Clin Pathol**.v.46, n.6, p.2453-2559.2013

SHIMABUKURO, Paloma Helena Fernandes; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Lista de espécies de *Phlebotominae* (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotrop**, v. 11, n. 1a, p. 1-20, 2011.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.55-59, 2009.

SILVA, Diogo Tiago da et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** [online]. 2014, vol.23, n.2, pp. 179-186. Epub May 23, 2014.

SILVA, Jaqueline de Almeida et al . Leishmaniose visceral e gestação em transplantada renal: Relato de Caso. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo , v. 37, n. 2, p. 268-270, June 2015 .

SILVA, Luciana Almeida et al. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania* infection in a visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 101-104, 2013.

SILVA, et al .Alvos moleculares e iniciadores estudados para o diagnóstico da LV humana.**Revista Eletrônica de Farmácia**,v.7 ,n.3, p. 01-15, 2010.

SINGH, Om Prakash et al. Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 6, p. 961-966, 2012.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 123, n. 3, p. 311-330, 2006.

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

SOUHAILA MA, KHAWLA HZ, KHITAM YAD. Indirect fluorescent antibody test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: an epidemiological study in Iraq. **J Univ Anbar Pure Sci**,v.4,n.10,2010.

SRIVASTAVA, Pankaj et al. Molecular and serological markers of *Leishmania donovani* infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 5, p. 548-554, 2013.

SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitol Res.**, v.110, p.1065–1078, 2012.

Singh, S., Chaudhry, V.P. & Wali, J.P. (1996) Transfusion transmitted Kala-azar in India. **Transfusion**, 36,848–849.

Stauch, Anette et al. Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent: Modelling Epidemiology and Control. Ed. Alison P. Galvani. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 5.11 (2011): e1405. PMC. Web. 16 Feb. 2017.

TURCHETTI, A.P et al. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, p.403-407, 2014.

URIAS, Elaine V. R. et al . Prevalência de adultos infectados por *Leishmania Leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 348-354, 2009.

VAN DER MEIDE, Wendy et al. “Comparison between Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, Real-Time Reverse Transcriptase PCR, and Real-

Time PCR for Quantification of Leishmania Parasites .” **Journal of Clinical Microbiology** v.46, n.1, p.73–78, 2008

VERGEL,C.; et al. Evidence for *Leishmania (Viannia)* parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 4, p. 503-511, Aug. 2006.

VILELA, Maurício Luiz et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and putative vectors of leishmaniasis in impacted area by hydroelectric plant, state of Tocantins, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e 27721, 2011.

VOLPINI, Ângela C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 90, n. 1, p. 31-37, Mar 2004.

WILSON, Mary E. et al. The TGF- β response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. **European journal of immunology**, v. 32, n. 12, p. 3556-3565, 2002..

WILSON, Mary E.; JERONIMO, Selma MB; PEARSON, Richard D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

ZELAZNY, A. M.;et al. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania spp.* **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 415-420, Apr. 2005.

ZUBEN, Andrea Paula Bruno von; DONALISIO, Maria Rita. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 32, n. 6, 2016 .

ANEXOS

Revista de publicação - PLOS neglected tropical diseases

**Prevalence of Asymptomatic Infection by *Leishmania infatum*. in Blood donors
in the city of Recife, Pernambuco, Brazil**

Lucas Portela Silva^{1,2}, Silvia Montenegro², Roberto Werkauser², Filipe Dantas-Torres², Kamila Gaudêncio da Silva Sales², Fábila Carla Silva Soares², Sheilla Andrade Oliveira², Vladia Maria Assis Costa¹, Ana Cristina de Souza³, Suzany Maria Ferreira³, Herintha Coeto Neitzke-Abreu⁴, Manoel Sebastião da Costa Lima Junior²

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical UFPE/CCS

² Departamento de Immunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brasil

³ Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Recife, Brasil

⁴ Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

Abstract

Visceral leishmaniasis (LV) is a neglected tropical disease considered a major public health problem, present in several countries, including Brazil. Because it is an endemic disease and is presented many times in the asymptomatic form, the hypothesis of other transmission routes other than the vector begins to be raised. This hypothesis begins to be discussed in the blood banks, because there is no testing for identification of the parasite in the screening of blood bags. We performed an observational, transversal and descriptive study, where we performed the collection of 500 blood samples from blood donors to identify the presence of circulating *Leishmania* DNA in this population. In order to detect the parasite, genomic DNA was extracted and molecular tests such as qPCR and conventional PCR were carried out. Of the 500 samples analyzed, 6.2% presented positivity for the presence of the circulating parasite in peripheral blood. In relation to the identification of the species, of all the positive samples with the presence of DNA *L. infantum*, we were able to carry out the confirmation by means of the conventional PCR of only one sample, being *L. infantum* species. In view of the result of this study, there is an alert for the need of laboratory screening of blood banks, as well as health policies that see the asymptomatic as a possible transmitter.

Author Summary

Leishmaniasis is a complex of different diseases that affect mainly the low income population and can present itself in two forms: tegumentary or visceral. The state of Pernambuco, located in northeastern Brazil, is an endemic region and needs more studies, since its negligence justifies the number of cases. In blood banks in Brazil there are no control measures in blood bags for

leishmaniasis, which represents a risk for the population. Faced with this problem, we conducted this study, being the first to be carried out in the state of Pernambuco and one of the few in the Northeast. The present study aims to estimate the prevalence of asymptomatic *Leishmania sp* in donors suitable for blood donation.

Introdução

Leishmaniasis is a neglected disease caused by different species of *Leishmania*. Leishmaniasis may involve three major clinical manifestations, including cutaneous lesions, mucocutaneous or visceral pathology. Visceral leishmaniasis (LV) is a tropical endemic disease that affects approximately 200 to 400 thousand people per year worldwide, with the most affected countries being Brazil, India, Sudan, Ethiopia and Bangladesh. [1]. LV is a disease caused by the *Leishmania donovani* complex in East Africa and India and by *Leishmania infantum* in Europe, North Africa and Latin America and can be fatal if left untreated [3,4].

