



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

DANIELA CRISTINA SENSATO MONTEIRO

**PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL ASSINTOMÁTICA
EM DOADORES DE SANGUE, EM ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE NO CEARÁ.**

FORTALEZA
2013

DANIELA CRISTINA SENSATO MONTEIRO

**PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL ASSINTOMÁTICA
EM DOADORES DE SANGUE, EM ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE NO CEARÁ.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina (FAMED), da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Margarida M. Lima Pompeu

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Danielle Malta Lima

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

Monteiro, Daniela Cristina Sensato

Prevalência de Leishmaniose visceral assintomática entre doadores de sangue, em área endêmica do Ceará / Daniela Cristina Sensato Monteiro. – 2013.

105 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2013.

Orientação: Profª. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu.

Co-orientação: Profª. Dra. Danielle Malta Lima.

1. Leishmaniose visceral assintomática. 2. Prevalência. 3. Doadores de sangue. I. Título.

DANIELA CRISTINA SENSATO MONTEIRO

**PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL ASSINTOMÁTICA
EM DOADORES DE SANGUE, EM ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE NO CEARÁ.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dra. Maria da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas
Universidade Federal do Ceará-UFC

Ao meu marido Diógenes e aos meus filhos, Davi e Lara, admiráveis em essência, estímulos que me impulsionam a buscar vida nova a cada dia. Meus agradecimentos, por terem aceito se privar da minha companhia, concedendo-me a oportunidade de me realizar ainda mais...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de vida, família e amigos.

À minha orientadora, Dra. Margarida Maria de Lima, por me aceitar como mestranda, pela sua amizade e pelas oportunidades que me proporcionou durante o curso, sem elas não teria chegado até aqui. Por me entender nos momentos mais difíceis e atravessarmos juntas os desafios. Serei sempre grata pela realização deste sonho. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Dra. Danielle Malta Lima, pela ajuda na realização deste trabalho, por sempre me ouvir, por suas palavras de incentivo, paciência e dedicação. Obrigada!

À Dra. Maria Jânia Teixeira, pelo carinho, amizade verdadeira e atenção! Um exemplo de competência e dedicação e contribuições imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Dra. Conceição Dornellas, pessoa encantadora, que tive o privilégio de compartilhar alguns momentos e aprender muito. Sempre com muitas ideias. Obrigada!

À Dra. Cristiane Cunha Frota, que gentilmente permitiu que as amostras de DNA fossem quantificadas no laboratório de Micobactérias, no Departamento de Biomedicina da UFC.

Ao Dr. Max Victor Carioca Freitas, por colaborar sempre que preciso, com leitura de contratos, e fornecendo amostras sorológicas para controle. Obrigada!

À diretora do Hemoce, Dra. Luciana Maria de Barros Carlos, pelo incentivo e por acolher nossa ideia, permitindo a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Hemoce, do setor de Processamento e Sorologia pela colaboração e esclarecimentos prestados, em todas as etapas deste trabalho.

A todos os doadores de sangue, pelo gesto nobre! Muito obrigada!

Às grandes amigas que surgiram no decorrer desta dissertação, a doutoranda Juliana Montezuma, às mestrandas Raissa de Fontes Matos e Claudênia Praciano, com quem muito aprendi, pela ajuda na realização deste trabalho, por sempre me ouvirem, obrigado pelo carinho, palavras, dedicação e amizade. Vocês são muito especiais!

À Mércia Sindeaux pela amizade e atenção especial na reta final desta jornada! Muito obrigada!

À Loraine Correa Matos e José Udevanier Rebouças, pela participação e disponibilidade sempre!

À Débora Cavalcante e Graziely Cavalcante pela amizade, generosidade e disposição sempre que precisei!

Aos meus amigos de laboratório: Laiane Fernanda, Weberty M. E. Figueiredo, Dyana Alves, Sayonara de Melo Viana, Priscila Valera Guerra, João Victor Serra Nunes, pela valiosa amizade e companheirismo.

Aos colegas e amigos de mestrado pela convivência e amizade firmada a partir dos momentos que passamos juntos.

A todos do Laboratório de Parasitologia, no Departamento de Patologia da UFC, onde foi possível aprender e crescer como profissional. Obrigado a todos pela convivência agradável.

À Coordenação do Mestrado em Patologia/UFC e aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal e, em especial, às secretárias do Mestrado em Patologia, Paula da Paz Palácio e Mila Aragão, pela ajuda e apoio em todos os assuntos administrativos.

Aos professores do Mestrado, por contribuírem na aquisição de conhecimento à minha formação profissional.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular da UNIFOR, onde realizei meus experimentos moleculares, Dra. Luciana Relly Bertolini, Dr. Marcelo Bertolini, Igor Sá Carneiro, Ana Karoline da Costa Freire, Kaio Tavares, Débora Rios e Anderson Pinto Almeida por terem me acolhido de braços abertos, pessoas maravilhosas que me proporcionaram momentos de alegria e descontração.

Ao Fernando Okamoto, da empresa WAMA Diagnósticos, por gentilmente fornecer os reagentes para a realização dos testes sorológicos.

Ao meu marido e grande amor, que me apoiou incondicionalmente em todas as etapas da minha vida e desta jornada, demonstrando paciência nos piores momentos, carinho e principalmente pelo seu amor. Aos anjos da minha vida, Davi e Lara! Vocês são o meu mundo, minha felicidade plena! Obrigada!

Aos meus pais, que mesmo distantes, sempre se fizeram presentes nos momentos mais distantes. Obrigado pelo amor e carinho durante esta caminhada.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta, na concretização deste trabalho, com certeza, sem a ajuda de todos vocês não seria possível realizá-lo. Muito obrigada!

A CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada um problema de saúde pública mundial. Com a urbanização da LV, tem sido cada vez mais crescente o número de portadores assintomáticos, em grandes centros, chegando a ter prevalência de até 52%. Em diversos lugares do mundo, tem sido relato a ocorrência de transmissão de *Leishmania*, por transfusão sanguínea. Como nas áreas de transmissão, os portadores assintomáticos representam um grande contingente, é importante avaliar a possibilidade dos hemoderivados serem um risco em potencial, para a transmissão de *Leishmania*. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência da LV assintomática em doadores de sangue do Hemocentro do Ceará. Para estabelecer a prevalência de LV entre doadores de sangue, foi utilizado creme leucocitário de 438 doadores de sangue, de Maio a Novembro de 2011. As amostras foram centrifugadas em Histopaque, para separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e do plasma. As CMSP foram utilizadas para as microculturas, em meio NNN, e para o PCR convencional. O plasma foi utilizado para a sorologia anti-*Leishmania* por ELISA, empregando o antígeno de promastigotas de *L. chagasi*. As amostras positivas para HIV, Hepatite B e C, Sífilis, HTLV I e II e Doença de Chagas, na triagem do Hemoce, foram excluídas do estudo, resultando um N amostral de 351. Todas foram submetidas à cultura, ELISA e PCR convencional. Foi feito sequenciamento do DNA de parte das amostras positivas no PCR. A prevalência de doadores assintomáticos foi de 16,5%, sendo 43 (12,2%) pela sorologia e 15 (4,3%) pelo PCR. Destes, 6 (40%) amostras foram sequenciados o DNA e todas confirmaram ser do gênero *Leishmania*. Não foi isolado promastigota de nenhuma cultura. A possibilidade de risco de transmissão de LV por transfusão existe, como relatada na literatura. Este risco é mais eminente em pacientes imunossuprimidos, como crianças abaixo de 6 meses de idade, indivíduos sob tratamento imunossupressor ou com AIDS, assim como em pacientes hemodialisados com múltiplas transfusões. Nos bancos de sangue do Brasil não é realizada triagem de rotina para *Leishmania*, deste modo, parece ser essencial a recomendação de incluir a triagem para *Leishmania*, nos bancos de sangue de áreas endêmicas de LV.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, assintomáticos, doadores de sangue, Cultura, PCR, ELISA.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a public health problem worldwide. The urban transmission of *Leishmania infantum* has been growing the prevalence of asymptomatic carriers in large centers, reaching up 52%. Occurrence of *Leishmania* transmission by blood transfusion has been reporting around the world. Asymptomatic carriers represent a large contingent in LV endemic areas, therefore it is important to evaluate the possibility of blood products as a potential risk for *Leishmania* transmission. The aim of the current study was to determine the prevalence of asymptomatic LV among blood donors of Hemocenter of Ceará. It was used buffy coat of 438 blood donors, from May through November 2011. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and plasma were separated through Histopaque centrifugation. PBMC were used to perform the microculture in NNN medium and conventional PCR for detection of the parasite kDNA. Anti-leishmanial antibodies were detected through ELISA. The positive samples for HIV, Hepatitis B and C, syphilis, HTLV I and II, and Chagas disease were excluded, resulting in 351 samples that were all analyzed in culture, ELISA, and PCR tests. DNA sequencing was performed in 6 samples. The prevalence of asymptomatic donors was 16.5%, with 43 (12.2%) by serology and 15 (4.3%) by PCR. Of these, 6 (40%) samples, the DNA sequencing confirmed to be the genus *Leishmania*. The risk of LV transmission by transfusion exists, as reported in the literature. It is higher in immunosuppressed patients, such as children under 6 months of age, or adult under immunosuppressive therapy, AIDS patients as well as in those hemodialysed with multiple transfusions. In Brazil, the blood banks do not performed routine screening for *Leishmania*. Thus, the recommendation to include screening for *Leishmania* appears to be essential, in blood banks in endemic areas of VL.

Keywords: Visceral leishmaniasis, asymptomatic blood donors, Culture, PCR, ELISA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Formas promastigotas da <i>Leishmania</i>	19
FIGURA 2 -	Formas amastigotas da <i>Leishmania</i>	19
FIGURA 3 -	Paciente com leishmaniose cutânea.....	21
FIGURA 4 -	Paciente com leishmaniose mucosa.....	21
FIGURA 5 -	Paciente com leishmaniose cutânea disseminada.....	21
FIGURA 6 -	Forma cutânea difusa.....	21
FIGURA 7 -	Crianças apresentando aumento de fígado e baço.....	25
FIGURA 8 -	Paciente com LV e esplenomegalia maciça.....	25
FIGURA 9 -	Distribuição da Leishmaniose visceral no mundo, 2009.....	26
FIGURA 10 -	Casos confirmados e incidência de LV no Brasil, 1990 a 2010.....	28
FIGURA 11 -	Expansão da LV no Brasil, 1980-2009.....	28
FIGURA 12 -	Casos confirmados de incidência de LV no Ceará, 1986 a 2012.....	30
FIGURA 13 -	Município de Fortaleza e sua distribuição em Secretarias Executivas Regionais (SER).....	31
FIGURA 14 -	Casos confirmados de LV em Fortaleza por distribuição de idade no período de Janeiro de 2001 à Dezembro de 2006.....	32
FIGURA 15 -	Distribuição temporal das taxas de incidência anual de LV, Fortaleza, Ceará, 1995-2008.....	33
FIGURA 16 -	Flebotomíneo <i>Lutzomia longipalpis</i> se alimentando.....	34
FIGURA 17 -	Ciclo biológico da Leishmaniose.....	35
FIGURA 18 -	Modelo patogênico de leishmaniose em pacientes transplantados: reativação ou nova infecção.....	41
FIGURA 19 -	Ciclos epidemiológicos da <i>Leishmania infantum</i>	43
FIGURA 20 -	Placa de microtitulação para ELISA após reação.....	50
FIGURA 21 -	Teste sorológico para Leishmaniose Visceral. Teste de aglutinação direta (DAT).....	51
FIGURA 22 -	Teste imunocromatográfico rK39 para Leishmaniose Visceral.....	52
FIGURA 23 -	Desenho do projeto.....	56
FIGURA 24 -	Separação das células mononucleadas do sangue periférico.....	57
FIGURA 25 -	Cultura para <i>Leishmania</i> em duplicata em placa de 48 poços.....	57

FIGURA 26	Triagem dos doadores, após resultado de sorologia de triagem realizada no Hemoce.....	64
FIGURA 27 -	Padronização do PCR.....	65
FIGURA 28 -	Foto em gel de agarose a 2% PCR (kDNA) para <i>Leishmania</i>	65
FIGURA 29 -	Foto em gel de agarose a 2% para o gene da β -globina humana.....	66
FIGURA 30 -	Eletroferograma de uma sequência de DNA de <i>Leishmania</i> , amostra 59.....	67
GRÁFICO 1 -	Resultado dos exames sorológicos de triagem realizados no Hemoce de todos os doadores incluídos no trabalho (431), coletados durante o período de maio de 2011 à novembro de 2011.....	63
GRÁFICO 2 -	Resultado dos exames, PCR, ELISA e Cultura, realizados nos doadores de sangue incluídos no trabalho (351), coletados durante o período de maio a novembro de 2011.....	68
GRÁFICO 3 -	Distribuição dos doadores de sangue (351), pelas regionais de Fortaleza, considerando os resultados de PCR (15) e ELISA (43) positivos para <i>Leishmania</i> , no período de maio à novembro de 2011.....	71
GRÁFICO 4 -	Distribuição dos doadores com teste molecular PCR (15) e ELISA (43) positivos para <i>Leishmania</i> , e sua distribuição ao longo do ano.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Infecções assintomáticas em algumas das áreas endêmicas para <i>Leishmania</i> , no Sul da Europa e na América do Sul.....	23
Tabela 2 -	Infecções assintomáticas relatadas na literatura entre doadores de sangue.....	37
Tabela 3-	Casos relatados de transmissão de <i>Leishmania</i> por transfusão sanguínea.....	38
Tabela 4 -	Alguns casos de transmissão vertical de LV, com mães sintomáticas ou assintomáticas, descritos na literatura.....	40
Tabela 5 -	Métodos de diagnósticos para LV.....	44
Tabela 6 -	Oligonucleotídeos utilizados para detecção do gene da β -globina humana.....	59
Tabela 7 -	Oligonucleotídeos utilizados para detecção do gene da <i>Leishmania</i>	60
Tabela 8 -	Resultado do PCR do creme leucocitário, comparado com teste sorológico ELISA de doadores de sangue de sangue (351), no período de maio a novembro de 2011.....	68
Tabela 9 -	Resultado da Sorologia do Hemoce para Chagas, comparando com ELISA e PCR para <i>Leishmania</i>	69
Tabela 10 -	Resultado dos testes de PCR e ELISA para <i>Leishmania</i> e distribuição quanto ao gênero dos doadores de sangue do Hemoce (351), no período de maio a novembro de 2011.....	69
Tabela 11 -	Distribuição por faixa etária dos doadores de sangue do Hemoce (351), em relação aos resultados dos testes de PCR e ELISA, no período de maio a novembro de 2011.....	70
Tabela 12 -	Distribuição de moradia dos doadores de sangue de Fortaleza e no Estado Ceará no período de maio a novembro de 2011.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (Estufa)
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
COMEPE	Comitê de Ética em Pesquisa
DAT	Teste de aglutinação direta
DEPC	Água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dntp	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> (Desoxirribonucleotídeo trifosfato)
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
EDTA	<i>Ethylenediamine tetra-acetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
FAMED	Faculdade de Medicina
FAST	<i>Fast agglutination screening test</i> (Teste de aglutinação rápida)
FML	Fucose Manose Ligante
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HTLV	Vírus humanos T-linfotrópicos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFAT	Teste de imunofluorescência indireta
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA cinetoplasto)
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCM	Leishmaniose cutânea mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimol
MS	Ministério da Saúde

mL	Mililitro
ng	Nanograma
NNN	Neal-Novy-Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PKDL	Pós-kalazar
pmol	Picomol
RDC	Resolução da Diretoria do Colegiado
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
Rpm	Rotação por minuto
rK39	Antígeno recombinante K39
SESA	Secretaria Estadual de Saúde
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância em Saúde
SUS	Sistema Vigilância Sanitária
SVS	Secretaria de Vigilância da Saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T.B.E	Tris-Ácido bórico-EDTA (Tris-Borato-EDTA)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCM	Técnica de Microcultura
TTC	Técnica tradicional de cultura
TV	Transmissão vertical
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
WB	<i>Western Blotting</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Leishmanioses.....	18
1.1.1	<i>O parasito</i>	18
1.2	Formas Clínicas.....	19
1.2.1	<i>Leishmaniose Tegumentar (LT)</i>	20
1.2.2	<i>Leishmaniose Visceral (LV)</i>	21
1.3	Epidemiologia.....	26
1.3.1	<i>No Brasil</i>	27
1.3.2	<i>No Ceará</i>	29
1.3.3	<i>Fortaleza</i>	30
1.4	Transmissão.....	33
1.4.1	<i>Transmissão pelo vetor</i>	33
1.4.2	<i>Transmissão transfusional</i>	36
1.4.3	<i>Transmissão congênita</i>	39
1.4.4	<i>Transmissão em órgãos transplantados</i>	40
1.4.5	<i>Transmissão por compartilhamento de seringas</i>	42
1.4.6	<i>Transmissão por pessoa-pessoa</i>	43
1.4.7	<i>Transmissão por acidentes de laboratório</i>	43
1.5	Diagnósticos laboratoriais.....	44
1.5.1	<i>Diagnósticos Parasitológicos – Métodos de Detecção direta do parasito</i>	44
1.5.1.1	<i>Esfregaço em lâminas</i>	45
1.5.1.2	<i>Cultura em meio NNN</i>	45
1.5.1.3	<i>Inoculação em animal experimental</i>	46
1.5.2	<i>Diagnóstico Molecular-Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	46
1.5.3	<i>Diagnostico Sorológico</i>	48
1.5.3.1	<i>Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)</i>	49
1.5.3.2	<i>ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)</i>	49
1.5.3.3	<i>Teste de Aglutinação Direta (DAT)</i>	50
1.5.3.4	<i>Teste Imunocromatografico rK39</i>	51
2	JUSTIFICATIVA	53

3	OBJETIVOS	54
3.1	Objetivo Geral.....	54
3.2	Objetivos Específicos.....	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	Delineamento do Estudo.....	55
4.1.1	<i>População do estudo</i>	55
4.1.2	<i>Critérios de inclusão e exclusão do estudo</i>	55
4.2	Amostras.....	55
4.2.1	<i>Processamentos das amostras de creme leucocitário. Separação das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)</i>	56
4.3	Microcultura em Neal-Novy-Nicolle (NNN).....	56
4.4	Extração do DNA de <i>Leishmania</i>	58
4.4.1	<i>Extração do DNA da cepa de Leishmania amazonenses</i>	58
4.4.2	<i>Quantificação das amostra do DNA extraído</i>	58
4.5	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	59
4.5.1	<i>PCR da β-globina humana</i>	59
4.5.2	<i>PCR convencional para Leishmania</i>	60
4.5.3	<i>Sequenciamento</i>	60
4.6	Sorologia ELISA.....	61
4.6.1	<i>Preparação do antígeno de promastigotas para a realização da técnica ELISA</i>	61
4.6.2	<i>ELISA</i>	61
4.7	Considerações éticas.....	62
4.8	Análise estatística.....	62
5	RESULTADOS	63
5.1	População Estudada.....	63
5.1.1	<i>Triagem Sorológica dos Doadores de Sangue do Hemoce</i>	63
5.2	Pesquisa de <i>Leishmania</i> nos Doadores de Sangue Aptos (351).....	64
5.2.1	<i>Métodos Parasitológicos</i>	64
5.2.1.1	<i>Cultura em NNN para Leishmania</i>	64
5.2.2	<i>Métodos Moleculares</i>	65
5.2.2.1	PCR Convencional da Cultura da cepa de <i>Leishmania amazonenses</i> , cepa BA-125.....	64

5.2.2.2	PCR Convencional para a Detecção de <i>Leishmania</i>	65
5.2.2.3	Controle Interno do Gene da β -globina.....	66
5.2.2.4	Sequenciamento dos Genes Amplificados no PCR.....	66
5.2.3	<i>Detecção de Anticorpos Específicos para Leishmania Através de ELISA..</i>	67
5.3	Caracterização dos Doadores e Distribuição Quanto à Pesquisa de PCR e ELISA para <i>Leishmania</i>	69
5.3.1	<i>Quanto ao Gênero</i>	69
5.3.2	<i>Quanto à Idade</i>	70
5.4	Distribuição dos Doadores com Resultado Positivo para <i>Leishmania</i> , em Relação ao Local de Moradia.....	70
5.5	Distribuição dos Doadores com Resultado Positivo para <i>Leishmania</i> , em Relação a Distribuição ao Longo do Ano.....	71
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICES	103
	A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	103
	ANEXOS	104
	A – MAPA DAS REGIONAIS DE FORTALEZA CEARÁ.....	104
	B – MAPA DA REGIÃO METROPOLITANA DE FORTALEZA – CEARÁ.....	105

INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

1.1.1 O Parasito

Leishmanioses são infecções parasitárias causadas por protozoários unicelulares, digenéticos da ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*, transmitidos a mamíferos (incluindo os seres humanos) por fêmeas de flebotomíneos (GENARO, 2003; CHENICK *et al.*, 2006, ANTINORI *et al.*, 2012). Assim, são infecções zoonóticas, afetando outras espécies que não o homem, o qual pode ser envolvido secundariamente, podendo a transmissão inter-humana ser eventualmente predominante ou exclusiva (LESSA *et al.*, 2007).