The disease classified as asymptomatic, oligosymptomatic or subclinical, acute and chronic, may have an evolution to severe form [43].

Among the clinical-immunological profile, the most attention is the asymptomatic form, since asymptomatic individuals may be acting as reservoirs of the disease, being this a potential factor for the contribution of infection expansion [2]; especially in relation to blood banks, since the asymptomatic resident of an endemic area may be a potential blood donor [5].

Several studies in countries such as Belgium, France, India, Brazil, Sweden and the United Kingdom have reported transmission of blood transfusion routes [45]. The first reported case in the world was in 1948 in China [16]. In 1991 the World Health Organization (WHO) raised this alert for blood banks [28].

Although there have been reports in the literature on transfusional transmission of the disease, laboratory testing for leishmaniasis in Brazil has not yet been performed [7]. This becomes a risk for the recipients of these blood bags since the disease is directly linked to the individual's immune status [8,9,10].

In view of the above and the increase in cases of the disease, the present study aimed to verify the prevalence of LV in blood donors from a blood bank located in the city of Recife, capital of the state of Pernambuco, located in the Northeast of Brazil.

Methods

Place of study and sample

The study was conducted from August 2017 to September 2017 in the blood bank of the city of Recife (8 ° 3 '15' 'south, longitude: 34 ° 52' 53" west) capital of the state of Pernambuco (fig 1).

Figure 1. Map of Brazil in focus Pernambuco and the capital Recife



<https://www.google.com.br/search?q=recife+pernambuco+brasil+MAPA>

Legend: Map of Brazil highlighting the Northeast region and state of Pernambuco.

Participating in the study were 500 blood donors considered suitable for donation who attended the HEMOPE blood bank in the aforementioned period. Donors came from different areas of the state, not just the capital Recife, where the blood bank is located.

The donor approach was made at the moment of the donation procedure, where the invitation to participate in the research was made, after all the clarifications and signature of the TCLE (Free and Informed Consent Term), the donor answered a sociodemographic questionnaire on age (18 to 25 years, 26 to 33 years, 34 to 41 years, 42 to 50 and 51 to 60), color (White, Black, Brown, Yellow, other) schooling (1st to 5th year, 6th to 9th year, and higher education), income per minimum wage (1-2 wages, 3-4 wages, 5-6 wages, more than 7 wages, local housing according to the division of mesoregions of the state of Pernambuco (Recife- Capital, Metropolitan Region , Zona da Mata, Agreste, Sertão, and other state). The study was approved by the ethics and research committees of the involved institutions (65770317.9.0000.5190).

Samples

Blood samples were collected in EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) tubes previously identified with the bar code of the doadore, where after all

laboratory blood cell sorting, 600µL aliquots were collected and transferred to an eppendorf for transport in the which was carried out in a dry ice box and sent to Aggeu Magalhães-IAM-FIOCRUZ-PE Institute. All aliquots were refrigerated at -80 ° C until analyzed. Said samples were collected after screening of the blood bank.

DNA extraction from samples

Extraction of genomic DNA from peripheral blood samples was performed using the Wizard® Genomic DNA Purification kit, according to the manufacturer's specifications.

Real-time PCR

For the performance of the qPCR, an assay described by Dantas-Torres et al (2016) with small modifications [11] was used. In our modified assay we used the TaqMan® Genotyping master mix (Applied Biosystems) and for the thermocycling process we set the following conditions: 50 ° C for 02:00 (minutes), 40 cycles at 95 ° C for 10:00 (minutes) and 95°C for 15 seconds and 60°C 01:00 (minutes). The remaining conditions of the assay remained as the original, specific primers for *L. Infantum* LEISH-1 (50-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-30) and LEISH-2 (50-ACCCCCAGTTCCCCGCC-30) and TaqMan® FAM-50-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3 non-fluorescent quenche rMGB according to Francino et al [12].

For the analysis of the samples was performed in duplicate including the dilution curve also in duplicates (10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg).

Conventional PCR

The positive samples in the qPCR were submitted to conventional PCR for confirmation of the species. The final volume of the reaction was 25 µL, consisting of 1X buffer, 0.2 mM DnTPs, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primers being RLC2 (5'-GGGAAATTGGCCTCCCTGAG-3 ') and FLC2 (5'-GTCAGTGTCGGAACTAATCCGC -3 ') 100pb stock solution and 10pb usage solution. 0.2 u/µL Taq Polymerase, 80 to 350 ng /µL DNA, water 13.75 µL. As control was used *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In the thermocycler (Life Eco, Bioer version 2.04), the cycles were 95°C - 10min, 35 cycles of: 94°C - 1 minute, 56°C - 1 minute, 72°C - 30 seconds and final extension of 72°C - 10 minutes. PCR products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis with 1X tris-borate-EDTA (TBE) buffer pH 8.0 at 150V and 400mA for 1h and 20 minutes, the gels were stained

with ethidium bromide (0.5µg / mL) and visualized in ultraviolet light.

Results

Peripheral blood samples from 500 blood donors were analyzed, 42.6% (214) were female and 57.4% (287) were male. 35.0% (175) considered themselves pardos, followed by whites 30.4% (152) and blacks 25.0% (127), while the others together added up to 9.2% (46).

Regarding age we observed the group of 18 - 25 years corresponded to 50.2% (251) of the donors, 26-33 years 27.4% (137), 34-41 12.2% (61), 42-50 8.2% (41) and finally 51-60 2.0% (10). From the data, we observed that the groups of 18 to 25 years and the group of 26 to 33 correspond to more than 70% of the total group of donors.

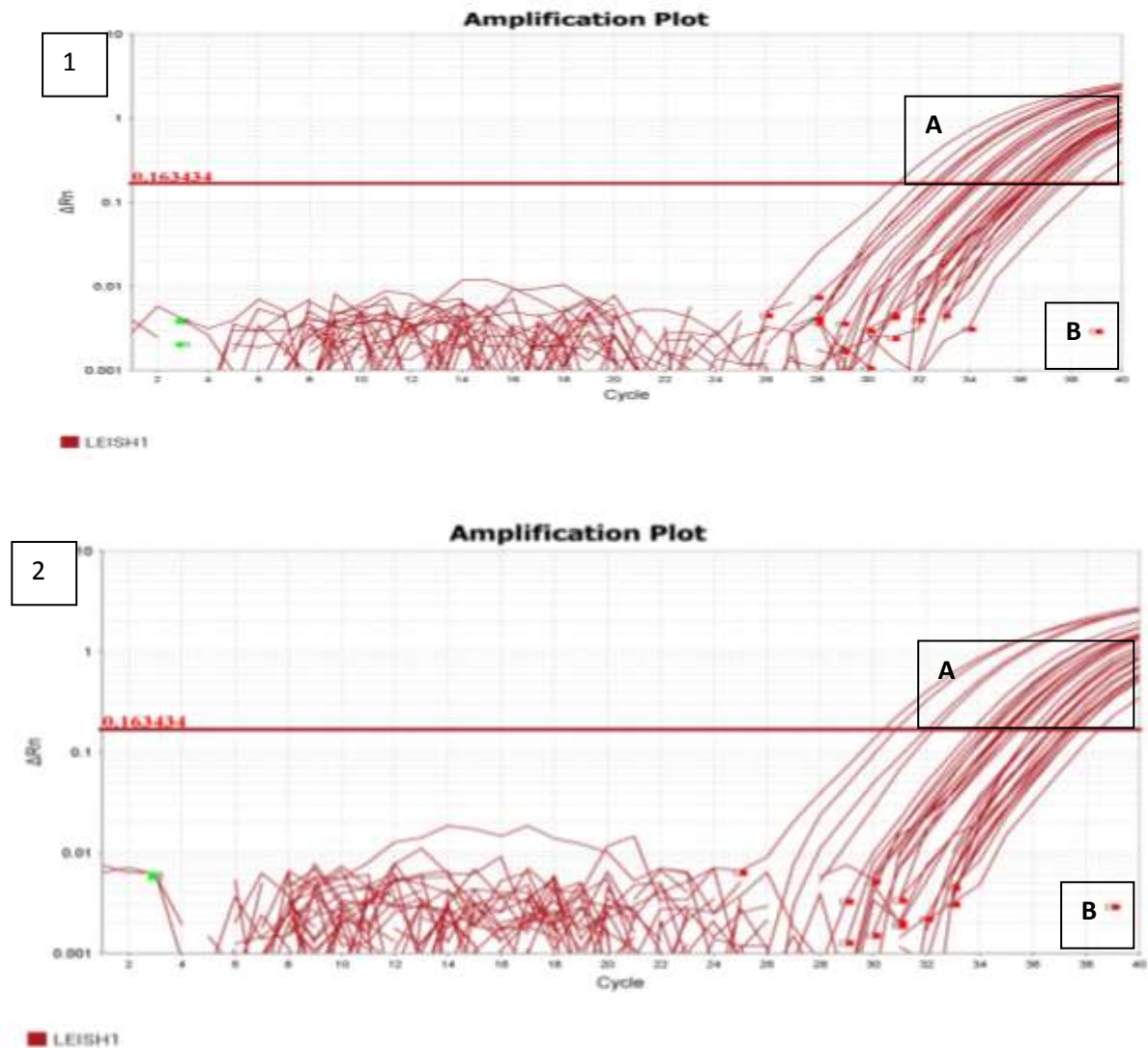
Regarding education, the predominance of those with tertiary education corresponded to 95.8% (479) of the donors, those with only elementary education I and II corresponded to 4.2% (21).

Despite being located in the city of Recife 45.5% (227) of the donors reside in the capital of Pernambuco. Residents of the other municipalities in the metropolitan region accounted for 42.0% (210), from the forest area 9.8% (49), from the rural 2.2% (11), and from the Pernambuco outback, 0.4% (2) and another state 0.2% (1).

When asked about water supply, 99.6% (498) reported access. Only 0.4% (2) stated that they did not have access to the water supply. While the type of sewage system 87.2% (436) reported having access to basic sanitation, 5.2% (26) had no access and 7.6% (38) did not know how to inform. Detecção por meio da qPCR

When the samples were submitted to qPCR, 31 blood samples were identified with the presence of the DNA of the *L. infantum* parasite.

Fig 2. qPCR plate with positive samples



Caption: Amplification graphs that represent the curves of samples positive for the presence of *Leishmania infantum* DNA, 1 and 2 represent the duplicate samples on the same plate. (A - samples, B - Negative control)