As leishmanias, de ciclo heteroxênico, são parasitas intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear, e acometem órgãos como medula óssea, baço, fígado e linfonodos. Possuem dois estágios evolutivos, de acordo com o hospedeiro, vertebrado ou invertebrado: promastigota e amastigota, respectivamente (GENARO, 2003; CHENICK *et al.*, 2006, ANTINORI *et al.*, 2012).

No hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* se reproduz dentro do fagolisossomo de células do sistema fagocítico mononuclear, na forma amastigota que é esférica, imóvel e com tamanho aproximado de 2,5 µm de diâmetro (Fig.1). Junto à bolsa flagelar, encontra-se uma estrutura denominada cinetoplasto, rica em DNA mitocondrial, o kDNA. As formas amastigotas estão adaptadas para resistirem à temperatura do corpo dos mamíferos (PEARSON & SOUSA, 1996).

No hospedeiro invertebrado, o parasito tem uma forma flagelada, denominada promastigota (Fig. 2), que é móvel, com aproximadamente 15-26 µm de comprimento, com cinetoplasto localizado na extremidade do flagelo, o núcleo é central. A promastigota vive no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Promastigotas crescem em temperatura ambiente variando de 22°C a 26°C (PEARSON & SOUSA, 1996; CUNNINGHAM, 2002; GONTIJO & CARVALHO, 2003; RIERA *et al.*, 2008).

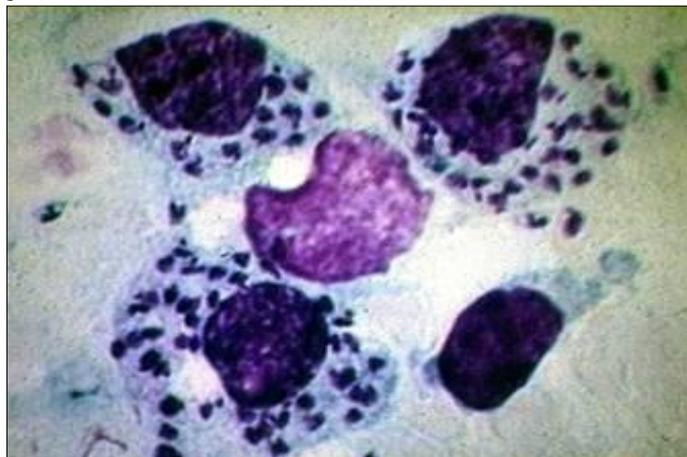
Infecção por *Leishmania* pode dar origem a um espectro de doenças, dependendo da espécie, da virulência e do tamanho do inóculo do parasita, assim como da resposta imune do hospedeiro (PEARSON & SOUSA, 1996).

Figura 1- Formas promastigotas da *Leishmania*.



Fonte: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=353&sid=6>. Acessado em 13/07/2012.

Figura 2- Formas amastigotas da *Leishmania*.



Fonte: http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Leishmania.htm. Acessado em 13/07/2011.

1.2 Formas Clínicas

As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*. Apresentam um amplo espectro de formas clínicas, que podem variar desde uma infecção assintomática, ou a forma com comprometimento visceral ou a que acomete pele e mucosas (ROBERTS, 2005). Estas diferenças nas manifestações clínicas dependem da espécie envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Portanto, é importante, saber a espécie do parasita, porque tem implicações no tratamento, bem como na compreensão da epidemiologia e do controle (WHO, 2010).

É importante ressaltar que uma única espécie de *Leishmania* pode produzir mais de uma síndrome clínica, e cada síndrome pode ser causada por múltiplas espécies (PEARSON & SOUSA, 1996; PEARSON *et al.*, 2000).

1.2.1 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A LT no Novo Mundo é causada por uma variedade de espécies, sendo os principais agentes etiológicos a *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania guyanensis*. No Velho Mundo, as espécies responsáveis pelas manifestações da doença são *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* (LAINSON *et al.*, 1987; WHO, 2010).

A LT apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas: Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose muco-cutânea (LMC), Leishmaniose cutânea disseminada e a Leishmaniose cutânea-difusa (LCD).

Pacientes com LC apresentam lesões na pele em seu início no local de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor, e surgem após um período de incubação que pode variar de 10 dias a três meses. A lesão surge como uma pápula eritematosa, que progride lentamente para nódulo ou ulcera com bordos em moldura (Fig.3). A lesão primária geralmente é única, quando ocorrem múltiplas lesões, elas são provocadas por várias picadas pelo flebotômico ou pela disseminação linfática local. Geralmente, as lesões surgem em áreas descobertas do corpo, mas podem também ser assintomáticas (DESJEUX, 2004; GONTIJO & CARVALHO, 2003). Verificou-se que noventa por cento dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Brasil, Peru, Irã, Arábia Saudita e na Síria (DEY & SINGH, 2006).

A LMC ou espúndia (Fig. 4) caracteriza-se por ser uma doença mutilante, que provoca a destruição da nasofaringe. O acometimento de outras mucosas, que não as das vias aéreas superiores, é excepcional (DESJEUX, 2004, GONTIJO & CARVALHO, 2003). Noventa por cento dos casos de LMC concentram-se na Bolívia, Brasil e Peru (DEY & SINGH, 2006).

Leishmaniose cutânea disseminada caracteriza-se pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e acneiformes (semelhantes à acne), envolvendo várias partes do corpo, inclusive a face e o tronco, distantes do sítio de inoculação primária (Fig.05). Pode haver febre, dores musculares, mal-estar geral e emagrecimento. As lesões podem ser numerosas, mas respondem ao tratamento. A forma cutânea disseminada apresenta a imunidade celular preservada (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A LCD é uma doença de longa duração, devido a uma resposta imunitária celular deficiente. Apresenta lesões nodulares disseminadas por toda a pele e que não ulceram e não cicatrizam espontaneamente e são classicamente refratárias ao tratamento medicamentoso

(Fig. 6). Alguns pacientes apresentam *facies leonina*, assemelhando-se à hanseníase virchowiana. (DESJEUX, 2004, GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Figura 3- Paciente com leishmaniose cutânea. Figura 4- Paciente com leishmaniose mucosa.



Fonte: Dr. Anastácio Queiroz



Fonte: Dr. Anastácio Queiroz

Figura 5- Paciente com leishmaniose cutânea disseminada.



Fonte: Dr. Anastácio Queiroz

Figura 6- Forma cutânea difusa.



Fonte: Dra Aldina Barral

1.2.2 Leishmaniose Visceral (LV)

A primeira descrição da LV foi feita na Grécia em 1835, onde anteriormente era conhecida como “ponos” ou “hapoplinacon”. Em 1869 foi denominada na Índia de “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (Calazar) em virtude do escurecimento da pele que ocorre durante a doença (MARZOCHI, 1981; JERONIMO *et al.*, 2005).

O primeiro relato de LV no Brasil ocorreu em 1934, onde, em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela, foram encontradas as formas amastigotas (PENNA, 1934; GONTIJO & MELO, 2004). O primeiro surto de LV ocorreu 20 anos depois, em Sobral no Ceará (GONTIJO & MELO, 2004; SOUZA, 2009).

A LV é causada por parasitas pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, que inclui *L. donovani*, no Velho Mundo, e *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi*), no Novo Mundo. Com base na sequência do genoma, características biológicas e as manifestações clínicas semelhantes da doença, as espécies, anteriormente referidas como *L. chagasi* e *L. infantum*, passaram a ser consideradas *L. infantum chagasi* (MAURICIO *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2012).

LV é a forma mais grave das leishmanioses. *Leishmania infantum chagasi* produz um espectro de quadros clínicos, que pode variar desde a forma assintomática, uma infecção geralmente auto-resolutiva, até a doença crônica, caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e emagrecimento. Ela pode ser fatal na maioria dos casos sintomáticos, se não tratado. E, em pacientes que receberam tratamento, a mortalidade pode chegar a 10% (BADARÓ *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1992; DESJEUX, 2004; DEY & SING, 2006).

O período médio de incubação da LV é de 2 a 6 meses (HERWALDT, 1999; MURRAY *et al.*, 2005), mas é bastante variável, podendo ser curto como 10 dias ou longo, como 34 meses (PEARSON & QUEIROZ, 1996) ou até vários anos (HERWALDT, 1999; MURRAY *et al.*, 2005).

A LV é caracterizada por uma clássica tríade clínica constituída por febre irregular, palidez e esplenomegalia (MICHEL *et al.*, 2011). Pode ser classificada como assintomática, oligossintomática (subclínica), aguda e crônica, que podem evoluir para a forma grave (GAMA *et al.*, 2004).

Na forma assintomática, os indivíduos aparentemente saudáveis, sem sintomas encontram-se infectados pela *Leishmania*. Esta forma é detectada pela resposta imunológica específica para antígenos de *Leishmania* (sorologia com baixos títulos ou intradermorreação de Montenegro positiva), ou pela detecção do parasito, em PCR ou isolado em cultura. Geralmente é encontrada em indivíduos residentes em áreas endêmicas da doença (HO *et al.*, 1982; BADARÓ *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1992; SHARMA *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2002; FAKHAR *et al.*, 2008; MICHEL *et al.*, 2011).

Em 1974 o termo “infecção assintomática” foi utilizado pela primeira vez em um estudo realizado na Itália, usando o teste cutâneo (PAMPIGLIONE *et al.*, 1974). No Brasil, o termo foi utilizado em 1984 (BADARÓ *et al.*, 1986).

O número de portadores assintomáticos é muito mais elevado do que o número de pacientes com a doença manifesta. Sua prevalência tem sido relatada variando de 30 a 73,4% (Tabela 1). A maioria dos portadores assintomáticos apresenta infecção auto resolutiva,

apenas 12-20% deles desenvolvem a doença. Características, inerentes ao parasito, bem como ao hospedeiro, parecem estar implicadas na definição da evolução. O estado geral de saúde e a condição fisiológica do hospedeiro mostram influencia na progressão da doença, podendo ser observada, por exemplo, pela alta incidência de LV em crianças e idosos (JERONIMO *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2002; OLIVA *et al.*, 2006; BARÃO *et al.*, 2007; BAÑULS *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2011; JIMENEZ-MARCO *et al.*, 2012). A virulência da cepa também é outro aspecto relevante na determinação da manifestação. (HIDE *et al.*, 2013).

Tabela 1-Infecções assintomáticas em algumas das áreas endêmicas para *Leishmania*, no Sul da Europa e na América do Sul.

País	Técnicas	Nº habitantes testados	Resultados (%)	Autores
SUL DA EUROPA				
França, Alpes Marítimes	LST	237	30	Marty <i>et al.</i> ; 1992
França, Alpes Marítimes	LST/WB	50	32/38	Marty <i>et al.</i> ; 1994
França, Alpes Marítimes	LST/WB	47	46,8/42,5	Marty <i>et al.</i> ; 1995
Espanha, Província Málaga	LST	1286	44	Acedo Sanchez <i>et al.</i> ;1996
Espanha, Província Málaga	LST	1258	42,4	Morillas <i>et al.</i> ; 1996
Espanha, Região Alacanti	LST	184	52,8 adultos/ 11,5 crianças	Moral <i>et al.</i> ; 2002
Espanha, Seville	IFAT	95	24	Martin-Sanchez <i>et al.</i> ; 2004
Área de Marseille	PCR	81	58	Mary <i>et al.</i> ; 2006
AMÉRICA DO SUL				
Brasil, Bahia	LST/ELISA (SLA)	135	45/27	D'Oliveira <i>et al.</i> ; 1997
Brasil, Rio Grande do Norte	LST/ ELISA (SLA)	345	38.6% / 24,6	Lima <i>et al.</i> ; 2012.
Brasil, Piauí	LST/ELISA (SLA)	167/168	50/13,9	Werneck <i>et al.</i> ; 2002
Brasil, Maranhão	LST/ ELISA (RK39) /ELISA(SLA)/	1520	61,1/19,4/19,7	Nascimento <i>et al.</i> ; 2005
Brasil, Minas Gerais	ELISA(SLA)/ ELISA(rK39/qPCR)	1875	2,8 / 14,9/ 14,7	Dos Santos Marques <i>et al.</i> , 2012
Brasil, Pará (Belém)	LST e/ou IFAT	120	73,4	Silveira <i>et al.</i> ; 2010

Fonte: Adaptado de MICHELet *et al.*, 2011.ELISA – Ensaio imunoenzimático; IFAT – Teste de imunofluorescência indireta; LST –Teste de pele para *Leishmania*;PCR – Reação em cadeia da polimerase;WB - Western Blot.

O papel dos portadores assintomáticos infectados com *Leishmania*, na cadeia de transmissão, ainda não está bem estabelecido. Esse fato, talvez possa explicar porque o

controle da doença estabelecido pelo Ministério da Saúde (MS) não seja eficaz, tendo em vista que as medidas de controle levam em conta o cão, como principal reservatório da *Leishmania infantum*. Desse modo, a possibilidade de transmissão do parasita por portadores assintomáticos deve ser melhor avaliada (COSTA *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

A forma oligossintomática, ou subclínica, ocorre também em indivíduos residentes em áreas endêmicas, e acomete principalmente crianças. O quadro clínico é discreto e os sintomas são febre, diarreia, tosse, mal-estar, hepatomegalia leve, esplenomegalia e, eventualmente ligeiras alterações laboratoriais (BADARÓ *et al.*, 1986). A associação de febre, hepatomegalia, hipergamablobulinemia e aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS) pode ser preditivo de LV oligossintomática (GAMA *et al.*, 2004). Aproximadamente 25% dos oligossintomáticos evoluem para LV ativa e os demais controlam a doença (BADARÓ *et al.*, 1986).

Na forma aguda da doença, a manifestação dos sintomas é abrupta. A maioria dos casos inclui febre, com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. O estado geral do paciente fica comprometido, o baço geralmente não ultrapassa a 5 cm do rebordo costal esquerdo. Frequentemente, esses pacientes apresentam tosse e diarreia. A ocorrência de esplenomegalia e leucopenia distingue a forma aguda da oligossintomáticas, e está presente em praticamente 100% dos casos de LV aguda (PEARSON & QUEIROZ, 1996; MS, 2006).

A LV crônica apresenta longa evolução. Os sintomas são bastante diversos, começando com febre irregular, perda de peso e aumento de fígado e baço (Fig.7) que persistem por meses. A esplenomegalia (Fig.8) é bastante proeminente, frequentemente mole à palpação, podendo se complicar, enquanto a hepatomegalia é menos marcante. Apresentam anemia (normocitose e normocromia), geralmente trombocitopenia e neutropenia, refletindo um quadro de comprometimento da medula óssea e sequestro esplênico. O aumento das enzimas hepáticas também pode ser observado. Os doentes apresentam caquexia, podendo ocorrer sangramento gengival, petéquias e outros sangramentos (BADARÓ *et al.*, 1986; PEARSON & QUEIROZ, 1996; GAMA *et al.*, 2004; MALTEZOU, 2000). Linfadenopatia é bastante observada no Sudão, na China e no Brasil (PESSÔA & MARTINS, 1982; BARRAL *et al.*, 1992).

A LV grave é uma manifestação que pode ocorrer em pacientes com a forma aguda ou crônica. Segundo os critérios do Ministério da Saúde, deve ser considerado grave, todo paciente com idade inferior a seis meses ou maior que 40 anos, com desnutrição grave e co-

morbidades ou uma das manifestações clínicas: icterícia, fenômenos hemorrágicos (exceto epistaxe), anasarca, sinais de toxemia (letargia, má perfusão cianose, taquicardia ou bradicardia, hipoventilação ou hiperventilação e instabilidade hemodinâmica) pode ocorrer disfunção hepática, icterícia e ascite, apresentando alto risco para outras infecções, como otite média, infecções gastrointestinais, pneumonia e complicações como septicemia e sangramento (MS, 2005). Recentemente, foi construído dois modelos de sistema de prognóstico de risco de morte, baseado em escores, onde a cada manifestação clínica ou laboratorial é atribuída um peso. O estudo de validação desse modelo, identificou que os pacientes com pontuação ≥ 4 , baseados apenas nos critérios clínicos, ou com pontuação ≥ 6 , nos critérios clínicos e laboratoriais, são os que apresentam risco aumentado de evoluir para óbito (MS, 2011).

Figura 7- Crianças apresentando aumento de fígado e baço.



Figura 8 - Paciente com LV e esplenomegalia maciça.



Fonte: MURRAY *et al.*, 2005. Fonte: GRIENSVEN & DIRO, 2012.

A LV vem se tornando uma importante infecção oportunista, em pessoas com infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, nesses casos, infecções no trato gastrointestinal e respiratório são frequentes (HERWALDT, 1999; GONTIJO & MELO, 2004; MURRAY *et al.*, 2005 ; ALVAR *et al.*, 2008; GRIENSVEN & DIRO, 2012).

A LV pode mimetizar outras doenças que apresentam sinais e sintomas comuns, tais como Doença de Chagas Aguda, Malária, Esquistossomose Aguda, Febre Tifoide, Cirrose com Hipertensão Portal, Tripanossomíase Africana, Salmonelose Septicêmica Prolongada e Tuberculose. Desse modo, o diagnóstico clínico da LV é considerado complexo (GONTIJO & MELO, 2004; SINGH & SIVAKUMAR, 2005).

Para controle e tratamento adequada da LV, faz-se necessário um diagnóstico precoce dos casos. Como a maioria das drogas leishmanicidas são tóxicas, é importante que haja a confirmação do diagnóstico por exames laboratoriais (DAVIES *et al*, 2003).

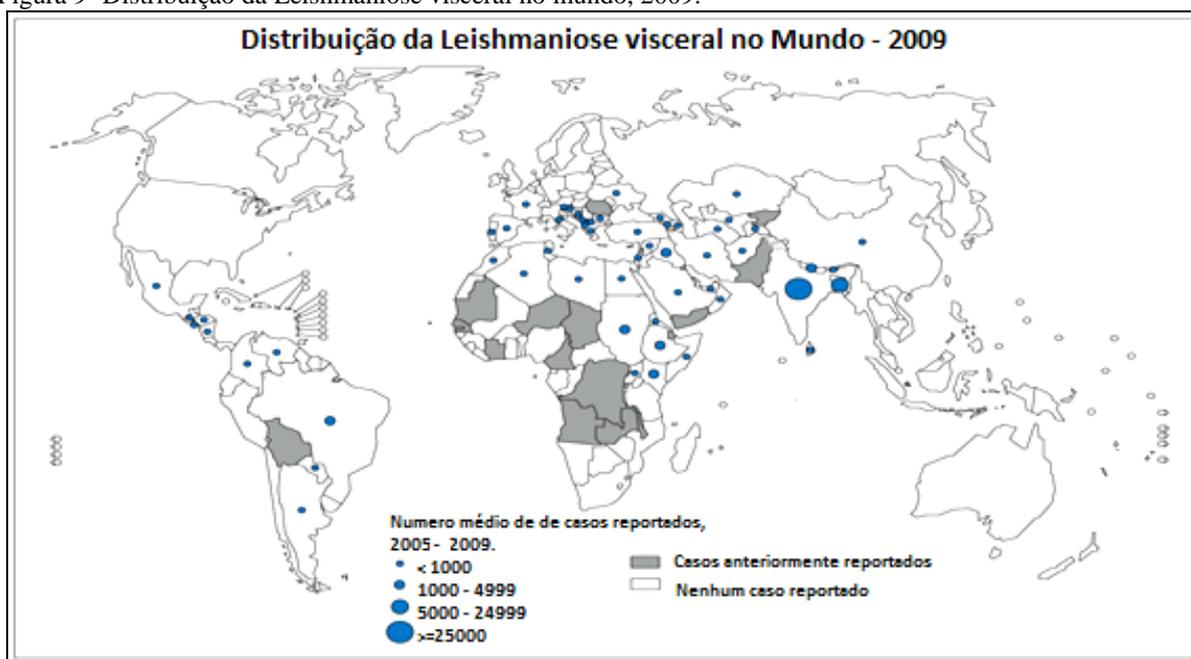
1.3 Epidemiologia

A leishmaniose é considerada uma das doenças negligenciadas, sendo endêmica em 98 países, nos quatro principais continentes (Fig.9). Constitui um grande problema de saúde pública, afetando principalmente os mais pobres, nos países em desenvolvimento (WHO, 2010).

A prevalência da leishmaniose é de 12 milhões de casos em todo o mundo, ocorrendo cerca de dois milhões de novos casos anualmente, dos quais 500 mil são de leishmaniose visceral, e 350 milhões das pessoas encontram-se em risco de contrair a doença (BASTIEN, 2011).

Noventa por cento, dos casos de LV relatados, ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. Acredita-se que, dos casos estimados, apenas 600.000 são relatados, pois dos 98 países onde a doença existe em apenas 33 deles é obrigatório o preenchimento dos relatórios e notificação da doença. Por conta disso, o número real de casos é desconhecido (WHO, 2008).

Figura 9 -Distribuição da Leishmaniose visceral no mundo, 2009.