Fig 3. qPCR plate with Standard Curve

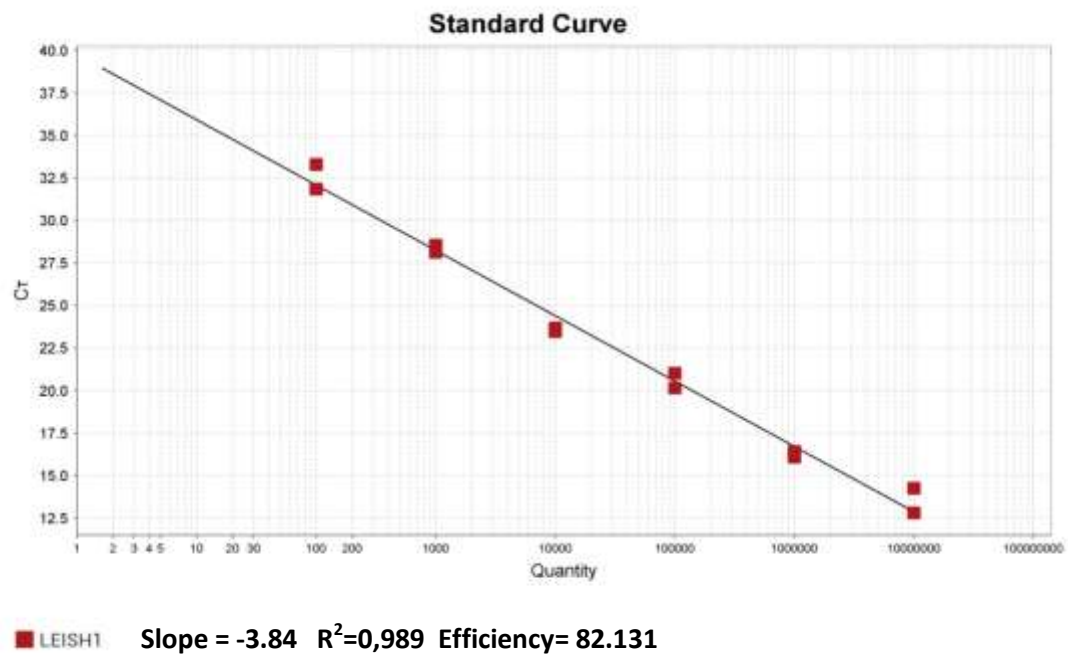
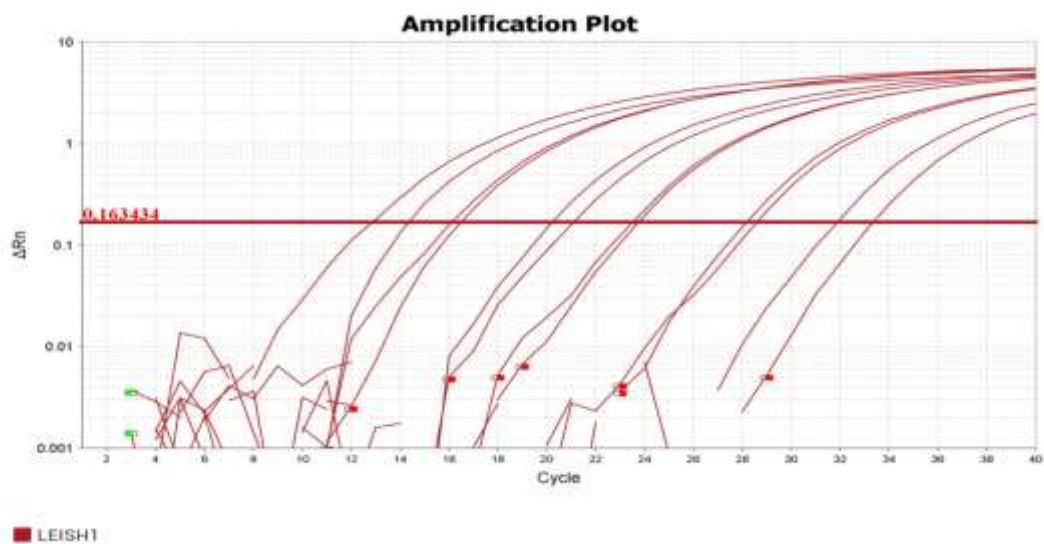


Fig 4. qPCR plate with dilution curve



Caption: Amplification graphs representing standard curves (10 ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg) with *Leishmania infantum* DNA.

Profile of blood donors with presence of parasite DNA

Table 1. Socio-demographic characteristics of the donors that had the presence of DNA of the parasite in peripheral blood

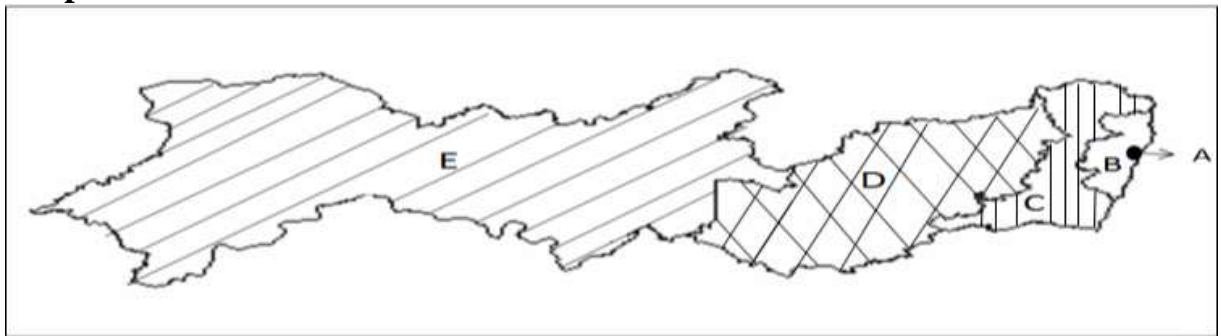
CASES 31		
	Nº	%
GENRE		
Female	17	54,8
Male	14	45,2
RAÇA		
White	10	32,3
Black	10	32,3
Yellow	1	3,1
Bronw	10	32,3
AGE		
18-25 Years	17	54,8
26-33 Years	9	29,0
34-41 Years	2	6,5
42-50 Years	3	9,7
SCHOOLING		
1º ao 5º Year	0	0
6º ao 9º Year	0	0
High School	11	35,5
College	20	64,5
Renda familiar		
1 –2 Minimum wage	16	51,6
3 – 4 Minimum wage	12	38,7

5 – 6 Minimum wage	2	6,5
More of 7 Minimum wage	1	3,2

Place of residence

The locality of the donors' residence was predominant in the metropolitan region, followed by the capital Recife and Zona da mata (fig.4).

Figure 5. Title: Map of Pernambuco divided by mesoregions according to the place of residence of the infected donors.

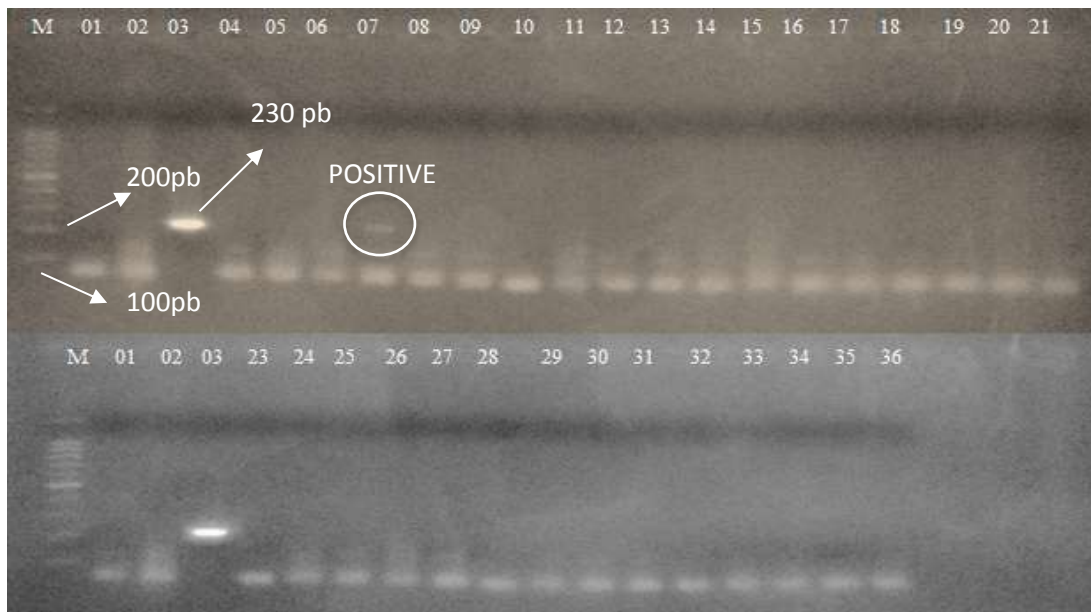


Legend: A- Recife (14 donors), B- Metropolitan Region of Recife (15 donors), C-Zona da Mata (2 donors), D- Agreste and E- Sertão there were no donors infected with the parasite.

Identification of species

DNA samples from donors that were positive for *L. infantum* DNA by qPCR were submitted to standard PCR to confirm *L. infantum* using specific primers. Only one sample was able to confirm the *L. infantum* species, the others possibly due to the parasitic load, it was not possible to confirm, proving not to be an efficient method to be applied in asymptomatic patients (Fig.6)

Figure 6. Agarose gel electrophoresis for species identification.



Caption: Race with the infected samples for identification of species. M-labeled 100pb, 01 and 36-Negative control, 02-Positive control (*L.b*), 03-Positive control (*L.i*) and from 04 up to 35 samples.

In another gel a run was performed with only a 8X dilution (10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10 fg, 1 fg) of a positive control of *L. infantum* where it was observed that conventional PCR was only able to detect those samples with up to 1pg of DNA (fig.5).

Figure 7. Title: Conventional PCR-Dilution.



Legend: Run on agarose gel with 7x dilution of positive control *L. I.* 1-Marker; 2-10 ng; 3- 1ng; 4-100 pg; 5-10pg; 6- 1 pg; 7-100 fg; 8-10 g; 9- Negative control.

Discussão

The first time the definition of "asymptomatic" was used was in the year 1974 in a region of northern Italy after an outbreak of the disease [13]. In Brazil, the first time the term "asymptomatic" was used was in 1986 in a study carried out in the municipality of Jacobina in the state of Bahia [14].

Being an individual symptom-free and a potential transmitter of disease, studies began to address the role of this individual in blood banks. The first work reporting transmission via blood transfusion was in 1948 in China, the study reports that a mother was diagnosed with the disease shortly after making a donation of blood to his two sons, being carried out monitoring of these children were seen that after nine months of transfusion children developed the disease [16].

Other transmission cases began to be described in countries such as Belgium, France also involving children [17,18]. In Brazil the first published study in which raises the chance of transmission of the disease occurred in 1997. The study was carried out in Rio Grande do Norte with 1500 blood donors [19].

In the present study, the prevalence of *Leishmania sp.* in blood donors, as well as carry out the identification of current and connect all results with the sociodemographic characteristics of the participants of the survey. The objective of this work was to verify this prevalence in blood donors of a blood bank located in the city of Recife-PE.

Our results showed that the prevalence of asymptomatic infection by leishmania infantum in blood donors was 6.2%, using molecular methods.

In a previous study performed. In a population of 438, the prevalence was lower by using the molecular diagnosis, however conventional PCR was used [24]. This variation of the prevalence is also observed when applied serological diagnoses, as we can observe in the study of Rio Grande do Norte (RN) with 438 the prevalence was 12.2% being applied the ELISA [25]; in another study also performed in RN where a population of 1,194 9% donors were positive [19]; the higher prevalence of 15.6% was observed in the Mato Grosso do sul in a population of 430 donors [23]. All this change in prevalence is within the expected numbers once the world scene there is a variation in the prevalence of asymptomatic infection of 0.05% to 73.4% depending on the population studied and the diagnostic technique used [10].