Fonte: http://www.who.int/tdr/dw/leish_map.htm.

A epidemiologia destas doenças é complexa, com ciclos antro-zoonóticos envolvendo uma grande diversidade de vetores flebotomíneos e de reservatórios mamíferos, dependendo das espécies de *Leishmania* (ASHFORD, 2000).

Nos últimos 10 anos, grandes descobertas científicas, na área de diagnóstico, tratamento e prevenção da leishmaniose, têm sido relatadas, mas programas de controle em funcionamento são raros, e os índices de mortalidade e morbidade da leishmaniose no mundo continuam preocupantes (WHO, 2010).

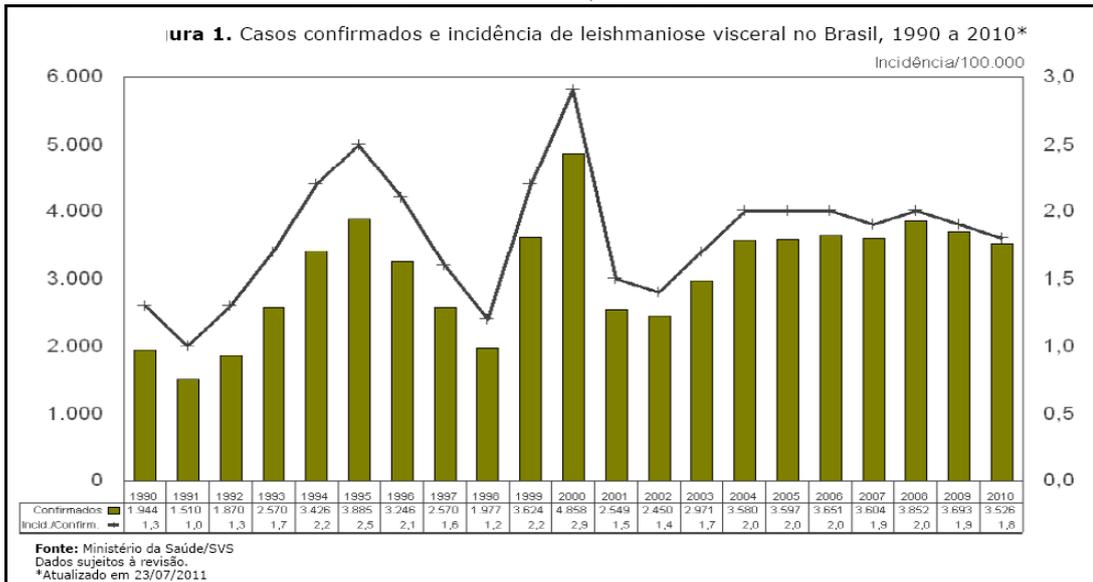
1.3.1 No Brasil

O primeiro caso de LV no Brasil foi relatado por Migone, em 1913, através de um material de necrópsia de uma paciente da cidade de Boa Esperança, Estado do Mato Grosso (MIGONE, 1913; ALENCAR, 1983; GRIMALDI JR, 1993; SOUZA, 2009).

Nas Américas, o Brasil responde por 90% dos casos registrados de LV, e corresponde ao terceiro maior foco de LV no Mundo (MS, 2008). Mas, diferentemente de alguns outros focos de LV nas Américas, no Brasil os casos são obrigatoriamente notificados e os dados de vigilância são mais completos (BERN *et al.*, 2008). De acordo com a Portaria SVS/ MS Nº 5, de 21 de fevereiro de 2006, todo caso de LV é de notificação obrigatória e deve ser realizada em até 48 horas, com isso o objetivo é reduzir a taxa de letalidade e o grau de morbidade, através do diagnóstico e tratamento precoces dos casos, e tomada de medidas de prevenção e controle (MS, 2006).

No Brasil, no período de 1980 a 2005, foram notificados 59.129 casos de LV, sendo que 82,5% na região nordeste do país (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008, HARHAY *et al.*, 2011). Na década de 1980, o Brasil apresentava uma incidência média de 1.500 casos por ano e, entre 2000 e 2006, passou para uma média de mais de 3.000 casos por ano. No período de 1990 a 2010, o maior número de casos aconteceu no ano de 2000 com 4.858 casos confirmados no país (Fig.10).

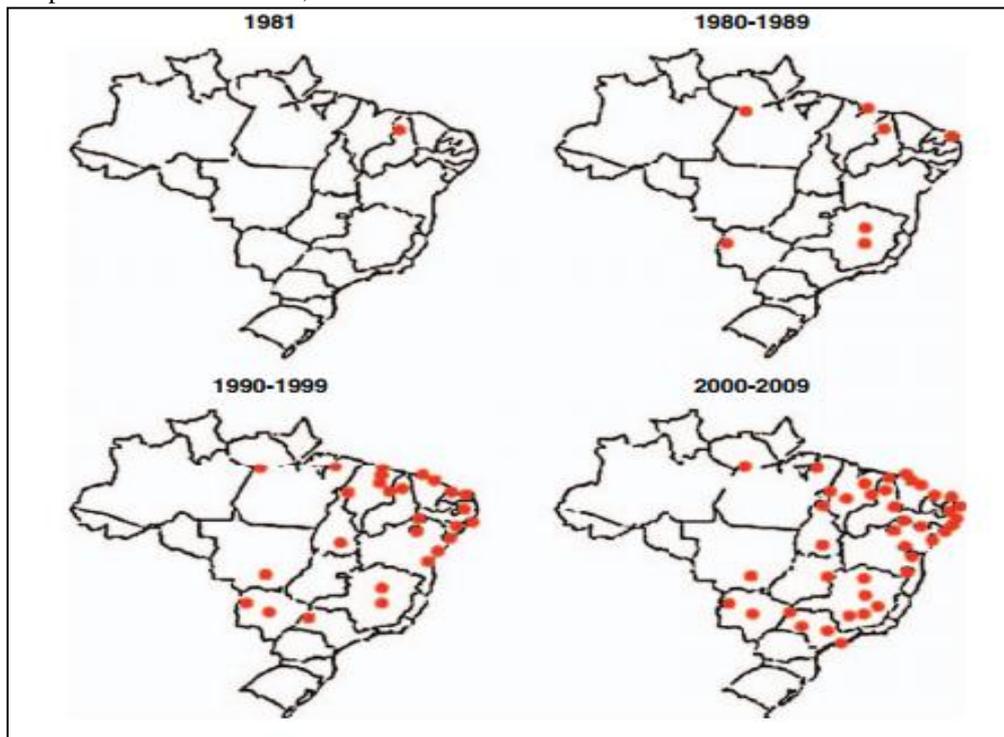
Figura 10 - Casos confirmados e incidência de LV no Brasil, 1990 a 2010.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS, 2011.

Desde o ano de 1999, o Brasil tem mostrado um aumento acentuado no número de casos de LV (Fig. 11), com a doença espalhando-se para o sul e para o leste dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. A doença é encontrada em quatro das cinco regiões brasileiras. (DE CAMARGO-NEVES *et al.*, 2003; ROMERO *et al.*, 2010; ANTINORI, 2012).

Figura 11- Expansão da LV no Brasil, 1980-2009.



Fonte: Adaptado de HARHAY *et al.*, 2011. Pontos mostram cidades com 100.000 habitantes com mais de 10 casos de LV por ano.

O maior número de casos ocorreu, inicialmente, nas áreas rurais pobres do Nordeste (BERN *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009), que é responsável por 70 a 90% dos casos LV. No início de 1980, ocorreu a primeira epidemia urbana em Teresina, seguida por surtos em São Luís, Natal, Fortaleza e em outros grandes centros, como Belo Horizonte e Campo Grande (COSTA *et al.*, 1990; WHO, 2002).

Os surtos urbanos de LV foram atribuídos a migração de famílias das áreas rurais para as favelas de áreas peri-urbanas das grandes cidades, por causa da seca, perda de terras agrícolas e da pobreza (ARIAS *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 2005; WERNECK *et al.*, 2007; BERN *et al.*, 2008).

Os principais fatores de risco da ocorrência de epidemias de LV, nos grandes centros urbanos, são o rápido crescimento de favelas densamente povoadas, degradação ambiental, condições de vida precárias, lixo acumulado, falta de saneamento básico, o convívio muito próximo homem/reservatório (cão), aumento da densidade do vetor, desmatamento acentuado, e aumento dos portadores assintomáticos (COSTA *et al.*, 2005; MONTEIRO, *et al.*, 2005; WERNECK *et al.*, 2007).

1.3.2 No Ceará

No Ceará, no período de 1932 a 1948, foram diagnosticados “post-mortem”, pelo Serviço de Viscerotomia do Serviço Nacional da Febre Amarela, os primeiros 132 casos de LV. Os primeiros casos eram dos municípios de Senador Pompeu, Jaguaruana, Mombaça e Ipu (ALENCAR, 1953; GONÇALVES, 2010).

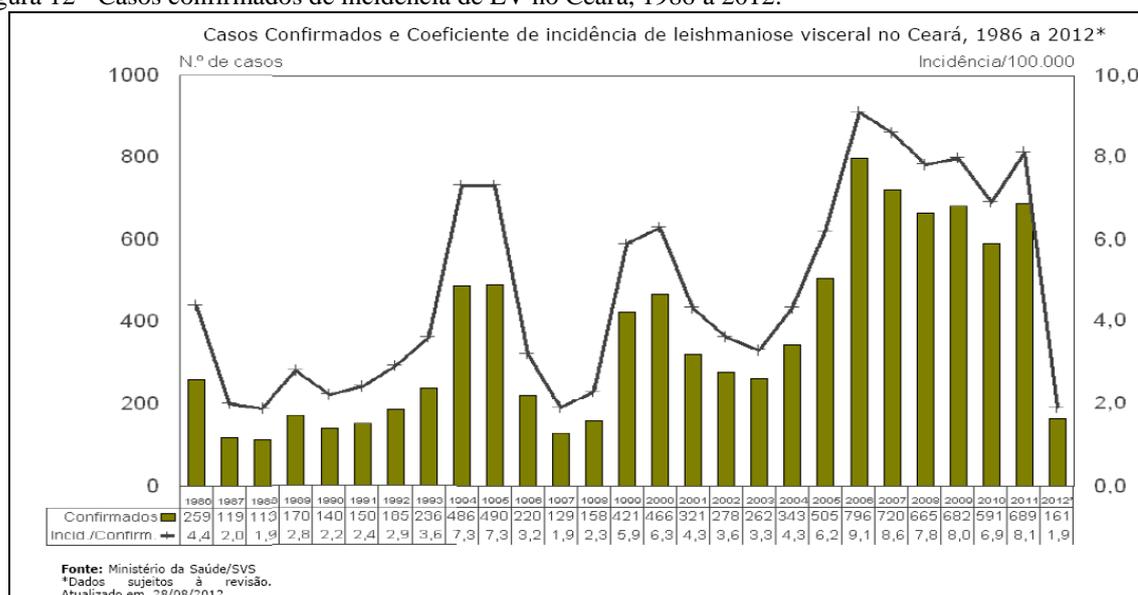
O Ministério da Saúde (MS) classifica as áreas de transmissão em quatro níveis, de acordo com a média de casos dos últimos três anos: área sem transmissão, área com transmissão esporádica ($\geq 0,1$ e $\leq 2,3$ casos), área de transmissão moderada ($\geq 2,4$ e $\leq 4,3$ casos) e áreas de transmissão intensa ($\geq 4,4$ casos). Essa última foi subdividida em três níveis: transmissão intensa baixa ($\geq 4,4$ e $\leq 16,9$), transmissão intensa média ($\geq 17,0$ e $\leq 55,6$) e transmissão intensa alta ($\geq 55,7$), (CEARÁ, 2009).

No período de 2006 a 2008, de acordo com a classificação epidemiológica adotada pelo Ministério da Saúde, 131 municípios do Ceará apresentaram transmissão de LV, dos quais 24% (32) são considerados prioritários para serviços de vigilância e controle vetorial e de reservatórios domésticos. Destes prioritários 15 são de transmissão intensa, 17 de transmissão moderada e 99 municípios com transmissão esporádica (BRASIL, 2009).

O Ceará apresenta 21(11,4%) municípios com transmissão intensa, 24 (13%) com transmissão moderada, 97(52,7%) com transmissão esporádica e 42 (22,8%) sem transmissão de casos. Entre os municípios com transmissão intensa, 13 (61,9%) estão com intensa baixa, 07 (33,3%) intensa média e 01 (4,8%) intensa alta (CEARÁ, 2012).

No período de 2000 a 2009 a LV no Ceará acometeu todas as faixas etárias, mas podemos destacar um aumento proporcional significativo em menores de 4 anos de idade. No ano de 2009 estes representavam 40% dos casos, ocorrendo também um aumento em pacientes acima de 60 anos (CEARÁ, 2010). No ano de 2006 ocorreu a maior incidência com 796 casos (Fig.12). No período de 2001 a 2012 foram confirmados 6.016 casos no Ceará. (CEARÁ, 2012). Já em 2012, foram notificados 396 casos, sendo confirmados 161 em 49 municípios, com 16 óbitos (CEARÁ, 2012). Os municípios com maior número de casos confirmados foram Fortaleza com 49 casos, Sobral 21, Coreaú 11, Camocim 06 e Juazeiro do Norte 05 (CEARÁ, 2012).

Figura 12 - Casos confirmados de incidência de LV no Ceará, 1986 a 2012.



Fonte: CEARÁ, 2012

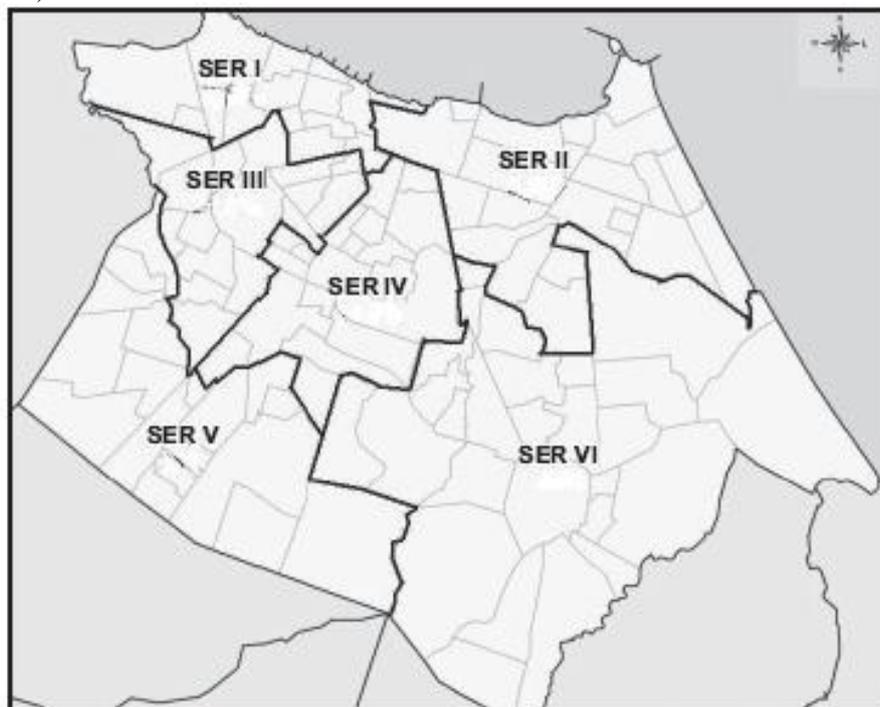
1.3.3 Fortaleza

A cidade de Fortaleza possui 313 Km² e uma população de 2.452.185 habitantes (IBGE, 2010). A população da cidade esta desigualmente distribuída em 116 bairros (GONÇALVES, 2010).

Em 1º de janeiro de 1997 foram criadas as Secretarias Executivas Regionais (SER) pela Lei nº 8.000, e modificaram a gestão da cidade, que foi dividida em seis regiões (Fig. 13), cada

uma delas com bairros circunvizinhos, com semelhanças em termos de necessidades e problemas. É uma cidade heterogênea, com grandes desigualdades sociais; cerca de um terço da população mora em favelas, que se distribuem em todos os bairros da cidade (ANEXO A).

Figura 13 - Município de Fortaleza e sua distribuição em Secretarias Executivas Regionais (SER).

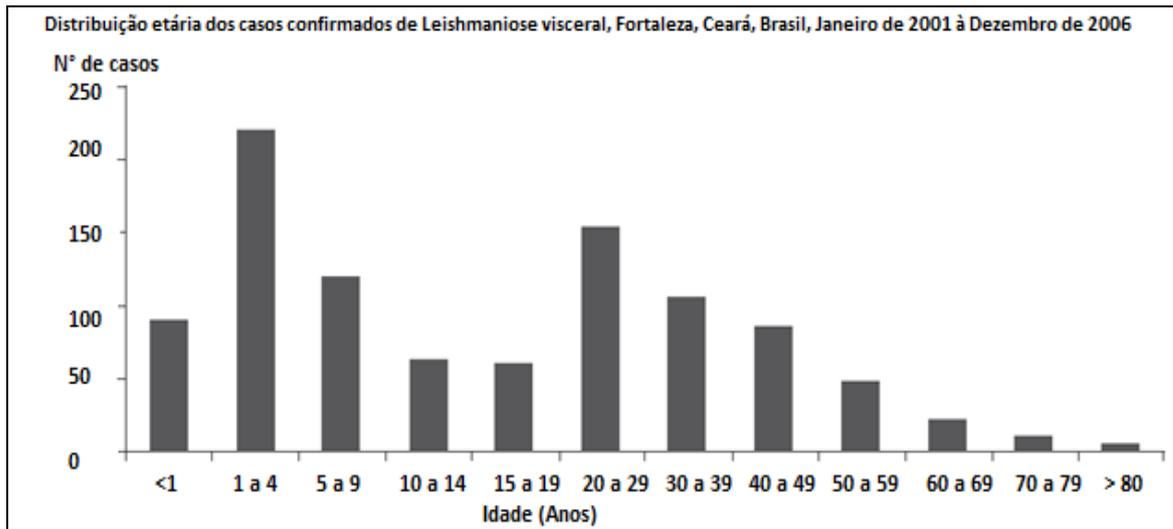


Fonte: Prefeitura Municipal de Fortaleza.

Em Fortaleza, no período de 2001 a 2007 foram notificados 1.052 casos de LV, sendo 65,1% do sexo masculino, onde as regionais SER III e SER I obtiveram a maior concentração dos casos com 1.006 casos notificados, representando 50,6%. Neste período foram registrados 51 óbitos por LV (LIMA & BATISTA, 2009).

São poucos os estudos de LV no Ceará, mas de acordo com um estudo transversal (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009), realizado na cidade de Fortaleza no período de Janeiro de 2001 à Dezembro de 2006, 1.376 casos de LV no período foram registrados e pode se observar que 65% dos casos eram do sexo masculino, a faixa etária predominante foi de crianças de 4 a 5 anos, e jovens na faixa de 25-26 anos (Fig. 14). No ano de 2012, com dados ainda não encerrados pela Secretaria da Saúde, 60% dos casos pertencem ao sexo masculino (CEARÁ, 2012).

Figura14-Casos confirmados de LV em Fortaleza, por distribuição de idade, no período de Janeiro de 2001 àDezembro de 2006.



Fonte: ALBUQUERQUE *et al.*, 2009.

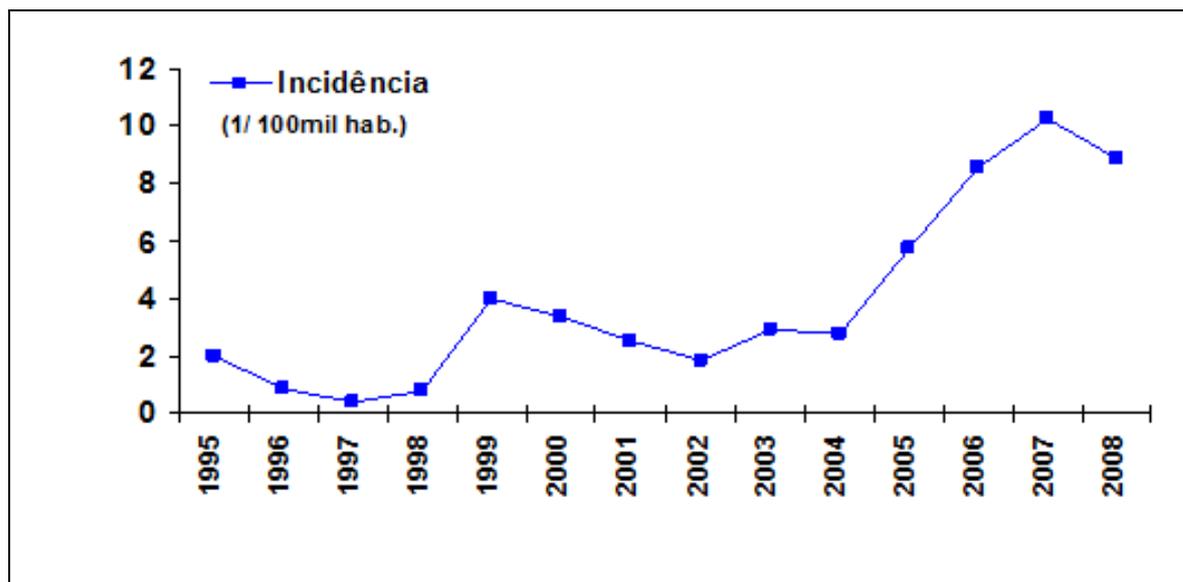
Em 2009, o município de Fortaleza registrou 236 casos, seguido de Caucaia com 39, Maracanaú com 35 e Sobral com 32 casos (BRASIL, 2011).