What draws attention is the amount of studies using serological methods for diagnosis, this due to quick and easy reproducibility of the tests in question. However, the serological diagnosis have some limitations that can pass unnoticed since we use samples of asymptomatic individuals. For this reason we performed only the molecular diagnosis due to good sensitivity and specificity that can reach up to 95.7% [30]; In addition to being a technique used for species identification [31].

Does is important to highlight that in cases of presence of antibodies against *Leishmania* when reagent, doesn't mean that this individual is with an active infection. What can occur to this eventually turn positive reaction is the exhibition of this individual at some point to parasite [39, 40,41]. That explains the reason for the prevalence of this study have a lower value to be compared with the studies performed serological methods, because it was used the qPCR, much more specific and sensitive method.

In the present study was carried out also the characterization of the species by qPCR, being confirmed by conventional PCR, however, of the 31 samples positive for *L. infantum* in qPCR, only a positivou in conventional PCR, the dilution curve sensitivity was even 1 pg of DNA, this result suggests the low parasitemia, observed by Fisa et al., (2001) and Mona et al., (2004) [49; 50]. In addition, according to Lachaud et al., (2002) the results of this technique can have very large variations according to the type of sample and the prime used [48]. Before this, note that the conventional PCR is not recommended for asymptomatic, once will not occur at low detection parasitic loads.

To this right is Real time, as shown in the study of Dantas-Torres (2016) that in your real-time PCR assay has achieved up to 1 fentograma detection of DNA, using a volume of only 15 µL for reaction, and with some time 34 minutes [11]. Due to the modifications of the test carried out in this study, it was not possible to accurately reproduce the study cited, but even so the results were satisfactory.

To identify positive samples for the presence of DNA of the parasite, relate these results with the sociodemographic characteristics of this population. With this it was identified that the presence of DNA of the parasite was higher in females than in males, the difference between sexes despite not be meaningful was also reported in a study conducted in the State of Paraná [22]; as was also described and in the study of Uriah et al., (2009) in which the prevalence was 52.2% of females literate [21]. However, what stands out are the studies differ where the prevalence is higher in males, for example in the study directed by Fukutani et al, (2014) that 81.5% of asymptomatic donors 38 were male [24]; like the prevalence of Monteiro (2013) in this study with asymptomatic 58, 75.9% were male [32].

Our findings regarding the race show a balance between races, black, white and Brown. It is noteworthy that these figures are for asymptomatic population. This scenario changes when we compare our results with a symptomatic population as we can see in Lisboa et al, (2016) study in that 65% of your study group if stated Browns [46], is most prevalent in Browns was also reported by Barbosa and Costa (2013) [47]. Our study differs from others because we are working with asymptomatic and so far in the literature was not found this comparison with this particular population.

In Brazil, according to the data provided by the Ministry of health the fatality rate between the years 2001 to 2015 arrives at 6.89%. Brazilian regions,

those that had a higher percentage of mortality were the Midwest (9.34%) followed by the Southeast (9.23%), the Northeast region had a percentage of 6.36% and the northern region 4.89% [5]. What demonstrates neglect and the absence of effective measures in all regions of Brazil.

Although our study did not have located in the backcountry residents and positive donors in the wild this does not represent that in these regions to be absent. This is due to the low demand of donors from these localities. Only in the year 2016 in Pernambuco were 473 cases reported and confirmed, the most outstanding municipalities were Tamandaré, Goiana (Zona da Mata), Caruaru, willow (Agreste), Santa Cruz, Lagoa Grande, Santa Maria da Boa Vista, Ouricuri, Petrolina and Carnaubeira da Penha, Serra Talhada (Sertão) [5]. Currently LV is expanded in all regions of the State [26]. The results of this study are consistent with the work in describing the urban environment as a place where social and demographic characteristics have a great impact for the expansion of the disease [32]. The reason for the disease in the capital and in the rest of the metropolitan area. Although there are studies that show the distribution of the disease in the State makes necess

When analyzed the data concerning the age, it was observed a higher concentration in the 18-25 years, i.e. in the youngest group, our result draws attention once the higher prevalence of the disease focuses on the older population [35]. As is demonstrated in the study of Braga et al, (2015) in which the population of asymptomatic donors 20% had more than 50 years [22]. The youngest group stood out in the study for being the group that performs the largest number of donation in blood banks, reflecting directly on the results.

On the exposed, one can observe the real possibility of transfusion transmission of the disease since currently in Brazil is not carried out the screening for *Leishmania spp.* [36]. With this, we can see how much those involved in the donation process are exposed to the risk of infection, it is worth mentioning that the prevalence in this study occurred mainly because of the location of HEMOPE/Recife be centralized and easily accessible. In a study by Asfaram et al., (2017) pointed out the need for serological and molecular tests, still in the presence of positivity the bag does not have to be discarded, you can do the leucodepleção with filter system prevent the passage of the parasite, preventing the transmission of the parasite by the bag of blood [37].

Even in the absence of knowledge about the real risk of transfusion transmission, it is necessary to prophylactic measures committed to public health and thus, the adoption of the screening for *Leishmania spp.* on blood banks in Brazil is indispensable.

Acknowledgment

To Work Institute Magalhães, FIOCRUZ-Recife for provides the structure for conducting the research, to HEMOPE for agreeing to be a partner institution, the FACEPE Fund and the CNPq granted by the stock exchange.

References

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
2. ALVES, Waneska Alexandra; FONSECA, Darises Soares. Leishmaniose visceral humana: Estudo do perfil clínico-epidemiológico na região leste de Minas Gerais, Brasil. Journal of Health & Biological Sciences, 6,2, 133-139, 2018.
3. Stauch A, Sarkar RR, Picado A, Ostyn B, Sundar S, Rijal S, et al. Visceral leishmaniasis in the indian subcontinent: Modelling epidemiology and control. PLoS Negl Trop Dis 2011;5. doi:10.1371/journal.pntd.0001405.
4. de Carvalho MR, Lima BS, Marinho-Júnior JF, da Silva FJ, Valença HF, Almeida FDA, et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. Cad Saude Publica / Minist Da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica 2007;23:1227–32. doi:10.1590/S0102-311X2007000500024.
5. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano Integrado de Ações para o Enfrentamento às Doenças Negligenciadas-Programa SANAR, 40-42, 2016
6. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 2007;5:873–82. doi:10.1038/nrmicro1748.
7. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue. Brasília, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 110p.

8. Jimenez-Marco T, Fisa R, Girona-Llobera E, Cancino-Faure B, Tomás-Pérez M, Berenguer D, et al. Transfusion-transmitted leishmaniasis: A practical review. *Transfusion* 2016; 56: S45–51. doi:10.1111/trf.13344.
9. Cardo LJ. *Leishmania*: risk to the blood supply. *Transfusion* 2006;46(9):1641–5.
10. Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop* 2011;119:69–75. doi:10.1016/j.actatropica.2011.05.012.
11. Dantas-Torres F, da Silva Sales KG, Gomes da Silva L, Otranto D, Figueredo LA. Leishmania-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *Mol Cell Probes* 2016;6–10. doi:10.1016/j.mcp.2016.08.006.
12. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006;137:214–21. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.011.
13. Pampiglione S, Manson-Bahr PEC, Giungi F, Giunti G, Parenti A, Trotti GC. Studies on mediterranean leishmaniasis: 2. asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974;68:447–53. doi:10.1016/0035-9203(74)90067-4
14. Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986;154:639–49. doi:10.1093/infdis/154.4.639..
15. Andre, et al. Leishmaniose cutanee-ganglionnaire et kala-azar transfusional. *Tropical Diseases Bulletin*, 55, 379-381, 1958.
16. Chung, H., Chow, H., Lu, J., 1948. The first two cases of transfusion kala-azar. *Chin. Med. J.* 66, 325–326.
17. Kostman et al. Kala-azar transferred by exchange blood transfusion in two Swedish infants. In: *Proceedings of the seventh international congress of tropical medicine and malaria*. World Health Organization: Geneva, Switzerland p. 384; 1963.

- 18.Cohen C, Corazza F, De Mol P, Brasseur D. Leishmaniasis acquired in Belgium. *Lancet* 1991;338:128. doi:10.1016/0140-6736(91)90129-D.
- 19.Luz KG, Da Silva VO, Gomes EM, Machado FCS, Araujo MAF, Fonseca HEM, et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:168–71. doi:10.4269/ajtmh.1997.57.168.
- 20.Otero ACS, Da Silva VO, Luz KG, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O, et al. Short report: Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:128–31. doi:10.4269/ajtmh.2000.62.128.
- 21.Urias, Elaine V. R. et al. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania Leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* São Paulo, v. 31, n.5, p. 348-354, 2009.
- 22.Braga LS, Navasconi TR, Leatte EP, Skraba CM, Silveira TGV, Ribas-Silva RC. Presence of *anti-leishmania (viannia) braziliensis* antibodies in blood donors in the west-central region of the state of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015;48:622–5. doi:10.1590/0037-8682-0043-2015.
- 23.França A de O, Castro VL de, Junior MS da CL, Pontes ERJC, Dorval MEC. *Anti-Leishmania* antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. *Transfus Apher Sci* 2013;49:627–30. doi:10.1016/j.transci.2013.07.009.
- 24.Fukutani KF, Figueiredo V, Celes FS, Cristal JR, Barral A, Barral-Netto M, et al. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. *BMC Infect Dis* 2014;14:422. doi:10.1186/1471-2334-14-422.
- 25.Monteiro, D.C. et al. *Leishmania infantum* Infection in Blood Donors, Northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2016 Apr;22(4):739-40. doi: 10.3201/eid2204.150065.
- 26.Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco TT - Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39:352–6.

27. Cardo, Lisa J. *Leishmania*: risk to the blood supply. *Transfusion*, v. 46, n. 9, p. 1641-1645, 2006.
28. WHO. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Technical Report Series 811, pp. 1-95.
29. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis* 2008;8:191–9. doi:10.1016/S1473-3099(08)70043-4.
30. REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008
31. Silva MAL da, Medeiros RA, Filho SB-, Melo FL de, Medeiros Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Rev Eletrônica Farmácia* 2010;7:15. doi:10.5216/ref.v7i3.12947.
32. Monteiro, D.C.S. Prevalência de leishmaniose visceral assintomática em doadores de sangue, em área endêmica do Ceará. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará- Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós Graduação em Patologia, Fortaleza, 2013.
33. Freire, S. M.; Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. [Mestrado] Universidade Federal do Piauí, 2010
34. Queiroz, P. V.S. de. Aspectos clínicos e imunológicos da infecção por *Leishmania Infantum chagasi* em cães do Rio Grande do Norte. Natal/RN, 2012. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde.
35. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A, Romano A, Ferroglio E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. *J Clin Microbiol* 2010;48:131–6. doi:10.1128/JCM.00416-09.
36. de Andrade AL, Martelli CM, Pinheiro ED, Santana CL, Borges FP, Zicker F. Rastreamento sorológico para doenças infecciosas em banco de