Em 2011, os municípios com maior número de casos confirmados foram Fortaleza com 272 casos, Sobral com 62, Caucaia com 47, Maracanaú 19, Granja 17, Nova Russas 12, Canindé 10, Ipueiras, Juazeiro do Norte e Maranguape 09, Mauriti e Milagre 08(CEARÁ, 2012).

Em 2012 dos 396 casos notificados, Fortaleza confirmou 49 casos, Sobral 21, Maracanaú, Coreau 11, Camocim 06 e Juazeiro do Norte 05 (CEARÁ, 2012). Segundo informe epidemiológico de 2012, a cidade de Fortaleza possui uma transmissão intensa alta ($\geq 55,7$ casos), e os municípios de Caucaia, Juazeiro do Norte, Sobral, Barbalha, Maracanaú, Crato e Canindé possuem transmissão intensa baixa($\geq 4,4$ e $\leq 16,9$ casos)(CEARÁ, 2012).

A incidência de LV em Fortaleza no período de 1995 a 2008 mostra que, a partir de 2005 ocorreu um aumento gradativo e contínuo da doença, evidenciando o caráter epidêmico da doença em Fortaleza (Fig.15).

Figura 15- Distribuição temporal das taxas de incidência anual de LV, Fortaleza, Ceará, 199 – 2008.



Fonte: GONÇALVES, 2010.

1.4 Transmissão

A transmissão da LV pelo vetor é a forma mais comum, mas existem outras formas de transmissão: transfusional, congênita, através de órgãos transplantados, por compartilhamento de agulhas em usuários de drogas, por contato sexual, em acidentes de laboratório e transmissão pessoa-pessoa. Em áreas endêmicas, a transmissão por outros meios parece ser irrelevante (SINGH, 2006; DEY & SINGH, 2006).

1.4.1 Transmissão pelo Vetor

A transmissão da *Leishmania* ao homem ocorre pela picada de flebotomíneofêmea, do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo, ou *Phlebotomus* no Velho Mundo. Existem cerca de 30 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* que foram identificadas como vetores da LV (HERWALDT, 1999; PEARSON & QUEIROZ, 1996). São pertencentes da ordem *Diptera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

Os flebotomíneos (Fig.16) são dípteros hematófagos de aproximadamente 2-3 mm de comprimento, com pernas longas e delgadas e possuem o corpo densamente piloso. Costumam manter suas grandes asas eretas dirigidas para trás e para cima, mesmo em repouso, o que o diferencia de outros dípteros. Mantém a cabeça fletida para baixo e tem como característica um voo curto e baixo, tipo saltitante. Sua coloração é de cor clara (castanho claro ou cor de palha) (CAMARGO & BARCINSKI, 2003) e é popularmente

conhecido como mosquito palha, tatuquiras, birigui(LIMA *et al.*, 2009). O flebotomíneo tem hábito noturno(REBÊLO, 2001).

Figura 16 -Flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* se alimentando.



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

Flebotomíneos fêmeas são responsáveis pela transmissão das leishmanioses, pelo fato de seu aparelho bucal estar adaptado para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. Quase todas as espécies precisam de uma refeição de sangue (repasto sanguíneo) para o desenvolvimento de seus ovos. Já os machos são vistos ocasionalmente com sangue no estômago, mas, como suas peças bucais são muito mal desenvolvidas para provocar lesões na pele, presume-se que o sangue tenha sido retirado de uma ferida da pele, portanto, não desempenham qualquer papel na transmissão das leishmanioses (WHO, 2010).

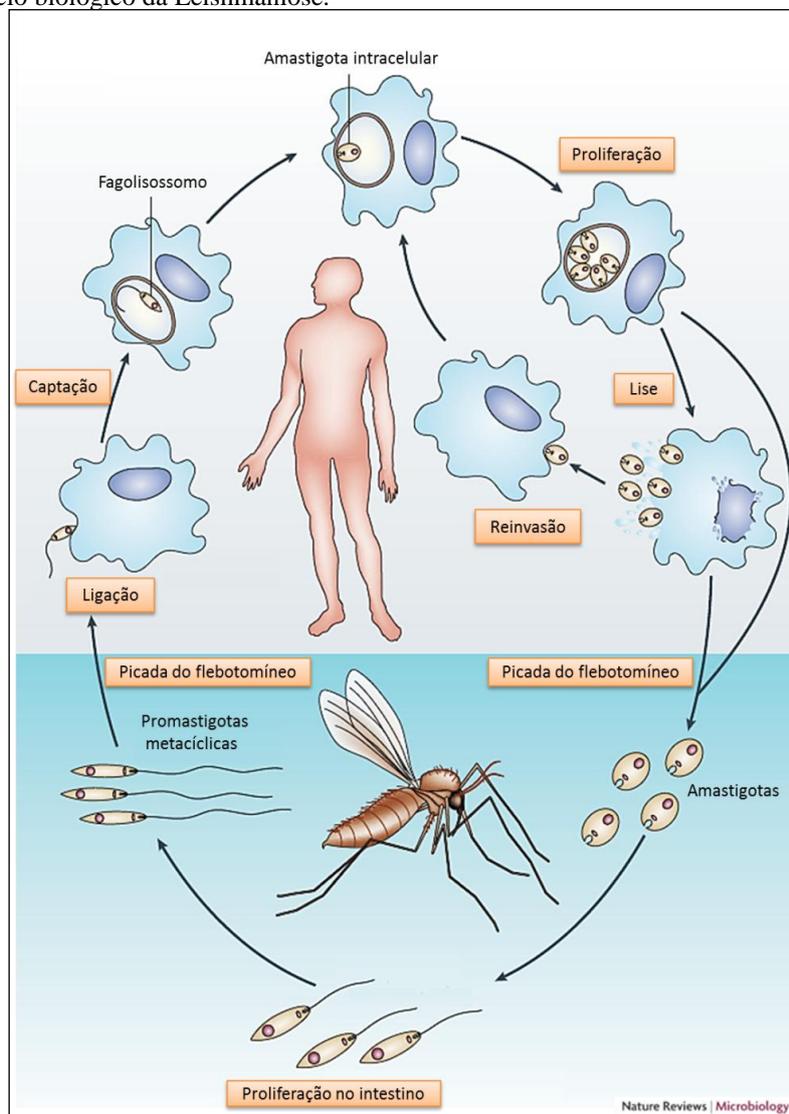
No Brasil, duas espécies atualmente estão relacionadas com a transmissão da LV: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira é a principal responsável pela transmissão e possui ampla distribuição em quatro regiões do Brasil: Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste; a segunda foi descrita no final de 1990, como vetor na cidade de Corumbá, Estado do Mato Grosso do Sul. *L.longipalpis* era inicialmente uma espécie silvestre e, agora, está adaptada em ambientes urbanos, no peridomicílio (OLIVEIRA *et al.*, 2008).Alimenta-se em grande variedade de hospedeiros vertebrados, como animais silvestres e domésticos, aves e homem.

Após o flebotomíneo picar um animal ou ser humano infectado, ingere formas amastigotas presentes no citoplasma de macrófagos presentes na derme do hospedeiro. A leishmania então se multiplica no intestino do flebotomíneo e torna-se infecciosa de 8 a 20 dias, após o repasto. Quando esse flebotomíneo infectado pica um segundo hospedeiro, as formas promastigotas são liberadas e depositadas no local da picada. Macrófagos fagocitam estas promastigotas,

que sobrevivem dentro do fagolisossomo, onde se transformam em amastigotas e irão se proliferar por divisão binária, até provocar a lise das células hospedeiras e invadir outros macrófagos. O ciclo termina quando outro flebotomíneo for se alimentar no hospedeiro infectado, levando a infecção para outro hospedeiro (Fig. 17) (MURRAY *et al.*, 2005; SINGH, 2005).

O cão doméstico é o principal reservatório animal, mas outros animais selvagens como a raposa, desempenham um papel importante na transmissão silvestre (ROMERO &BOELAERT, 2010).

Figura 17 - Ciclo biológico da Leishmaniose.



Fonte: CHAPPUIS, 2007.

1.4.2 Transmissão Transfusional

Transfusão sanguínea, transmitindo leishmaniose, tem sido reportada em muitos países (Tabela 2), podendo-se destacar a França, Suécia, Bélgica, Reino Unido, Brasil e a Índia (DEY & SINGH, 2006). A LV faz parte de um grupo de doenças, em que o potencial de transmissão transfusional e sua relevância ainda não se encontram bem definidos (PROIETTI *et al.*, 2007).

O primeiro relato de transmissão de leishmaniose, através de transfusão sanguínea, ocorreu em 1948, na China, quando uma mãe infectada, assintomática, doou 20 ml de sangue para suas duas filhas de quatro e seis anos, como uma profilaxia para a prevenção do sarampo. Após alguns dias, a mãe apresentou febre, palidez e distensão do abdômen e recebeu o diagnóstico de calazar um mês depois. As filhas desenvolveram a doença nove e dez meses após a transfusão (CHUNG *et al.*, 1948) (Tab. 3)

Em 1991 a Organização Mundial de Saúde (OMS) levantou a questão de que existe a possibilidade de transmissão de *Leishmania* através de doadores de sangue (WHO, 1991).

Para que ocorra a transmissão da *Leishmania*, através de transfusão sanguínea, é necessário que o doador com LV assintomática apresente parasitas no sangue periférico e que o parasita sobreviva ao processamento e armazenamento dos bancos de sangue.

No Brasil, a legislação brasileira de Hemoterapia, sob a resolução RDC nº153 de 2004 realiza em sua rotina nos bancos de sangue, sorologia para Doença de Chagas, Hepatites B e C, Sífilis, HTLV I e II, HIV I e II, não sendo realizada sorologia para LV e nem para outros patógenos preocupantes como citomegalovírus, Epstein-Barr, Parvovirus B19, e também algumas doenças emergentes como Gripe Aviária e a virose do Oeste do Nilo (URIAS *et al.*, 2009; PROIETTI *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* (GROGL *et al.*, 1993; PARAGUAI DE SOUZA *et al.*, 2001; DEY & SINGH, 2006) mostraram que *L. tropica* tem a capacidade de sobreviver em condições de armazenamento do banco de sangue, e manter sua infectividade e transmissibilidade por transfusão, testadas em animais experimentais saudáveis. Foi recuperado parasito viável do sangue total, após ser mantido, sob condições de banco de sangue a 4°C, por 15 dias; da fração de glóbulos vermelhos, mantidos por 25 dias, e da fração de glóbulos vermelhos, congelados com glicerol por 30 dias.

ANO	PAÍS	Nº	METODOLOGIA	PREVALÊNCIA	AUTORES
1991	Itália	374	HI	10 (2,7%)	Federico et al.; 1991
1997	França	463	WB	61 (13,2%)	Kubar et al.,1997
			Cultura	9 (1,9%)	
1997	Brasil	1500	ELISA (FML)	135 (9,0%)	Luz et al., 1997
1999	França	576	WB	76 (13,4%)	Le Fichoux et al.,
			Cultura	9 (1,5%)	1999.
			PCR	9/73 (12%)	
2000	Brasil	1194	ELISA (FML)	21(1,75%)	Otero et al., 2000.
			Dot Blot	9/21 (43%)	
			PCR	5/21 (24%)	
2003	Espanha	656	ELISA	16 (2,4%)	Riera et al., 2004
			WB	50 (7,6%)	
			Cultura	27/122(22,1%)	
			Nested PCR	3/122 (4,5%)	
2003	Grécia	2000	WB	304 (15%)	Kyriakou et al., 2003.
			PCR	34 (1,7%)	
			CF	33 (1,65%)	
2005	Itália	500	ELISA	0 (0%)	Colomba et al.; 2005
			IFAT	0 (0%)	
2008	Espanha	1437	WB	44 (3,1%)	Riera et al., 2008.
			Cultura	2/304 (0,6%)	
			Nested PCR	304 - 18 (5,9%)	
2008	Itália	1449	IFAT	11 (0,75%)	Scarлата et al., 2008.
			PCR	4/11 (36,4%)	
2009	Brasil	421	IFI	23 (5,5%)	Urias et al., 2009.
			K39	0/23 (0%)	
2011	Itália	162	IFAT	20 (12,34)	Tordini et al., 2011.
			PCR	11 (6,8%)	
			Nested PCR	0/55 (0%)	
2011	Brasil	700	ELISA (FML)	38 (5,4%)	Fukutani, 2011.
			PCR	28/38 (73%)	
			PCR tempo real	3 (0,4%)	
2012	Turquia	188	IFAT	12 (6,4%)	Ates et al., 2012.
			ELISA	1 (0,5%)	
			K39	0 (0%)	
			WB	03/12 (25%)	

Fonte:O autor.CF – Citometria de fluxo; ELISA – Ensaio imunoenzimático; HI –Hemaglutinação indireta; IFAT – Teste de imunofluorescência indireta; K39 – Teste imunocromatografico K39; PCR – Reação em cadeia da polymerase;WB - Western Blot.

Tabela 3-Casos relatados de transmissão de *Leishmania* por transfusão de sangue.

Detalhes clínicos, laboratoriais e demográficos dos casos com transfusão transmitida leishmaniose							
Pais	Ano/Autor	Idade e sexo do paciente	Idade e sexo do doador	Período Incubação	Manifestações Clínicas	Método Diagnóstico	Espécie
China	Chung <i>et al.</i> , 1948	4 F	Mãe	9 meses	Febre Hepatoesplenomegalia	Parasitológico	<i>L. donovani</i>
China	Chung <i>et al.</i> , 1948	6 F	Mãe	10 meses	Febre Hepatoesplenomegalia	Parasitológico	<i>L. donovani</i>
França	André <i>et al.</i> , 1957	Infantil	44 M	2 meses	Febre Anemia Severa	Autopsia	<i>L. infantum</i>
França	André <i>et al.</i> , 1957	Infantil	44 M	10 meses	Febre Hepatoesplenomegalia	Contagem ESR	<i>L. infantum</i>
Suécia	Kostmann <i>et al.</i> , 1963	Infantil	Desconhecida	6 meses	Febre Hepatoesplenomegalia	Autopsia	<i>L. donovani</i>
Suécia	Kostmann <i>et al.</i> , 1963	Infantil	Desconhecida	6 meses	Febre Hepatoesplenomegalia	Parasitológico	<i>L. donovani</i>
Bélgica	Cohen <i>et al.</i> , 1991	11 meses	Desconhecida	9 meses	Febre Palidez Hepatoesplenomegalia Leucócitos baixos	Western Blot	<i>L. donovani</i>
Inglaterra	Cummins <i>et al.</i> , 1995	Infantil	Desconhecida	Desconhecido	Febre Hepatoesplenomegalia	Desconhecido	<i>L. donovani</i>
Índia	Singh <i>et al.</i> , 1996	6 M	Desconhecida	6 meses	Febre Hepatoesplenomegalia	ELISA-anti rK39	<i>L. donovani</i>
Índia	Singh <i>et al.</i> , 1996	30F	Desconhecida	6 meses	Febre Anorexia	ELISA-anti rK39	<i>L. donovani</i>
Brasil	Luz <i>et al.</i> , 1997	32 pacientes de 88 em diálise	Desconhecida	2 meses	Perda de peso Febre Anemia Hepatoesplenomegalia	ELISA-FML	<i>L. donovani</i>

Fonte: Adaptado de DEY & SINGH, 2006.

É difícil determinar o risco absoluto da transmissão por transfusão, pois a maioria dos casos ocorre em áreas endêmicas, que é onde os doadores infectados residem na maioria das vezes, e a infecção visceral pode ser assintomática em indivíduos saudáveis. Nestas áreas, o caso de transmissão transfusional é difícil de ser diferenciado dos casos de transmissão pelo vetor (CARDO, 2006). No entanto, existe uma possibilidade razoável de que os produtos de sangue de pessoas infectadas, se parasitêmico no momento da doação de sangue, possam vir a transmitir leishmaniose ao destinatário (MARCO *et al.*, 2012).

A população de risco, para infecção clínica de LV, são crianças, pacientes imunossuprimidos ou multitransfundidos (ENGWERDA *et al.*, 2004).

1.4.3 Transmissão Congênita

O primeiro caso de transmissão congênita no mundo foi descrito por Low e Cooke, (1926) na África, em uma criança que nasceu com sinais e sintomas de LV (LOW, 1926, MEINECKE *et al.*, 1999). Em 1955, houve o relato do caso de uma criança, nascida na Inglaterra, com sintomas clínicos da doença, confirmados com exames laboratoriais, aos sete meses de idade. A mãe da criança contraiu a doença na Índia, no quinto mês de gestação (BANERJEE, 1955; MEINECKE *et al.*, 1999). Existe relatos de oito casos de transmissão congênita adquirida, todos eles com mães sintomáticas para a doença (ELAMIN *et al.*, 1992).

De acordo com os números de casos relatados na literatura, LV congênita é considerada uma doença rara (ELAMIN *et al.*, 1992). No entanto, o aumento da doença no Brasil, a urbanização crescente, e relatos de casos de mulheres grávidas com LV (VIANA *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2003), propiciam o aumento do risco de transmissão vertical, acrescido do impacto na morbidade e mortalidade materno-fetal (FIGUEIRO-FILHO, *et al.*, 2004).

A LV congênita é possível pela transmissão intra-uterina ou durante o trabalho de parto, através da troca de sangue da mãe para a criança. A maioria das crianças desenvolve a doença no primeiro ano de vida. (MEINECKE *et al.*, 1999; FIGUEIRO-FILHO *et al.*, 2004; BOEHME *et al.*, 2006). Em áreas endêmicas, os casos de LV congênita não podem ser distinguidos dos casos de infecção transmitida por vetor durante o primeiro ano de vida (MANTOVANI *et al.*, 2005).

Devido à incidência de LV em gestantes e do número de relatos publicados (Tabela 4), é importante ressaltar que, para prevenir complicações, tanto para as gestantes quanto para seus

recém-natos, a melhor forma de manejo da doença não pode ser negligenciada (PALASSON, 2009).

Tabela 4 - Alguns casos de transmissão vertical de LV, com mães sintomáticas ou assintomáticas, descritos na literatura.

ANO	PAÍS	MÃE		RECÉM-NASCIDO		AUTORES
		Sintomas	Tratamento	Tratamento	Evolução	
1926	Inglaterra	Sim	Não	Sim	Cura	Low & Coke, 1926.
1955	Índia	Sim	Não	Sim	Cura	Banerji, 1955.
1984	França	Sim	Não	Sim	Cura	Blank & Robert, 1984.
1987	Índia	Sim	Não	Sim	Cura	Mittal et al., 1987.
1988	Quênia	Sim	Não	Sim	Cura	Nyakundi et al., 1988.
1988	Índia	Sim	Não	Sim	Cura	Yadav et al., 1988.
1992	Sudão	Sim	Não	Sim	Óbito	El-toum et al., 1992.
1992	Sudão	Sim	Não	Sim	Óbito	Elamin & Omer, 1992.
1996	Índia	Não	Não	Sim	Cura	Sharma et al., 1996.
1999	Alemanha	Não	Não	Sim	Cura	Meinecke et al., 1999.
2006	Alemanha	Não	Não	Sim	Cura	Boehme et al., 2006.

Fonte: O autor.

1.4.4 Transmissão em Órgãos Transplantados

A leishmaniose é uma doença raramente relatada entre receptores de transplante. Mas, o número de casos publicados quadruplicou, desde o início da década de 1990. Possivelmente, devido ao aumento de transplantes realizados e à ocorrência da urbanização da LV. É mais comum em pacientes com transplante renal (77%), provavelmente devido à maior prevalência deste tipo de transplante, em relação ao demais. Entretanto, existem casos registrados em transplante de fígado, coração, medula, pulmão, pâncreas (TAVORA *et al.*, 2001; ANTINORI *et al.*, 2008). Em pacientes transplantados, a LV é a apresentação clínica mais frequente, seguida pela LM e, mais raramente, LC (ANTINORI *et al.*, 2008).

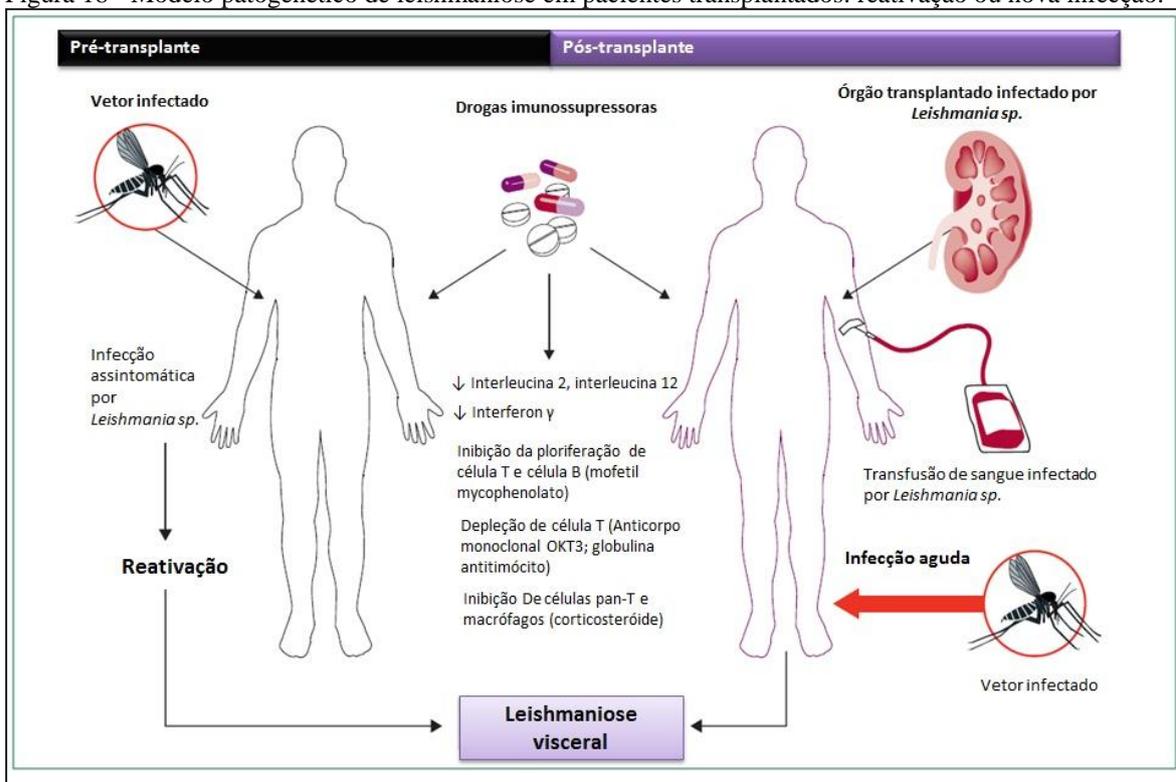
A Leishmaniose pode ocorrer como uma complicação tardia após o transplante, com uma média de 18 meses entre o transplante e o início da doença. Porém, o tempo pode ser variável, dependendo do órgão transplantado. No caso de transplante de fígado, o tempo médio foi de 6 meses, enquanto que em transplante renal, foi de 19 meses até o surgimento da doença (ANTINORI *et al.*, 2008).

Nos países com áreas endêmicas, o número de indivíduos assintomáticos com LV é maior do que os casos clinicamente aparentes (LE FICHOUX *et al.*, 1999), e indivíduos assintomáticos podem ter o risco de reativação e desenvolvimento de LV em estados imunossupressores (infecção por HIV, quimioterapia para tratamento do câncer, drogas

imunossupressoras para doença auto-imune ou após a transplante de órgãos). O crescimento do número de transplantes de órgãos e o tratamento com drogas imunossupressoras tem levado ao reconhecimento de vários casos de LV em transplante de órgãos (BASSET *et al.*, 2005). As drogas imunossupressoras utilizadas nos pacientes transplantados dificultam a ativação e proliferação das células T, alterando, assim, os mecanismos de defesa contra microrganismos intracelulares (PATEL *et al.*, 1997; MOLINA *et al.*, 2002).

Em indivíduos transplantados, alguns fatores podem ser responsáveis pelo desenvolvimento clínico da LV (Fig.18). O receptor do órgão transplantado pode ter uma infecção assintomática pré-transplante; e após o transplante teria a ativação de leishmaniose assintomática, desencadeando a infecção induzida pelas drogas imunossupressoras. Outro fator seria a aquisição iatrogênica de infecção por *Leishmania* diretamente pelo órgão transplantado, ou pela transfusão de produtos sanguíneos infectados e ainda pela picada do flebotomíneo pós-transplante (ANTINORI *et al.*, 2008; MA DD *et al.*, 1979; VARELA *et al.*, 2008).

Figura 18 - Modelo patogênico de leishmaniose em pacientes transplantados: reativação ou nova infecção.



Fonte: Adaptado de ANTINORI *et al.*, 2008.

A realização de sorologia anti-leishmania em ambos (doador e do receptor), antes do transplante, seria muito útil na prevenção da transmissão por transplante, assim como a identificação da origem da infecção pós-transplante. Se no pré-transplante, a sorologia de

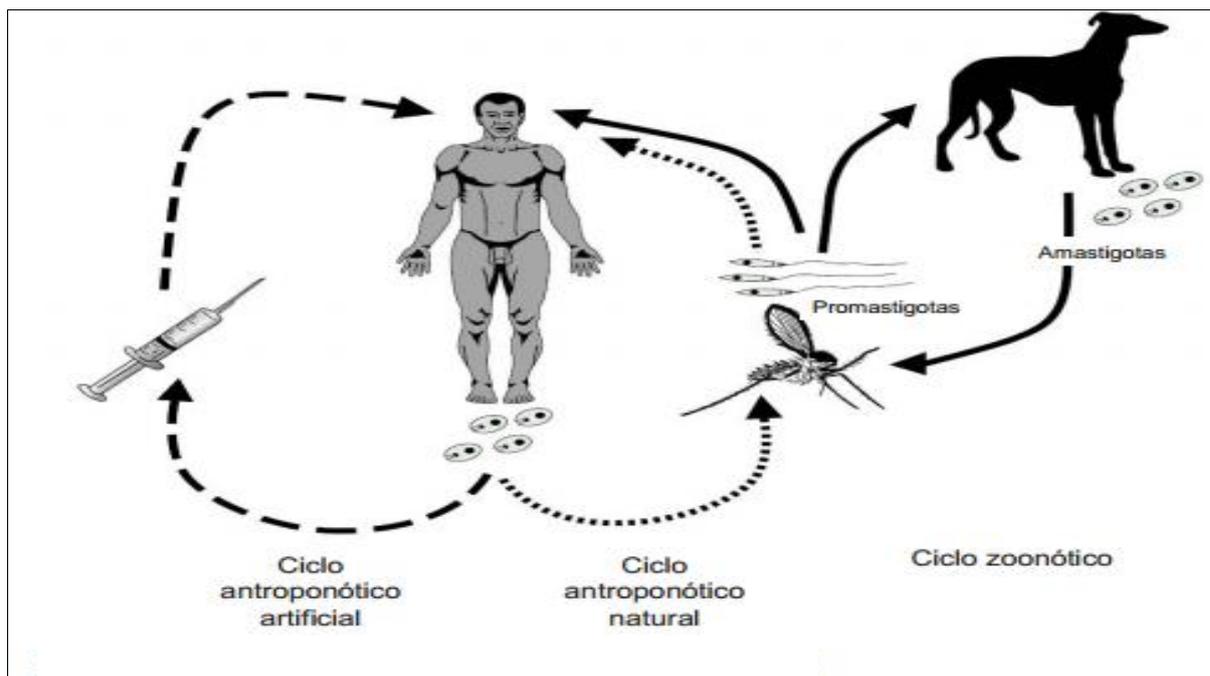
ambos fosse negativa, é mais provável da infecção por LV ter sido adquirida por vetor, após o transplante (HERNANDEZ-PEREZ *et al.*, 1999). O diagnóstico, após o transplante de órgãos, não é fácil, devido à inconsistência de sintomas e sinais clínicos. Febre e a leucopenia são frequentes. O diagnóstico é baseado na detecção direta do parasito, em esfregaços de medula óssea. PCR também tem mostrado alta sensibilidade, desde a sua introdução no diagnóstico de LV, detectando 10 de 11 casos (LACHAUD *et al.*, 2000).

1.4.5 Transmissão por Compartilhamento de Seringas

A LV é uma doença endêmica em muitos países e tem se manifestado, como uma complicação, na infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV). Tem sido estimado que em pacientes com LV, de 2 a 9% apresentam coinfeção com HIV (ALVAR *et al.*, 2008). Muitos pacientes, com co-infecção LV/HIV, são usuários de drogas endovenosas (50-92%, dependendo do país) (ALVAR *et al.*, 1997).

Usuários de drogas endovenosas compartilham 0,3 ml de sangue, através de seringas. Uma quantidade que assegura a transmissão do parasita e explica a elevada prevalência de LV entre os indivíduos HIV-positivos. Pesquisa realizada em 1998, na Espanha, no sul de Madrid, com seringas descartadas de usuários de drogas, mostrou através de PCR, que de 125 seringas analisadas, 65(52%) apresentavam *Leishmania spp*; e entre 2000 – 2001, no sudoeste de Madrid, de 154 seringas, foram detectadas *Leishmania spp* em 52 (34%) das seringas descartadas (CRUZ *et al.*, 2002).

O compartilhamento de seringas, por usuários de drogas endovenosas, tem sido visto como um ciclo de transmissão alternativo para LV, representando um ciclo artificial, onde as seringas substituem os flebotomíneo, não ocorrendo a metaciclogênese, já com a transmissão direta das formas amastigotas. Trata-se de um ciclo antroponótico, pois os usuários de drogas endovenosas atuam como o reservatório dos parasitas (Fig. 19) (MARQUES *et al.*, 2007).



Fonte: Adaptado de MARQUES et al, 2007.

1.4.6 Transmissão por pessoa-pessoa

A transmissão de LV pessoa à pessoa é extremamente rara. Cultura realizada de urina e fluidos prostáticos em pacientes com LV revelaram promastigotas, e alguns trabalhos com modelos animais, mostram que esta forma de transmissão é teoricamente possível, através do contato com fluidos infectados (secreções nasais e orais, mucosas, e urina) dos doentes com LV (ROSENTHAL *et al.*, 1991).

Existem relatos de transmissão sexual de um homem para sua esposa, e um provável caso de transmissão em um homem homossexual com AIDS, que teve lesão retal e admitiu intercurso anal receptivo frequente, enquanto estava de férias em áreas endêmicas para LV na Espanha (MAGILL, 1995; PAREDES *et al.*, 2003).

1.4.7. Transmissão por acidentes de laboratório

Acidentes de laboratório já foram relatados, como a picada de agulha em laboratório, manuseio de material contaminado com *Leishmania* e até exposições orais (HERWALDT & JURANEK, 1993; MAGILL, 1995).

1.5 Diagnósticos laboratoriais

O diagnóstico das leishmanioses é realizado através da detecção do agente causal ou da resposta imunológica ao parasito. Como a LV é uma doença fatal, os ensaios tem que apresentar alta sensibilidade e também alta especificidade, para que possa ser instalada a terapia especifica o mais precocemente possível (Tabela 5). Além disso, os testes devem ser simples e acessíveis (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

O diagnóstico laboratorial da LV é baseado em métodos parasitológicos, imunológicos, moleculares e também inoculação em animais de laboratório.

Tabela 5 - Métodos dediagnósticos para LV.

Ensaio	Tempo	Nível de habilidade necessária	Sensibilidade	Especificidade
Pesquisa direta	Horas	Especialista	Aspirado esplênico: 93,1-98,7%; Aspirado medula: 52-85%; Aspirado linfonodo:52-58%	100%
IFAT	Horas	Especialista	96%	98%
DAT (plasma)	Horas	Médio	94,8% (IC 95%; 92,7-96,4)	97,1% (IC 95%; 93,9- 98,7)
DAT (Urina)	Minutos	Médio	64-100%	100%
Imunocromatográfico	10 min.	Baixo	93,9% (IC 95%; 97,7-97,1)	95,3% (IC 95%; 88,8-98,1)
ELISA	Horas	Médio	100%	96%
PCR	4 a 5 hs	Alto	70 – 100%	85-99%

Fonte: Adaptado de SRIVASTAVA *et al.*, 2011.ELISA – Ensaio imunoenzimatico; IFAT - Teste de imunofluorescência indireta; PCR – Reaçãoem cadeia da polimerase;DAT - Teste de aglutinação direta.

1.5.1 Diagnósticos Parasitológicos - Métodos de Detecção Direta do Parasito

O diagnóstico é baseado na visualização de formas amastigotas, em monócitos ou macrófagos,de medulaóssea, baço, nódulos linfáticos, fígado, pele ou em creme leucocitário do sangue periférico.A formas amastigotas raramente eles são encontrados livres nos tecidos, exceto nos pacientes HIV positivos (CHULAY &BRYCESON, 1983;SINGH & SIVAKUMAR, 2003).

O diagnóstico parasitológico é considerado o padrão ouro para a detecção do parasito, por causa de sua alta especificidade (HERWALDT, 1999).Pode ser realizado através de esfregaços de lâminas, cultura e em inoculação em animais experimentais.

1.5.1.1 Esfregaço em Lâminas

Os esfregaços realizados são corados com Romnowsky, Hematoxilina-Eosina (H&E) ou com imunoperoxidase. Amastigotas são facilmente visualizadas nos esfregaços por um observador experiente que deve procurar o tamanho característico (2-4 mm de diâmetro), a forma (redondo para oval), com núcleo e o cinetoplasto (SINGH, 2006).

A especificidade é alta, mas a sensibilidade da microscopia é variável, sendo maior para baço (93-99%) do que para medula óssea (53-86%) ou aspirados de linfonodos (53-65%), já o aspirado do baço é bastante complicada oferecendo uma serie de riscos (ZIJLSTRA *et al.*, 1992; BABIKER *et al.*, 2007).

Os bons resultados são dependentes de conhecimentos técnicos e da qualidade das lâminas preparadas e de um microscopista competente e bem treinado que garanta a qualidade necessária para um diagnóstico preciso (SRIVIDYA *et al.*, 2012). Em amostras com baixo parasitismo é possível que não sejam visualizados as formas amastigotas, mesmo com uma observação demorada (SINGH & SIVAKUMAR, 2003).

1.5.1.2 Cultura em Meio NNN

A cultura possibilita a identificação da espécie por tipagem isoenzimática, a obtenção de promastigotas para inoculações em infecções experimentais e para a obtenção de antígenos e para a realização de estudos “*in vitro*” da eficiência de fármacos.

A cultura é o método mais específico de diagnóstico na leishmaniose, porque permite o isolamento da promastigota. Isto possibilita a caracterização ou o genótipo das espécies isoladas (SINGH, 2006); a obtenção de antígenos para a realização de ensaios *in vitro* e a realização de infecções experimentais para estudo de patogênese ou de análise de fármacos. A sensibilidade das culturas é baixa e dependente de alguns fatores, como a assepsia na coleta, a viabilidade do parasita, as condições do meio e a experiência do técnico (ANDERS, 2003).

É uma técnica demorada e raramente utilizada para diagnósticos clínicos, exceto em laboratórios de pesquisa e são necessários observadores treinados e especializados para a correta realização na identificação do parasita (SANTARÉM & SILVA, 2007; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Para o crescimento primário de formas promastigotas de *Leishmania* em cultura são conhecidas diferentes formulações. São utilizados normalmente um meio bifásico contendo uma base de ágar e sangue desfibrinado, como componentes essenciais do meio sólido, que pode ser o NNN (Neal-Novy-Nicolle), ou BAB (blood agar base). Como fase líquida, pode ser

utilizado o MEM (minimum essential medium), EBLB, HOMEM, Schneider, meio 199, RPMI 1640 ou BHI (brain heart infusion), sendo aconselhável a adição de soro fetal bovino inativado ou urina humana estéril como complemento nutricional (SCHUSTER & SUKKIVAN, 2002; SRIVASTAVA *et al.*; 2011). A transformação “*in vitro*” das formas promatigotas em meio NNN, geralmente inicia-se após três dias de incubação em B.O.D a 22-26°C (SINGH, 2006).

A técnica tradicional de cultura caracteriza-se por prolongada incubação, grande quantidade de meio de cultivo e maior volume de amostra para que possa ser realizada repetidamente. A técnica de microcultura, realizada em placas de 48 ou 96 poços, utiliza uma pequena quantidade de meio de cultivo e de amostra, possibilitando a realização de várias amostras (BOGGILD *et al.*, 2007).

1.5.1.3 Inoculação em Animal Experimental

A inoculação em animal experimental é considerada uma forma alternativa de isolar o parasita. É realizada em um animal susceptível, que pode ser um camundongo BALB /C ou em hamster(*Mesocricetus auratus*). Diferentes linhagens de camundongos são geneticamente susceptíveis ou resistentes à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Camundongos BALB/c são susceptíveis à *L. major* e *L. amazonensis*, mas são resistentes à *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. chagasi*. Portanto, o modelo murino mais apropriado para o estudo da LV é o do hamster, no qual a infecção por *L. donovani* causa hepatoesplenomegalia, hipoalbuminemia e pancitopenia, com doença progressiva (MURRAY *et al.*, 1987; MIRALLES *et al.*, 1994).

1.5.2 Diagnóstico Molecular - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A biologia molecular esta sendo cada vez mais utilizada para o diagnóstico e controle de doenças infecciosas. A abordagem molecular é capaz de detectar sequências de ácidos nucleicos específicos para o parasita, que pode resolver a limitação da sorologia, em discriminar infecção passada e atual. A microscopia e cultura apresentam baixa sensibilidade e a cultura também é demorada de 4 semanas até 6 meses em casos de assintomáticos, os métodos imunológicos não conseguem distinguir entre infecções passadas e presentes e não são muito sensíveis, em pacientes imunocomprometidos (SINGH, 2006). Dos métodos empregados, a técnica de PCR tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade.

A especificidade da PCR, em aspirado de medula óssea, pode chegar a 100% e a sensibilidade entre 80-93,3%, comparando com 50-60%, em relação ao exame direto ou cultura (MARTIM-SANCHEZ *et al.*, 2004; TAVARES *et al.*, 2003). A PCR hoje tem sido vista como diagnóstico alternativo quando o paciente apresenta como hipótese diagnóstica o calazar, principalmente quando a microscopia e a sorologia se apresentam negativas ou indeterminadas (ALAM *et al.*, 2009).

A sensibilidade do PCR pode variar de acordo com a escolha do alvo a serem empregadas, muitas sequências alvo já foram identificadas, como também uma variedade de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) (SILVA *et al.*, 2010). As principais sequências alvos utilizadas são: os genes do mini-exon (KATAKURA *et al.*, 1998), os genes que codificam subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA), ou 16S ribossomal rRNA (VAN EYS *et al.*, 1992), sequências repetitivas do RNA nuclear (PIARROUX *et al.*, 1993), o iniciador interno transcrito (ITS do rRNA) (SCHONIAN *et al.*, 2003), gene gp63 e o DNA do cinetoplasto (kDNA) (CORTES *et al.*, 2004).

Para o diagnóstico das leishmanioses, um dos principais alvos das técnicas moleculares desenvolvidas, até o momento, é o DNA do cinetoplasto (kDNA). Essa estrutura é constituída por uma rede de DNA, que se organiza concatenadamente em milhares de moléculas circulares. Os dois tipos de moléculas de DNA, presentes no cinetoplasto, são os maxicírculos e os minicírculos. São cerca de 50 maxicírculos com 20.000 a 30.000 pares de base (pb), que contém genes que codificam proteínas mitocondriais e o RNA ribossomal (rRNA), enquanto que os minicírculos são em número 10.000 a 20.000, com sequências de 500 a 2500 pb. (DEGRAVE *et al.*, 1994, CORTES, 2008). O kDNA representa 20-25% do DNA do parasito e os iniciadores (*primers*) 150 e 152 são direcionados para a amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania*, gerando fragmentos em torno de 120 pb (DEGRAVE *et al.*, 1994).

O valor da PCR não é absoluto, um PCR positivo pode ser devido a parasitas mortos que não tenham sido eliminados ou não virulentos, a um *primer* inespecífico ou contaminação. Portanto, a sua utilização deve ser sempre correlacionada com a clínica (MAURYA, 2005). Alguns estudos demonstram que, através da técnica do PCR, é possível detectar parasitas algumas semanas antes mesmo de aparecerem os sintomas clínicos (OTERO *et al.*, 2000; MARTIN-SANCHEZ *et al.*, 2004; MARY, 2004).

A técnica do PCR em tempo real (qPCR), também bastante utilizada, tem a vantagem de ser quantitativa e permitir a avaliação da carga parasitária nas análises de correlações dos estudos de patogênese e nos ensaios de avaliação terapêutica (MARY *et al.*, 2004). No entanto,

devido à alta sensibilidade da técnica do PCR, cuidados especiais devem ser tomados, para se evitar contaminação com possíveis DNAs exógenos. Não se pode deixar de ressaltar os resultados falso-positivos, e, portanto, a importância dos procedimentos de prevenção das possíveis contaminações (BORST *et al.*, 2004).