- sangue como indicador de morbidade populacional. *Rev Saude Publica* 1989;23:20–5. doi:10.1590/S0034-89101989000100004.
37. Asfaram S, Fakhar M, Soosaraei M, Hosseini Teshnizi S, Mardani A, Banimostafavi ES, et al. Global status of visceral leishmanial infection among blood donors: A systematic review and meta-analysis. *Transfus Apher Sci* 2017. doi:10.1016/j.transci.2017.09.007.
 38. França-Silva JC, Barata RA, Da Costa RT, Monteiro ÉM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 2005;131:213–20. doi:10.1016/j.vetpar.2005.05.006.
 39. Sirvent-von Buelzingsloewen A, Marty P, Rosenthal E, Delaunay P, Allieri-Rosenthal A, Gratecos N, et al. Visceral leishmaniasis: A new opportunistic infection in hematopoietic stem-cell transplanted patients [1]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:667–8. doi:10.1038/sj.bmt.1704396.
 40. Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 1993;32:161–259. doi:10.1016/S0065-308X(08)60208-0.
 41. Riera C, Fisa R, Lopez-Chejade P, Serra T, Girona E, Jimenez M, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 2008;48:1383–9. doi:TRF01708 [pii]r10.1111/j.1537-2995.2008.01708.x.
 42. Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Júnior G, Momen H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985;80:349–57. doi:S0074-02761985000300012.
 43. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004;7:338–49. doi:10.1590/S1415-790X2004000300011.. [1]
 44. Gama MEA, Costa JML, Gomes CMC, Corbett CEP. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:889–93. doi:10.1590/S0074-02762004000800018.
 45. Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and

review of literature. *Indian J Med Microbiol* 2006;24:165–70.

46. Lisboa, A. R., Leite, F. C., Dantas, A. E. F., de Oliveira, I. B., Evangelista, T. R., & de Sousa, J. B. G. (2016). Análise epidemiológica de leishmaniose visceral em Municípios do Sertão Paraibano. *Revista Brasileira de Educação e Saúde*, 6(3), 05-12
47. Barbosa, I. R., Silva Neto, R. D., Souza, P. P., Silva, R. A., Lima, S. R., Cruz, I. D. S., & Costa, Í. D. C. C. (2014). Aspectos da Coinfecção Leishmaniose visceral e HIV no Nordeste do Brasil. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 37(3), 672-687.
48. Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., & Bastien, P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*, 40(1), 210-215.
49. Fisa, R., Riera, C., Gallego, M., Manubens, J., & Portús, M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, 99(2), 105-111.
50. Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L. M., Della Morte, R., ... & Gravino, A. E. (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 125(3-4), 251-262.

Subtitles support information

Figure 1. Title: Map of Brazil highlighting Pernambuco and the capital Recife. Caption: Map of Brazil highlighting the northeastern region and State of Pernambuco.

Figure 2. Title: Plaque qPCR with positive samples Caption: Duplicate the samples. Caption: amplification Graphics that represent the curves of the positive samples for the presence of DNA of *Leishmania infantum*, 1 and 2 represent the counterpart of the samples on the same Board. (A-, B-negative Control samples)

Figure 3. QPCR card with the Standard Curve.

Figure 4. Card with the Standard Curve QPCR. Figure 4. QPCR plate with dilution curve Legend dilution curve. Caption: amplification graphs that represent the standard curves (10 ng-1fg) with DNA of *Leishmania infantum*

Table1. Title: socio-demographic Characteristics of donors who had the presence of DNA of the parasite in peripheral blood. Caption: the confidence interval was 95% for all the features.

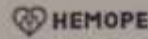
Figure 5. Title: Map of Pernambuco divided by meso-regions according to place of dwelling of infected donors. Legend: A-Recife (14 donors), B-the metropolitan region of Recife (15 donors), C-Zona da Mata (2 donors), D-Agreste and Sertão E-there was no donors infected with the parasite.

Figure 6. Title: agarose gel electrophoresis to confirm the species. Caption: Run on agarose gel with samples of the infected to identification of species. M-marked, 01 and 36-negative Control, positive control 02 (L. b), 03-positive control (L i) and 04 until 35 samples.

Figure 7. Title conventional PCR dilution. Caption: Race in agarose gel with the dilution of positive control 7 x L. (I). 1-Marker; 2-10 ng; 3-1ng; 4-100 pg; 5-10 pg; 6-1 pg; 7 -100 fg

ANEXO A

Carta de Anuência da Instituição parceira



CARTA DE ANUÊNCIA

Declaro para os devidos fins que concordo com a realização do projeto de pesquisa intitulado "Prevalência de infecção por *Leishmania Ssp* em doadores de sangue nos Hemocentros de Recife-PE e Caruaru-PE", que será desenvolvido pelo pesquisador Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior e pelo assistente de pesquisa Lucas Portela Silva - Fundação Oswaldo Cruz/ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, desde que o mesmo receba aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemope.

Recife, 18 de abril de 2017.

Dra. Yêda Maia de Albuquerque
Diretora-Presidente

Yêda Maia de Albuquerque
Diretora Presidente
Fundação Hemope

Nº 010/2017

Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - Chefia de Ensino e Pesquisa
Rua Joaquim Nabuco, 171, Graças, Recife - PE - CEP: 52011-000
Fone: (81) 3182-4660 - FAX: (81) 3182-4660



ANEXO B**Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

Título do Projeto: "Prevalência de infecção por Leishmania Spp. em Doadores de Sangue dos Hemocentros de Recife-PE e Caruaru-PE".

Pesquisador responsável: Manoel Sebastião da Costa Lima Junior

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 16/03/2017

Registro no CAAE: 65770317.9.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 2.030.334

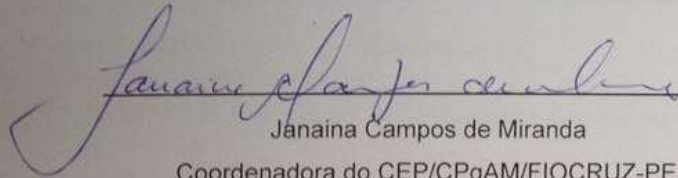
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento a resolução 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 25 de abril de 2017.


Janaina Campos de Miranda
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 484777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