1.5.3 Diagnóstico Sorológico

As técnicas sorológicas se revelaram um instrumento importantíssimo no estudo de doenças infecciosas. São baseadas na identificação de anticorpos no soro dos pacientes (SRIVIDYA *et al.*, 2012). Existem diferentes testes para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*: teste de imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), teste imunocromatográfico rK39, entre outros (MAIA *et al.*, 2012). Mas, todos eles possuem duas grandes limitações. Primeiro, apesar dos níveis de anticorpo diminuírem após o tratamento, eles permanecem detectáveis até vários anos após a cura (KUMAR *et al.*, 2001; BRAZ *et al.*, 2002), conseqüentemente, a recidiva da doença não pode ser diagnosticada por sorologia (DE ALMEIDA SILVA *et al.*, 2006; HAILU, 1990); e segundo, apresentam reação cruzada com outras doenças, como a doença de Chagas, leishmaniose cutânea, malária e tuberculose, toxoplasmose (ABRAMO *et al.*, 1995; BURNS *et al.*, 1993).

Os testes diferem uns dos outros, em sua sensibilidade e especificidade, nas suas aplicações práticas, nas condições de campo e na disponibilidade dos reagentes (GONTIJO & MELO, 2004). Os testes imunológicos mais utilizados no Brasil para o diagnóstico de LV são o IFI e o ELISA, sendo o último, o teste de escolha para inquéritos populacionais (GONTIJO & MELO, 2004). No Brasil, a recomendação do Ministério da Saúde é que o diagnóstico sorológico da LV, seja executado por IFI ou por ELISA, utilizando antígenos de promastigotas.

1.5.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

O teste de IFI é um ensaio amplamente empregado no diagnóstico sorológico de diversas doenças desde 1950 e é um dos testes mais sensíveis avaliados, com base na detecção de anticorpos, que são demonstrados nos estágios iniciais da infecção e são indetectáveis de seis a nove meses após a cura, permitindo monitorar a evolução da doença e da terapêutica. É indicação de uma provável recidiva da doença se os anticorpos persistirem em baixos títulos

após este período. Como antígenos pode-se utilizar promastigotas ou amastigotas fixados a lâminas. Entre os testes é o mais sensível com valor de 96% e apresenta especificidade de 98%. Em indivíduos imunodeprimidos, foram reportados valores de sensibilidades bem mais reduzidos. Sua desvantagem é a exigência de laboratório sofisticado, não podendo ser realizado no campo (SINGH & SIVAKUMAR, 2003; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

O ensaio de IFI pode ser qualitativo ou quantitativo. A forma qualitativa define apenas se a mostra é reagente, não reagente ou indeterminada. Já a forma quantitativa irá confirmar os resultados das amostras reagentes ou das amostras indeterminadas, da modalidade qualitativa, e irá definir os valores de título das amostras que foram reagentes, segundo as diretrizes dos fabricantes dos kits de ensaio. O resultado da imunofluorescência indireta é expresso em diluições. São consideradas positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, com clínica sugestiva de LV, recomenda-se a solicitação de nova amostra em 30 dias (BRASIL, 2009).

1.5.3.2 ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

A técnica de ELISA é usada para diagnóstico de quase todas as doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose, e foi descrito por Engvall & Perlmann, em 1971. É baseado na reação antígeno-anticorpo, detectada por um anticorpo, contra a espécie avaliada, conjugado a uma enzima. A detecção do complexo Ag:Ac é revelada por um sal cromógeno, adicionado ao substrato da enzima, que quando reage adquire a cor do cromógeno (Fig. 20). A intensidade da reação é medida pela densidade ótica (OD) num espectrofotômetro, leitor de placa. O teste ELISA ainda tem sido o de maior escolha para o diagnóstico, entre todas as técnicas sorológicas para LV, é um método prático, rápido, de resultados confiáveis, e se mostra uma técnica bastante específica e sensível. Mas, seus valores dependem da qualidade dos antígenos empregados, que tem sido melhorados através da utilização da tecnologia do DNA recombinante, com a produção e purificação, em grandes quantidades, de moléculas diagnosticamente relevantes (SUNDAR & RAI, 2002; SANTAREM & SILVA, 2007; MOHAPATRA *et al.*, 2010).

O produto recombinante de K39 (rK39) provou ser um antígeno muito sensível e específico em ELISA para o diagnóstico sorológico de LV em focos endêmicos, já relatado no Brasil, China, Paquistão e Sudão (BURNS *et al.*, 1993; BADARÓ *et al.*, 1996). O rK39 é específico para espécies do complexo *L. donovani*, e, quando aplicado no ELISA, mostrou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade (BURNS *et al.*, 1993). Pode ser empregado em

pacientes com co-infecção para HIV, nos quais os níveis de rK39 declinam rapidamente com o tratamento (HOUGHTON *et al.*, 2000). Pode-se citar outros antígenos recombinantes já utilizados, e em fase de validação, como o rK28, rK26 (PATTABHI *et al.*, 2010).

O antígeno total solúvel de leishmania é o mais utilizado, com uma sensibilidade entre 80-100%, porém tem a desvantagem de ser pouco estável, apresentando uma reprodutibilidade pouco satisfatória e, em baixa titulação da amostra, apresenta reações cruzadas com tuberculose, toxoplasmose e tripanossomose (MAURICIO *et al.*, 1995; KUMAR *et al.*, 2001; SUNDAR & RAI, 2002).

Para a realização do teste ELISA, são necessários equipamentos sofisticados e pessoal qualificado, o que dificulta sua utilização em áreas endêmicas (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Figura 20 – Placa de microtitulação para ELISA, após reação.



Fonte: O autor. Poços com amostras sem coloração diferenciada (transparente) são considerados negativos, com coloração em tom amarelo ou alaranjado são consideradas positivas dependendo *cut-off* (estabelecido para cada ensaio).

1.5.3.3 Teste de Aglutinação Direta (DAT)

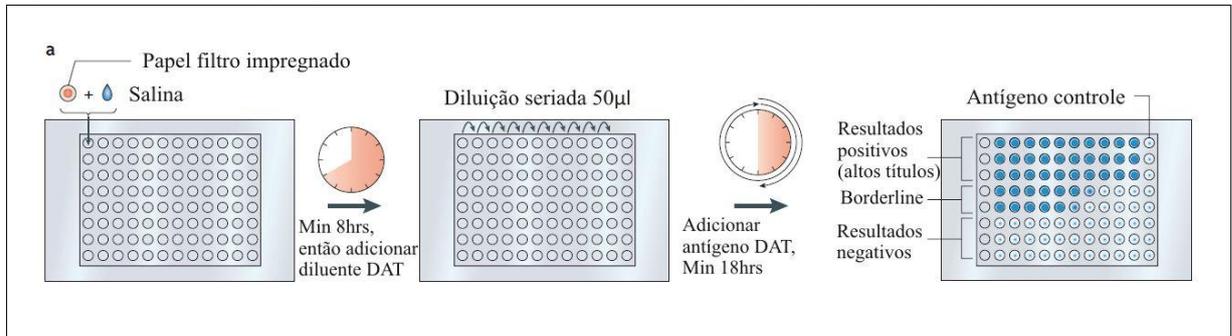
O teste aglutinação direta (DAT) é altamente sensível e específico (Fig. 21). Estudos demonstram valores de sensibilidade entre 90 e 100% e especificidade de 72 a 100% (SINGH & SIVAKUMAR, 2003; GONTIJO & MELO, 2004; PEDRAS *et al.*, 2008).

Para a realização do DAT, são utilizadas microplacas com diluições seriadas do soro ou sangue em estudo, onde serão adicionadas promastigotas coradas. Se houver anticorpos presentes, ocorrerá a aglutinação visível. A grande desvantagem do teste é o longo tempo de

incubação, de 18 horas, e a necessidade de diluições seriadas do material biológico. Mas, por outro lado, é um teste barato, que não requer instalações laboratoriais, e tornou-se o preferido em estudos de campo, em países de pouco recurso financeiro (SINGH & SIVAKUMAR, 2003; CHAPPUIS *et al.*, 2007, SANTAREM & SILVA, 2007; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Existe um teste de aglutinação rápido (FAST – *Fast Agglutination Screening Test*), para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* no soro ou em sangue total colhido em papel filtro, com duração de 3 horas. (HAILU *et al.*, 1990). O FAST vem sendo testado para a aplicabilidade em situações epidêmicas e para inquéritos populacionais (SCHOONE *et al.*, 2001). A sensibilidade e especificidade do FAST são idênticas às do DAT (SINGH & SIVAKUMAR, 2003).

Figura 21- Teste sorológico para Leishmaniose Visceral. Teste de aglutinação Direta (DAT)



Fonte: Adaptado de CHAPPUIS, 2007.

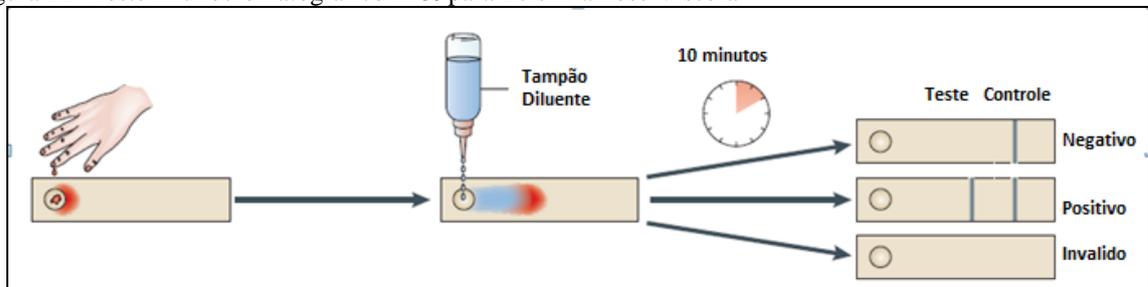
1.5.3.4 Teste Imunocromatográfico rK39

O teste imunocromatográfico rK39 tornou-se popular nos últimos anos (SRIVASTAVA *et al.*; 2011), ele é um teste de aplicação rápida (“dipstick”), de fácil interpretação, com leitura em 10 minutos. É um método diagnóstico de imunoenensaio qualitativo e se baseia na reação do sangue ou soro, do paciente, com o antígeno recombinante de *Leishmania* rK39, purificado fixado em papel de nitrocelulose (Fig.22) (SUNDAR *et al.*, 2002; GONTIJO & MELO, 2004).

O antígeno recombinante K39 (rK39) é específico para as espécies do complexo *L. donovani* (GONTIJO & MELO, 2004, BURNS *et al.*, 1993). É um antígeno que contém 39 aminoácidos codificados por um gene de 117 pb, codificados em uma região altamente conservada de quinase de *L. chagasi* (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Pode apresentar reação cruzada com malária, febre tifoide e tuberculose (URIAS *et al.*, 2009).

Em pacientes sintomáticos, a sensibilidade do teste imunocromatográfico rK39 é alta 90-100% (SUNDAR *et al.*, 2002; VEEKEN *et al.*, 2003), enquanto que a especificidade pode variar muito de acordo com a região (SUNDAR *et al.*, 2002). Em um estudo de meta-análise com 13 estudos, para a validação do teste rápido rK39 mostrou-se uma sensibilidade de 93,9% e especificidade de 95,3% com intervalos de confiança de 95% (CHAPPUIS *et al.*, 2006). Está sendo realizado, pela OMS, um estudo multicêntrico para a avaliação dos testes rápidos disponíveis no mercado, pois existem vários testes imunocromatográfico, em países endêmicos, que continuam não regulamentados e que não foram validados até o momento (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Figura 22- Teste imunocromatografico rK39para Leishmaniose Visceral



Fonte: Adaptado de CHAPPUIS,2007.

2JUSTIFICATIVA

A LV é considerada um problema de saúde pública mundial. Com a urbanização da LV, tem sido cada vez mais crescente o número de portadores assintomáticos, em grandes centros. Em diversos lugares do mundo, tem sido relatada a ocorrência de transmissão de *Leishmania*, por transfusão sanguínea. Desde 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem considerado viável a possibilidade de transmissão de *Leishmania*, por transfusão sanguínea.

Por não ser feita, rotineiramente, a triagem sorológica para *Leishmania*, em doadores de sangue do Brasil, a circulação da *Leishmania* é desconhecida nos Hemocentros. Alguns trabalhos mostram que a prevalência, de portadores de *L. infantum* assintomáticos, é variável de região para região. Em centros urbanos, com transmissão de *L. infantum*, a prevalência de portadores assintomáticos chega a 52%, e a sua parasitemia tem sido estimada variando de 0,001 parasites/ml a 1 parasite/ml. Tem sido relatada, também, a detecção de portadores assintomáticos em doadores de sangue. Numa transfusão, o volume utilizado é geralmente 400 ml de sangue, o que implicaria numa inoculação provável de 0,004 a 400 amastigotas/transfusão.

Fortaleza tem apresentado LV autóctone desde 1953 (ALENCAR, 1953), e, a partir de 2005, vem apresentando surtos epidêmicos, já sendo considerada uma área endêmica (GONÇALVES, 2010). Como, nas áreas de transmissão, os portadores assintomáticos representam um grande contingente, é importante avaliar a possibilidade dos hemoderivados serem um risco em potencial, para a transmissão de *Leishmania*, através de transfusões sanguíneas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência de portadores de *Leishmania* assintomáticos em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce).

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a prevalência de doadores de sangue com sorologia positiva para *Leishmania*;
2. Avaliar a detecção do DNA de *Leishmania* circulante, em creme leucocitário de doadores de sangue;
3. Fazer o sequenciamento do DNA isolado;
4. Estabelecer a prevalência do isolamento de *Leishmania* em creme leucocitário de doadores de sangue.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal e descritivo.

4.1.1 População do Estudo

Participaram deste estudo, 438 doadores de sangue, do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce), no período de maio de 2011 à novembro de 2011.

4.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão do Estudo

Foram incluídos no estudo, os doadores que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), fornecido pelo Hemoce no momento do cadastramento de dados para a realização da doação de sangue.

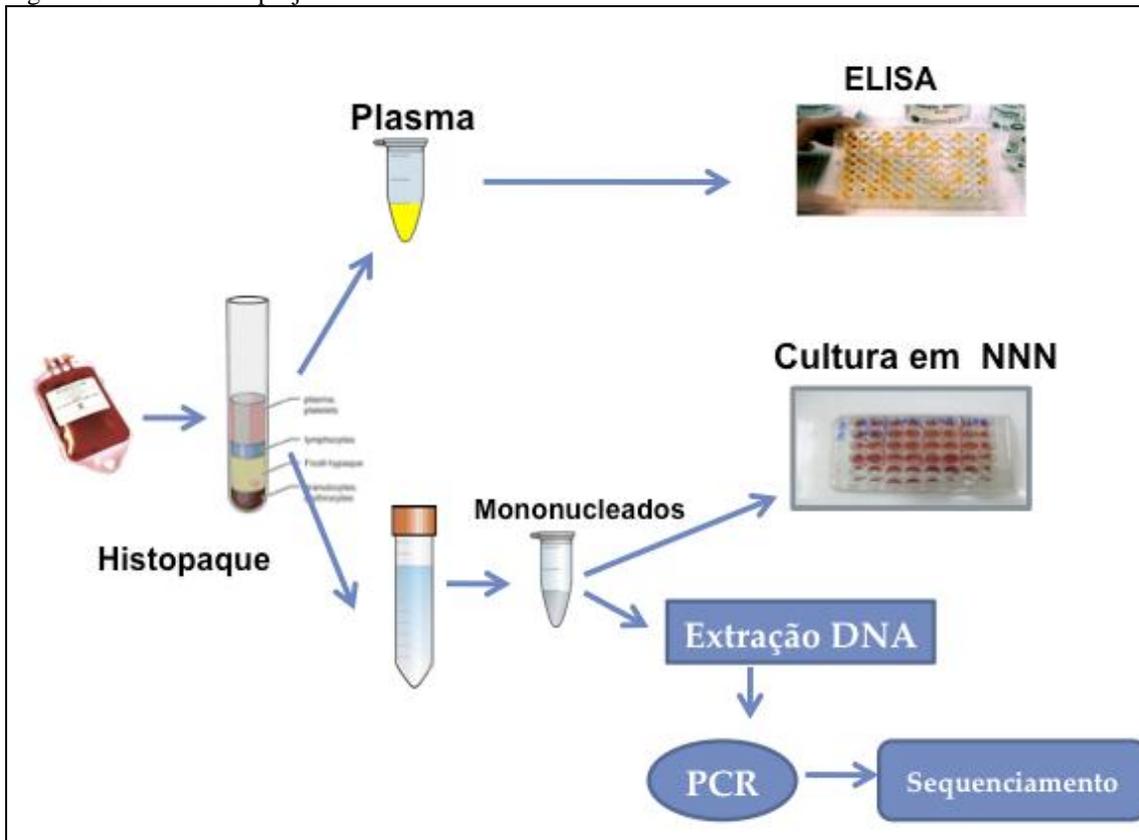
Foram excluídos do estudo aqueles doadores que possuíam sorologia positiva na triagem realizada pelo Hemoce ou ainda por ter material insuficiente para o estudo.

Os dados como sexo, data de nascimento, origem (cidade e bairro), e resultados da sorologia foram obtidos no banco de dados do Departamento de Sorologia do Hemoce, através do código de identificação, existentes nas bolsas.

4.2 Amostras

Amostras de creme leucocitário, de 438 doadores de sangue, foram utilizadas para a realização de cultura, sorologia e técnicas moleculares para a detecção de *Leishmania* (Fig. 23). Durante um ano, recebemos do Setor de Processamento do Hemoce, 9ml de creme leucocitário, retirados das bolsas encaminhadas para fracionamento de hemoderivados.

Figura 23 -Desenho do projeto



Fonte: O autor.

4.2.1 Processamentos das Amostras de Creme Leucocitário - Separação das Células Mononucleadas do Sangue Periférico(CMSP)

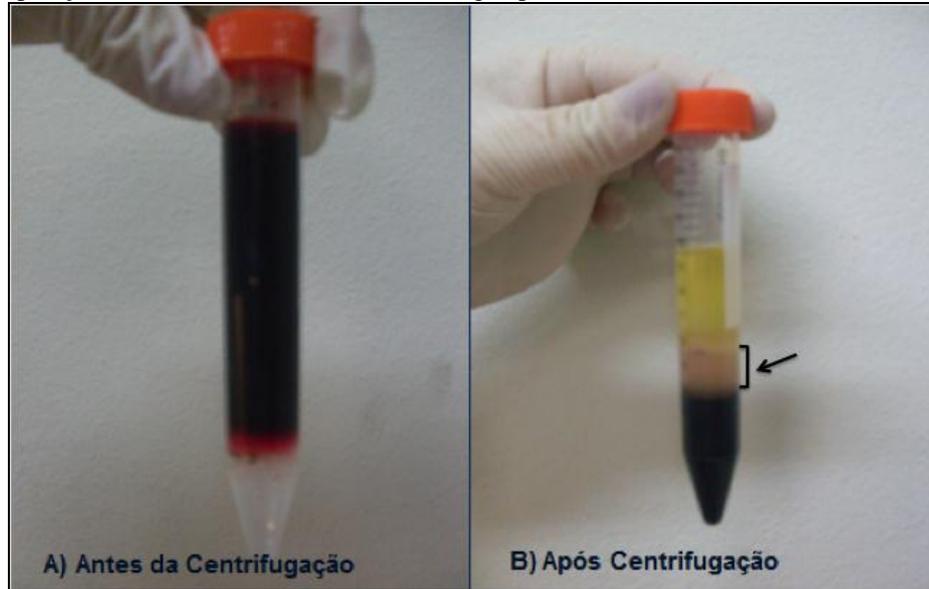
No Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC, as amostras foram processadas imediatamente após a sua chegada.

As amostras de creme leucocitário foram adicionadas lentamente em tubos tipo Falcon (15 ml), contendo Histopaque 1077 (Sigma) na proporção 1:3 (Fig. 24 A). Os tubos foram centrifugados por 30 minutos, a 1400 rpm, à temperatura de 21°C, para o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (Fig. 24 B). O plasma, resultante desta centrifugação, foi separado e armazenado em tubos tipo eppendorf (3ml) e congelado a -20°C, até o momento de uso.

As CMSP foram transferidas para um novo tubo tipo Falcon (15 ml) lavadas duas vezes com PBS, a 1300 rpm, por 10 minutos a 4°C. Após a última lavagem, o sobrenadante era descartado, e o sedimento foi dividido em duas aliquotas, onde 500 µl foram direcionados para a

cultura em meio NNN, realizada imediatamente, e o restante congelado a -20°C , para a extração do DNA.

Figura 24 - Separação das células mononucleadas do sangue periférico.

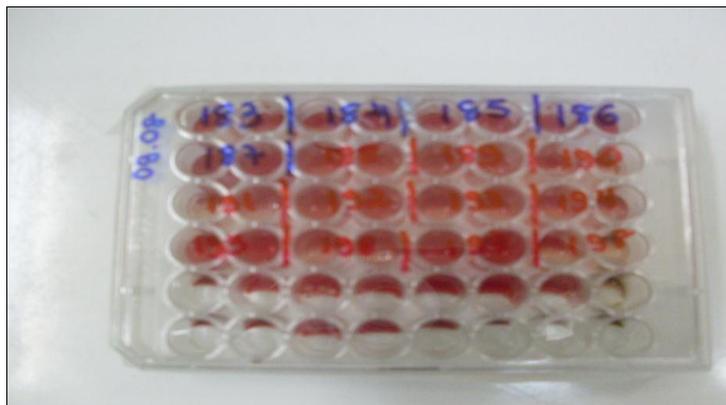


Fonte: O autor. Imagem A: mostrando o Histopaque no fundo do tubo Falcon e o creme leucocitário acima, antes da centrifugação. Imagem B: Após a centrifugação, a separação com o plasma na parte superior, e a camada de CMSP, entre o plasma e as hemácias (Seta).

4.3 Microcultura em Neal-Novy-Nicolle (NNN)

Quinhentos microlitros das CMSP, de cada amostra, foram adicionados em duplicata, em placas de 48 poços (TPP) numeradas (Fig.25), contendo meio Neal-Novy-Nicolle (NNN) suplementado com Schneider (Himédia) com 20% de soro bovino fetal inativado (Gibco), 1% de urina humana masculina estéril e 25 mg/ml de Gentamicina (Gibco). As culturas foram mantidas a 26°C , com avaliações semanais, em microscópio invertido, durante quatro semanas antes de serem consideradas negativas. As leituras foram realizadas por dois observadores experientes, que anotavam os resultados para conferência posterior.

Figura 25 - Cultura para *Leishmania* em duplicata em placa de 48 poços.



Fonte:O autor.

4.4 Extração do DNA de *Leishmania*

O método utilizado para a extração do DNA, do creme leucocitário dos 431 doadores de sangue, foi através do kit *Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit*TM (GE Healthcare).

A técnica de extração do DNA utiliza uma coluna com sílica gel com alta afinidade para DNA. Para tanto, 200ul de CMSP foram lizadas, à temperatura ambiente, utilizando proteinase K e tampão de lise. Após a lise, o produto foi transferido para a coluna de sílica gel e submetido à centrifugação de 11.000 x g, por 1 minuto. Após a centrifugação, as amostras foram submetidas a duas lavagens, sendo a primeira centrifugada por 1 minuto a 11.000 x g, e a segunda, por 3 minutos a 11.000 x g. Terminado o processo de lavagem, o DNA foi eluído da coluna, para um tubo livre de DNase, com 200ul de tampão aquecido a 70°C, através de uma centrifugação de 1 minuto a 11.000 x g. Uma alíquota de 4ul, do DNA purificado, foi utilizada para a quantificação das amostras e análise da preservação do DNA. O restante do material foi estocado a -70°C, até o momento de uso.

4.4.1 Extração do DNA da Cepa de *Leishmania amazonensis*

Como controle positivo, para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi extraído o DNA de culturas de *Leishmania amazonensis*, cepa BA-125, caracterizada por PCR e isoenzimas (INDIANI *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 1994).

A suspensão de promastigotas, após lavagens, foi diluída para as seguintes concentrações: 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 /ml e em seguida extraído o DNA utilizando o kit *Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit*TM (GE Healthcare) seguindo os mesmos procedimentos relatados acima.

4.4.2 Quantificação das Amostras do DNA Extraído

A quantificação do DNA, extraído de todas as amostras, realizou-se no Laboratório de Micobactérias da FAMED-UFC. Para isso, utilizou-se o equipamento NanoDrop modelo ND1000. Foram realizadas as leituras de densidade óptica a 260nm (DO₂₆₀), para avaliar a quantidade de DNA e a 280nm (DO₂₈₀) para estimar a contaminação com proteínas. O quociente entre DO₂₆₀ e DO₂₈₀ deve situar-se entre 1,5 a 2,0 para considerar que a amostra de DNA apresenta pureza adequada para análises posteriores. Um valor <1,5 indica contaminação por proteínas, e >2,0 indica contaminação com RNA.

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizadas reações de PCR convencional, utilizando iniciadores da região do cinetoplasto kDNA para *Leishmania*. Como controle interno, utilizou-se o *primer* para o gene da β -globina humana.

4.5.1 PCR da β -globina Humana

Todas as amostras foram analisadas, através de PCR, para amplificação de um segmento de 252 pares de base (pb) do gene da β -globina humana, utilizando-se um par de iniciadores (Ludwig Biotec) (Tabela 6), descritos por PIZZUTO *et al*, 2001. A amplificação do gene constitutivo da β -globina foi para verificar a integridade e a suficiência do DNA extraído.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos utilizados para detecção do gene da β -globina humana.

Oligonucleotídeo	Sequência	Pares de base
hb3if	5'-CGGCTGTCATCACTTAGACCTC -3'	252 pb
hb4ir	5'-CTTCATCCACGTTACCTTGC-3'	252 pb

A reação de PCR foi realizada em um termociclador Mastercycler® Personal Eppendorf, utilizando 5ul de DNA extraído, 1,25ul de cada primer, na concentração de 12,5pmol (Ludwig Biotec), 2,0ul de dNTPMIX 10 mM (BIOBASIC), 2,5ul Tampão (Ludwig Biotec), 0,5ul de Mg²⁺ 1,5mM (Ludwig Biotec) e 0,35ul Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec) 2,5U e água DEPC para uma solução final de 25ul.

As condições da reação foram às seguintes: uma etapa inicial de desnaturação das fitas a 94°C, durante 3 minutos; seguido de 30 ciclos com 94°C por 30 segundos, para a desnaturação; 55°C por 30 segundos, para o anelamento dos *primers*; 72°C por 45 segundos, para a extensão; e um último passo de 72°C, durante 7 minutos, para a extensão final.

Em seguida, 10ul dos produtos de cada reação de PCR foram misturados a 5ul de tampão de corrida, misturados com 2,5ul de corante Gel RedTM(Uniscience), aplicados em gel de agarose Sigma (St. Louis, EUA) a 2% e submetidos à eletroforese horizontal a 70mA. O marcador utilizado foi de 100 pb (Ludwig). Em seguida o gel de agarose foi visualizado à luz ultravioleta e analisado através do equipamento FluorChem FC2[®] (Alpha Innotech, San Leandro, EUA).

4.5.2 PCR Convencional para *Leishmania*

Para a realização da reação de PCR convencional para o gênero *Leishmaniae* para a cultura utilizada como controle, foram utilizados os iniciadores específicos para a região do kDNA(DEGRAVE *et al.*, 1994) (Tabela 7), como utilizado por INDIANIDE OLIVEIRA *et al.*, 2003, e que amplificam fragmentos de 120 pb (Ludwig Biotec).A reação de PCR foi realizada utilizando uma concentração de 50-100ng de DNA total.

O DNA de cada amostra (5ul) foi adicionado em um tubo para PCR com 1,25ul de cada primer, na concentração de 12,5pmol (Ludwig Biotec), 2,0ul de dNTPMIX 10 mM (BIOBASIC), 2,5ul Tampão (Ludwig Biotec), 0,5ul de Mg²⁺ 1,5mM (Ludwig Biotec), 7,65ul de água DEPC e por último 0,35ul Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec), para uma solução final de 25ul.

Por fim, os tubos com as reações foram conduzidos ao termociclador Mastercycler[®] personal eppendorf e submetidos às seguintes temperaturas: 94°C durante, 3 minutos; seguido de 30 ciclos, com 94°C por 30 segundos, para a desnaturação; 55°C por 30 segundos, para o anelamento dos *primers*; 72°C por 45 segundos, para a extensão; e um ultimo passo de 72°C durante 7 minutos, para a extensão final.

Tabela 7 - Oligonucleotídeos utilizados para detecção do gene da *Leishmania*.

Oligonucleotídeo	Sequência	Pares de base
150	5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA -3'	120 pb
152	5'-(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT (A/T)TTACACCAACCCC -3'	120 pb

O resultado das ampliações foi detectado por eletroforese, em gel de agarose a 2%, corado com Gel RedTM(Uniscience), visualizados à luz ultravioleta e analisado através do equipamento FluorChem FC2[®] (Alpha Innotech, San Leandro, EUA).

4.5.3 Sequenciamento

Das amostras de PCR que amplificaram, ou seja, que foram positivas, foram selecionadas aleatoriamente, para o sequenciamento do DNA. Foram purificadas, utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega, seguindo todas as etapas do fabricante. Ao final do processo de purificação, as amostras foram quantificadas. Cada amostra foi colocada em um tubo de microcentrifuga de 0,5µl, contendo 60 ng de DNA-molde (produto de PCR purificado), mais 4,5 pmol de um único primer e para completar o volume final de 6µl foi adicionado água ultrapura. As amostras foram então desidratadas, com o tubo aberto em estufa a 60°C. Após este procedimento, foram enviadas para o sequenciamento na ACTGENE - Análises Moleculares/Ludwigbiotec.

4.6 Sorologia ELISA

A técnica sorológica ELISA foi realizada utilizando antígenos de promastigotas de *L. infantum*, produzidos no Laboratório de Parasitologia do DPML, FAMED-UFC.

4.6.1 Preparação do Antígeno de Promastigotas para a Realização da Técnica ELISA

Para a preparação do antígeno, promastigotas da cepa IOC/L2906 (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) de *L. chagasi*, gentilmente cedidas pela Dra. Maria Jânia Teixeira (UFC), foram cultivadas em meio de cultura Schneider's (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich), 1% de urina estéril humana masculina e Gentamicina 25ug/ml (Sigma-Aldrich).

Após a expansão da cultura, o meio contendo as promastigotas foram adicionados em tubo Falcon de 50 ml. O sedimento foi lavado, por 3 vezes com salina tamponada com fosfatos, centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Após a 3ª lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 1ml de PBS, e foi feita a contagem das promastigotas, em câmara de Neubauer. Após a contagem, o volume foi ajustado para a concentração de 2×10^8 /ml em PBS. Em seguida, adicionou-se EDTA 0,5M estéril, PMSF (concentração final de 1 mM). Esta suspensão do antígeno foi aliqotado em tubo eppendorfe armazenado em freezer – 70°C, até o momento de uso.

4.6.2 ELISA

O método ELISA, para a quantificação de anticorpos específicos para *Leishmania*, foi realizado utilizando o protocolo de EVANS *et al.*, (1989) com algumas modificações.

Para a realização do ELISA, utilizou-se placas de 96 poços (NUNC-IMMUNO™) e os reagentes da WAMA^R. As placas foram sensibilizadas, com 2×10^7 /ml promastigotas diluídas em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,5, e incubadas por um pernoite a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem, utilizando 200ul por poço, sendo então adicionada a solução diluente das amostras e o plasma, na proporção 1:100; e incubadas a 37°C, por 30 minutos. Novamente, as placas foram lavadas por 4 vezes, e, então, adicionado 100ul do conjugado e incubadas a 37°C, por 30 minutos. Terminado este período, as placas foram lavadas 3 vezes; foi adicionado 50ul do substrato cromógeno e as placas foram mantida a temperatura ambiente, protegida da luz por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 ul de solução de parada, e realizada a leitura, em leitor de ELISA no comprimento de onda 450 nm, utilizando o software SOFTmax PRO 3.0.

O ensaio foi realizado em duplicata, e os controles negativos utilizados foram gentilmente cedidos pela Dra. Aldina Barral (FIOCRUZ/Bahia), por considerarmos Fortaleza uma área endêmica para LV. Os controles, positivos para LV, foram provenientes de pacientes do Hospital Pediátrico Albert Sabin de Fortaleza, de pacientes com aspirado da medula óssea positivo e teste imunocromatográfico rK39 positivo.

O ponto de corte (*cut-off*) foi determinado para cada placa, através da fórmula: Ponto de corte = Média da densidade óptica (OD) dos controles negativos (CN) + 3 X o desvio padrão (DP) (CN).

Valor do ponto de corte = OD (CN) + 3X DP (CN).

4.7 Considerações Éticas

Este estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE), e aprovado em 14 de Maio de 2010, com o protocolo nº 94/10, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos estabelecidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada empregando o programa Excel 2007 para a construção de um banco de dados com os dados parasitológicos, sorológicos e testes de biologia molecular realizados dos doadores.

A construção de um banco de dados foi efetuada no programa Excel 2007. A significância dos resultados foi calculada pelo teste exato de Fisher. Todas as análises foram realizadas usando o software Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA) e em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

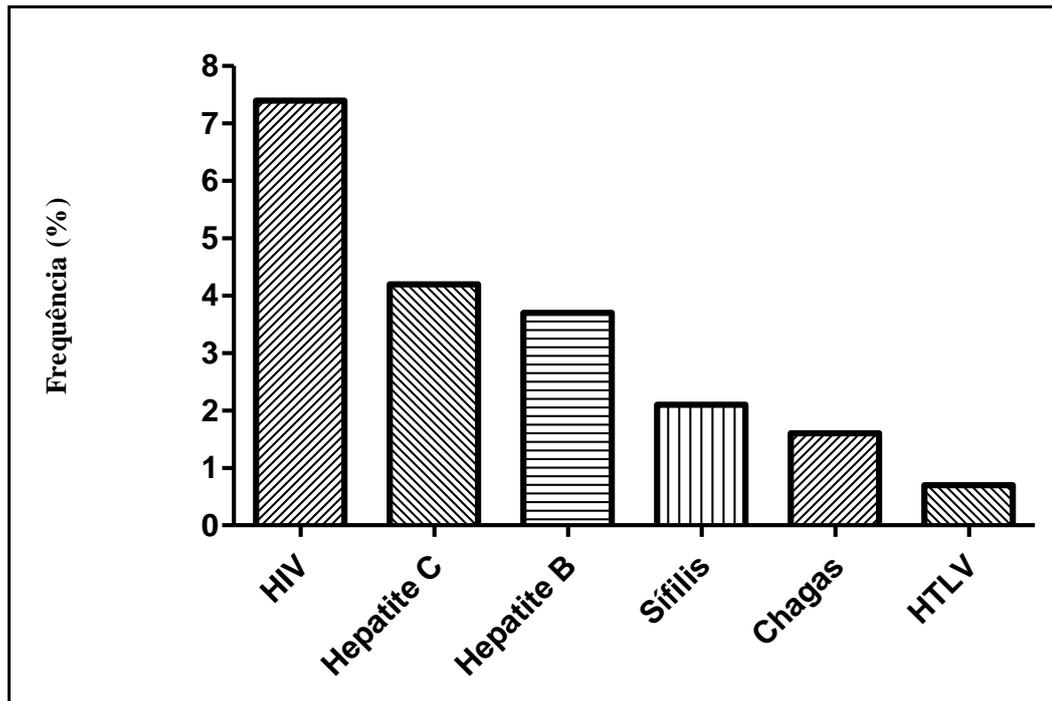
5.1 População Estudada

Das 438 amostras de creme leucocitário recebidas do banco de sangue, 07 tiveram perda de material, portanto o “n” amostral foi de 431 doadores. Todos com o termo de consentimento livre e esclarecido assinado no ato da doação de sangue no Hemoce.

5.1.1 Triagem Sorológica dos Doadores de Sangue do Hemoce

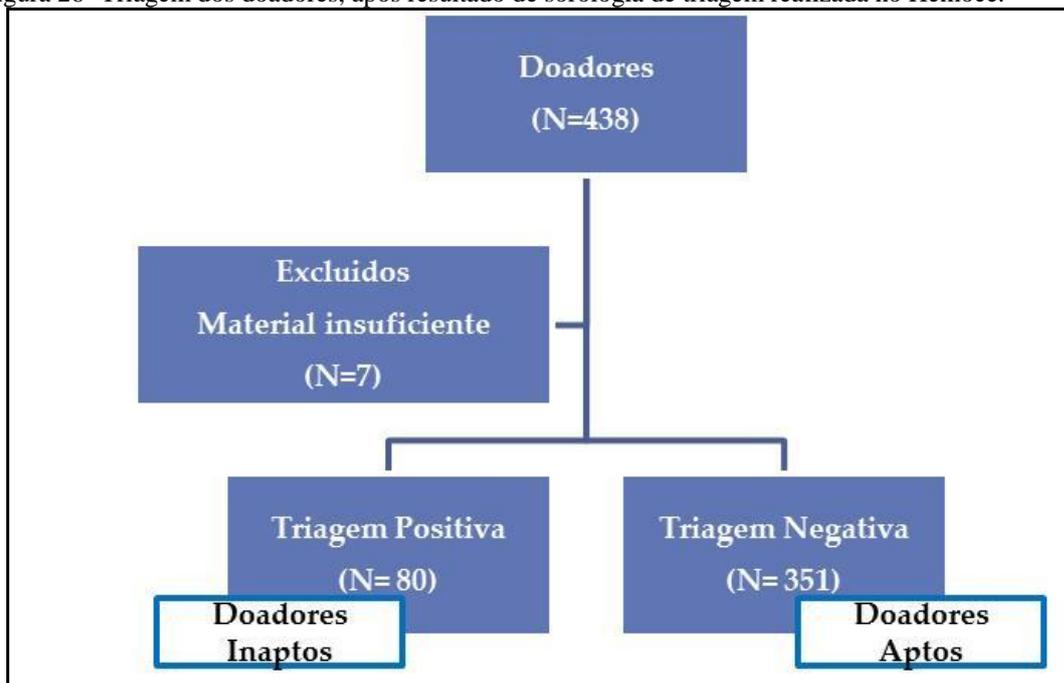
Dos 431 doadores, 80 (18,6%) apresentaram sorologia positiva na triagem do Hemoce, sendo que 32 (7,4%) foram reagentes para HIV, 18 (4,2%) para Hepatite C, 16 (3,7%) para Hepatite B, 9 (2,1%) para Sífilis, 7 (1,6%) para Doença de Chagas e 3 (0,7%) para HTLV (Gráfico1). Apresentaram sorologia positiva para mais de um teste 2 doadores, um para Sífilis e Hepatite C e outro para Sífilis e HIV (Gráfico1).

Gráfico 1 -Resultados dos exames sorológicos de triagem realizados no Hemoce de todos os doadores incluídos no trabalho (431), coletados durante o período de Maio à Novembro de 2011.



As amostras dos 80 doadores, que apresentaram alguma sorologia positiva na triagem, foram excluídas do estudo, pois, segundo as normas do Hemoce, as bolsas com sorologia positivas são descartadas. Dessa forma, no estudo foram incluídas 351 amostras de doadores aptos para a doação de sangue (Figura 26).

Figura 26- Triagem dos doadores, após resultado de sorologia de triagem realizada no Hemoce.



5.2 Pesquisa de *Leishmania* nos Doadores de Sangue Aptos (351)

5.2.1 Método Parasitológico

5.2.1.1 Cultura em NNN para *Leishmania*

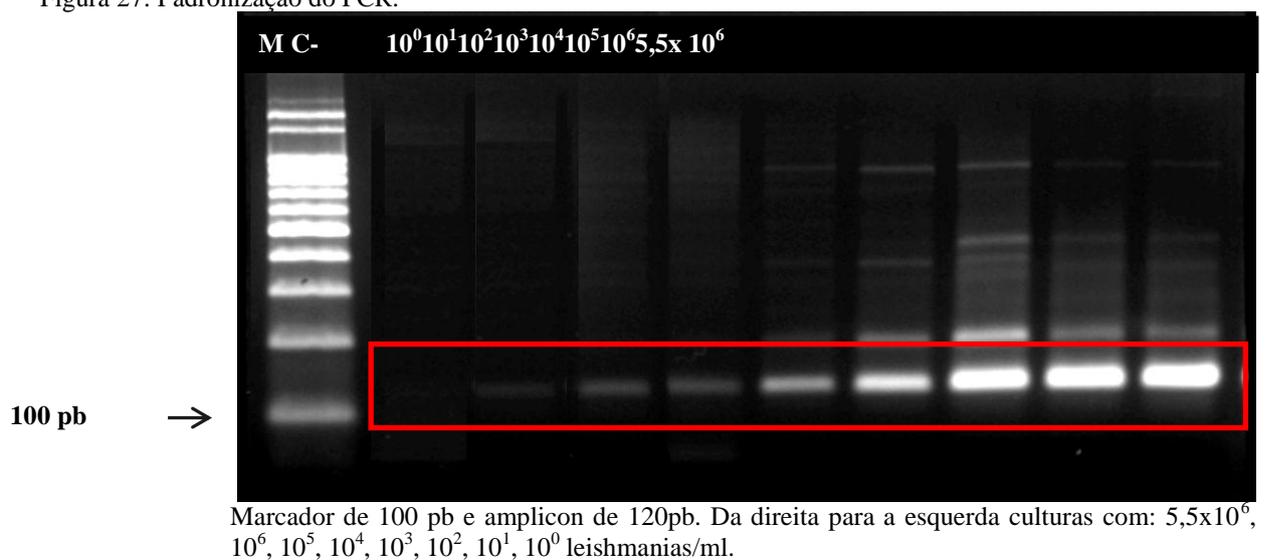
As 351 culturas de creme leucocitário dos doadores de sangue foram mantidas por 4 semanas à 26°C em B.O.D, sendo avaliadas por 2 observadores experientes 3 vezes por semana. No final do período de avaliação, todas as culturas para *Leishmania* resultaram negativas (Gráfico 2).

5.2.2 Métodos Moleculares

5.2.2.1 PCR Convencional da Cultura da cepa de *Leishmania amazonensis*, cepa BA-125

A padronização do PCR foi realizada, tendo como controle positivo promastigotas obtidos a partir de culturas de *Leishmania amazonensis*, cepa BA-125. A suspensão de promastigotas, após lavagens, foi diluída para as seguintes concentrações: 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 /ml e em seguida extraído o DNA. Com o PCR utilizado, foi possível detectar até 1 leishmania, como visto na Figura 27.

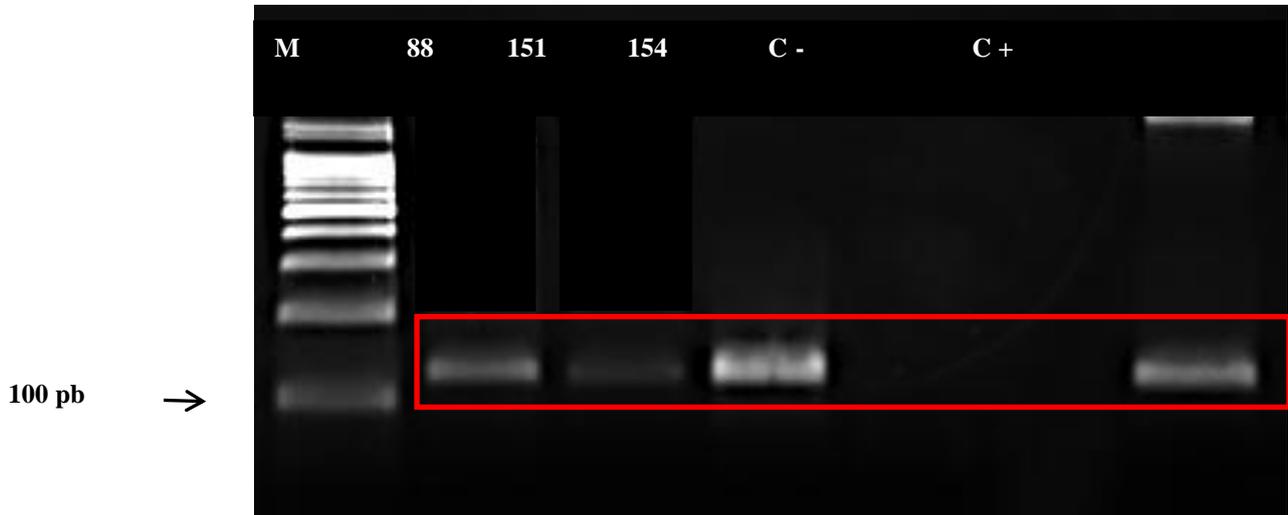
Figura 27: Padronização do PCR.



5.2.2.2 PCR Convencional para a Detecção de *Leishmania*

Após a extração e quantificação do DNA do creme leucocitário dos doadores de sangue, foi realizado o PCR convencional das 351 amostras, e 15 (4,3%) amplificaram para o gênero da *Leishmania* (Fig. 28) (Gráfico 2) (Tabela 8).

Figura 28- Foto em gel de agarose a 2% PCR (kDNA) para *Leishmania*.

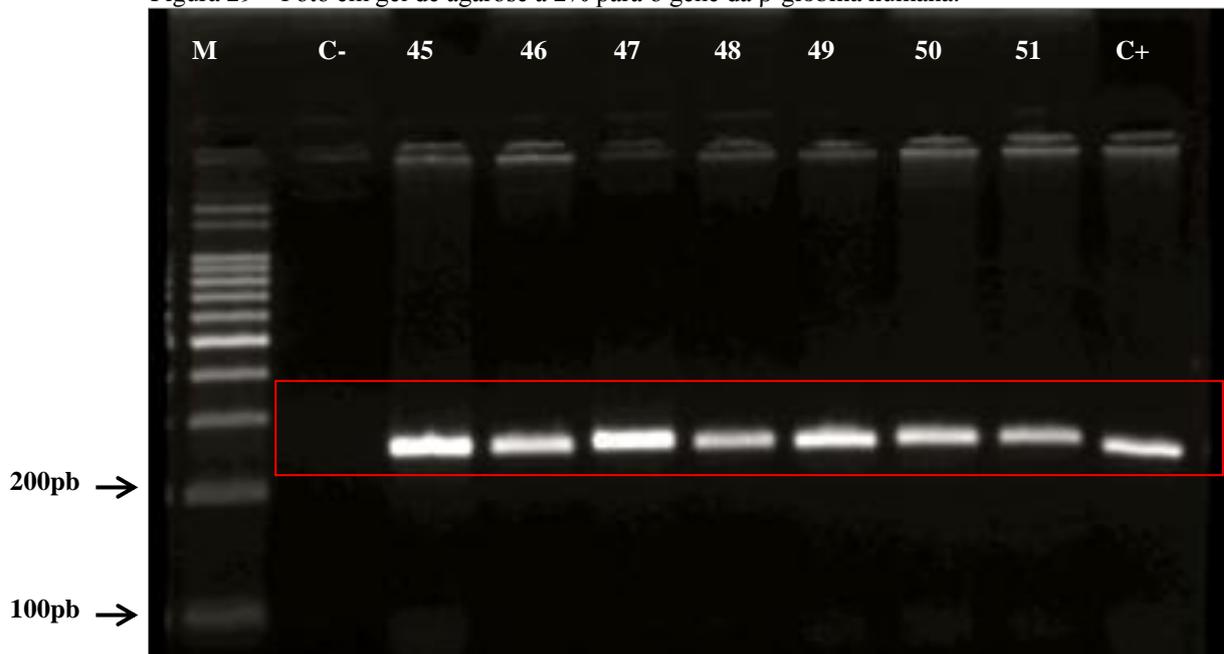


Resultado de PCR convencional (kDNA) para *Leishmania*, utilizando primers 150 e 152 gerando um fragmento de 120 pb. Marcador de 100pb e controle positivo (C+) extraído de uma cultura de *Leishmania amazonensis*, cepa BA-125 e amostras positivas.

5.2.2.3 Controle Interno do Gene da β -globina

Como controle interno da reação, foi realizado o PCR para o gene da β -globina humana, sendo amplificado em todas as amostras avaliadas (Fig.29), indicando que o DNA estava bem preservado.

Figura 29 – Foto em gel de agarose a 2% para o gene da β -globina humana.



Resultado de PCR para o gene da β -globina humana, utilizando *primers* hb3if e hb4ir, gerando um fragmento de 252pb. Marcador de 100pb, controle negativo (C-), amostras 45 a 51 e controle positivo (C+).

5.2.2.4 Sequenciamento dos Genes Amplificados no PCR

Para confirmarse os genes amplificados correspondiam ao gênero de *Leishmania*, foi realizado o sequenciamento na empresa ACTGENE Análises Moleculares/Ludwigbiotec. Das amostras que tiveram PCR positivo para o gênero de *Leishmania*, 5 amostras foram selecionadas por randomização e enviadas para o sequenciamento, além do controle positivo utilizado no PCR, portanto 6 amostras.

Os picos encontrados no sequenciamento foram realizados no programa BioEdit (Fig. 30).

Após a construção do gráfico no programa BioEdit, o DNA obtido a partir das amostras positivas por PCR foi submetido à sequência de nucleotídeos analisadas pelo BLAST.

As sequências mostraram uma semelhança de 84% até 100% para as sequências do minicírculo kDNA de *Leishmania*.

Portanto, o resultado do sequenciamento das amostras enviadas confirmou que os genes amplificados de 120 pb são do Gênero *Leishmania*

Fig. 30 - Eletroferograma de uma sequência de DNA de *Leishmania*, amostra 59.

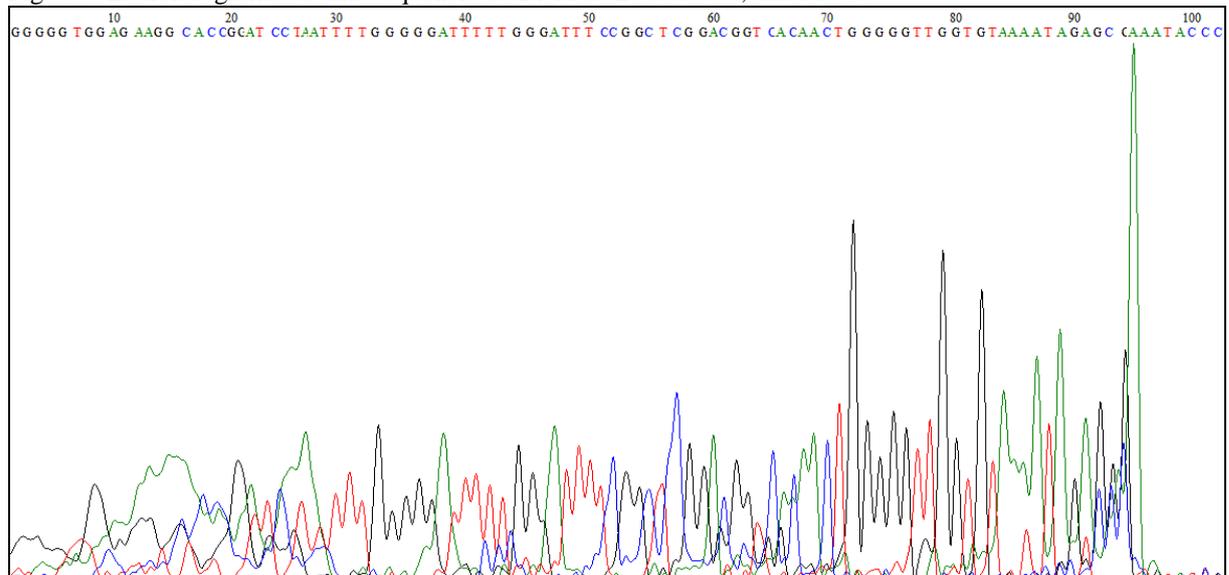
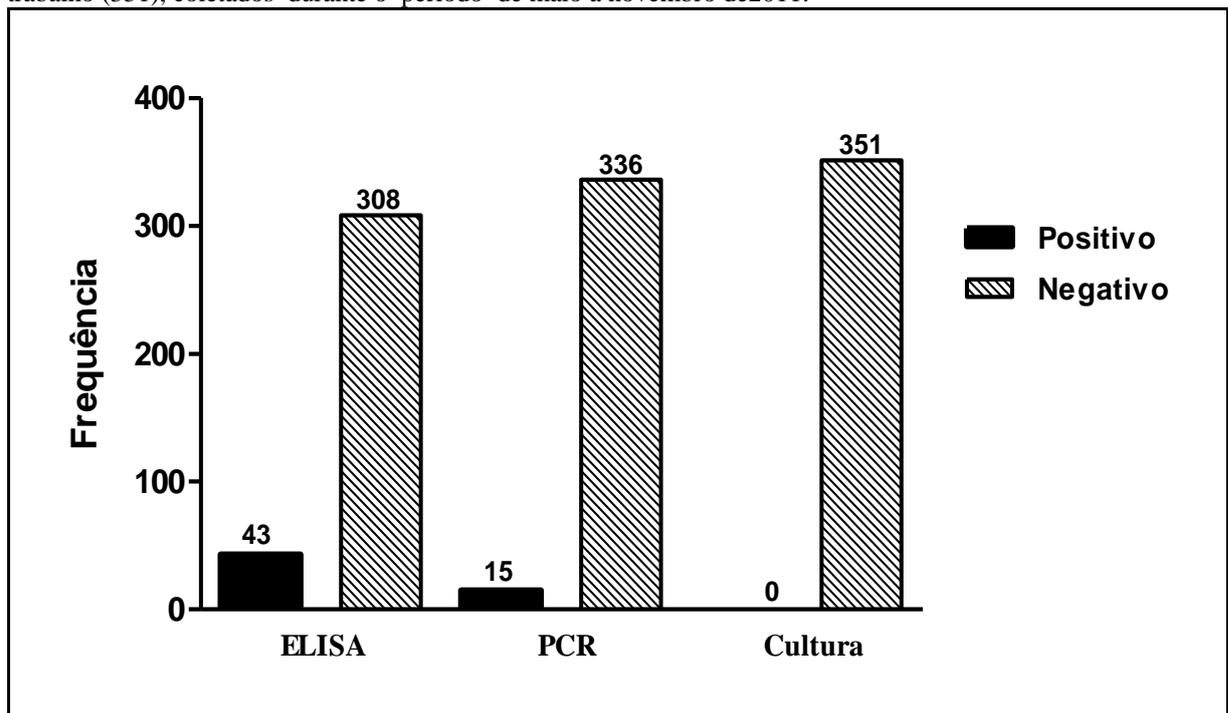


Imagem obtida após o sequenciamento de DNA. Cada pico colorido representa um nucleotídeo na sequência do DNA.

5.2.3 Detecção de Anticorpos Específicos para *Leishmania* Através de ELISA

Dos 351 doadores, aptos a doar sangue, 43 (12,2%) apresentaram anticorpos específicos para *Leishmania*, na diluição de 1:100 (Gráfico 2) (Tabela 8).

Gráfico 2 -Resultado dos exames, PCR, ELISA e Cultura, realizados nos doadores de sangue incluídos no trabalho (351), coletados durante o período de maio a novembro de 2011.



Dos 351 doadores aptos a doar sangue, 43 (12,2%) apresentaram sorologia positiva pelo método ELISA e 15 (4,3%) PCR positivo para o gênero *Leishmania*, sendo que 2 (0,6%) deles resultaram positivo nos dois testes (Tabela 8). Assim, levando em conta os dois testes, ao todo foram detectados 56 amostras positivas para *Leishmania*, significando uma prevalência de 16% de doadores com leishmaniose visceral assintomática.

Tabela 8 – Resultado do PCR do creme leucocitário, comparado com teste sorológico ELISA de doadores de sangue (351), no período de maio a novembro de 2011.

		ELISA		Total n (%)
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	
PCR	Positivo	2 (0,6)	13 (3,8)	15 (4,3)
	Negativo	41 (11,7)	295 (84,0)	336 (95,7)
	Total	43 (12, 2)	308 (87,8)	351 (100)

Para avaliar a possibilidade de reação cruzada de *Leishmania* com *T. cruzi*, comparou-se o resultado da sorologia dos doadores que foram excluídos, por apresentarem sorologia positiva ou inconclusiva para Doença de Chagas, na triagem realizada pelo Hemoce, com a sorologia para *Leishmania*. Foram observados 7 amostras, com três tipos de resultados: 1 positivo para *T. cruzi* e para *Leishmania*; 3 positivos para *Leishmania* e inconclusivo para *T. cruzi*; 3 negativos para *Leishmania* e inconclusivo para *T. cruzi* (Tab. 9).

Tabela 9- Resultado da Sorologia do Hemoce para Chagas, comparando com ELISA e PCR para *Leishmania*.

Código	Idade	ELISA Chagas	ELISA <i>Leishmania</i>	PCR <i>Leishmania</i>
45	26	Inconclusivo	Positivo	Negativo
68	53	Inconclusivo	Negativo	Negativo
88	25	Inconclusivo	Positivo	Positivo
92	30	Positivo	Positivo	Negativo
98	28	Inconclusivo	Positivo	Negativo
258	34	Inconclusivo	Negativo	Negativo
309	21	Inconclusivo	Negativo	Negativo

Resultado dos doadores excluídos no estudo por sorologia positiva, mostrando que 6 foram inconclusivos e 1 positivo para Chagas pelo método ELISA realizado pelo Hemoce, comparando com o ELISA e PCR para *Leishmania*.

5.3 Caracterização dos Doadores e Distribuição Quanto à Pesquisa de PCR e ELISA para *Leishmania*

5.3.1 Quanto ao Gênero

Dos 351 doadores, 114 (32,4%) eram do gênero feminino e 237 (67,5%) masculino. Na população feminina, foi detectado positividade para *Leishmania* em 3,1% no ELISA e 0,9%

no PCR. Já na população masculina de doadores, observou-se uma prevalência três vezes maior, 9,1% no ELISA e 3,4% no PCR (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultado dos testes de PCR e ELISA para *Leishmania* e distribuição quanto ao gênero dos doadores de sangue do Hemoce (351), no período de maio a novembro de 2011.

			PCR		ELISA	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Gênero	Feminino	N(%) 114 (32,4)	N(%) 03 (0,9)	N(%) 111 (31,6)	N(%) 11 (3,1)	N(%) 103 (29,3)
	Masculino	237 (67,5)	12 (3,4)	225 (64,1)	32 (9,1)	205 (58,5)
	Total	351 (100)	15 (4,3)	336 (95,7)	43 (12,2)	308 (87,8)

5.3.2 Quanto à Idade

A estratificação das faixas etárias foi feita, levando em conta a mediana como ponto de corte. Verificou-se 46,4% na faixa etária de 18 à 32 anos e 53,6% na dos 33 à 66 anos (Tabela 11).

Com relação ao PCR, não houve diferença entre as faixas etárias, sendo detectado 2% em ambas. Já na pesquisa de anticorpos, os doadores com mais de idade (33 a 66 anos) apresentou maior prevalência de anticorpos anti-leishmania em relação aos mais novos (18 a 32 anos), com resultado de 8,5% e 3,7%, respectivamente ($p=0,03$) (Tabela 11).

Tabela 11- Distribuição por faixa etária dos doadores de sangue do Hemoce (351), em relação aos resultados dos testes de PCR e ELISA, no período de maio a novembro de 2011.

			PCR		ELISA	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Idade (anos)	18-32	N(%) 163 (46,4)	N(%) 8 (2,3)	N(%) 155 (44,2)	N(%) 13 (3,7)	N(%) 150 (42,8)
	33-66	188 (53,6)	7 (2,0)	181 (51,5)	30 (8,5)*	158 (45,0)
	Total	351 (100)	15 (4,3)	(95,7)	43 (12,2)	308 (87,8)

* $p<0,05$

5.4 Distribuição dos Doadores com Resultados Positivos para *Leishmania*, em Relação ao Local de Moradia.

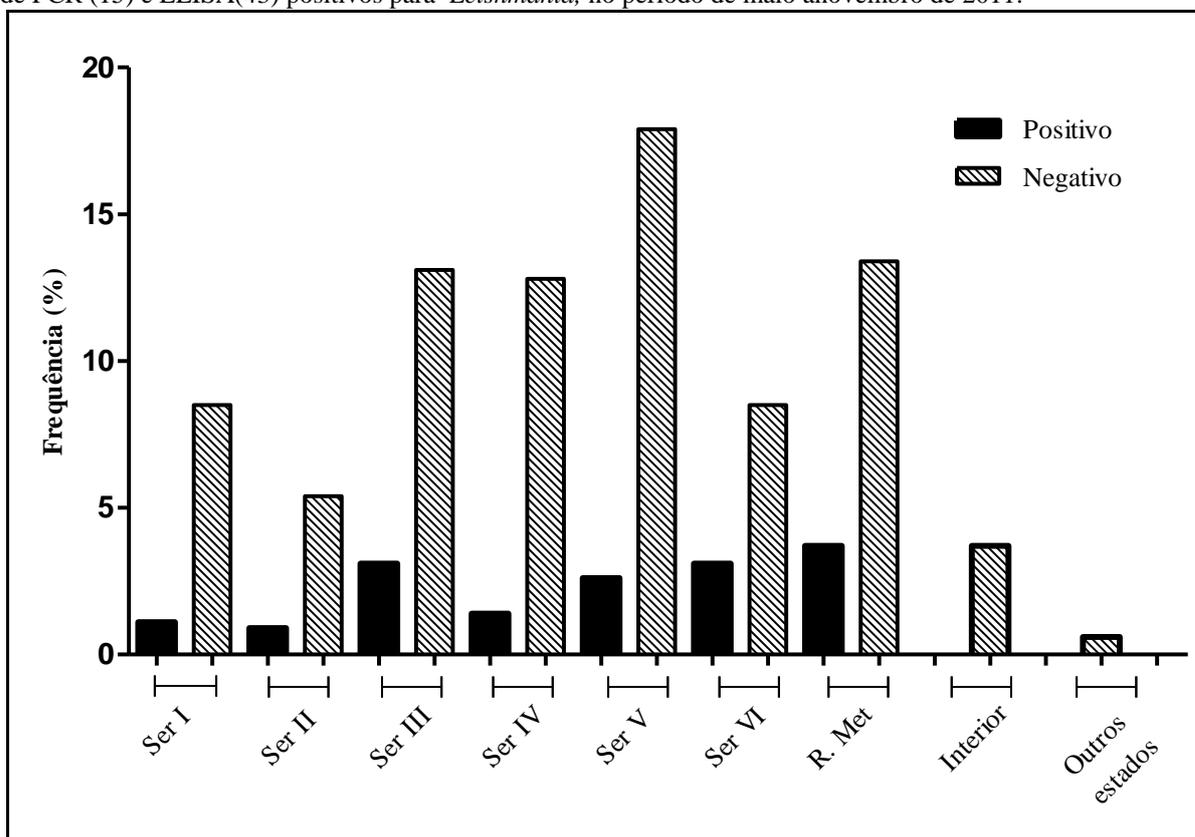
De acordo com a distribuição dos 351 doadores de sangue por regionais de Fortaleza, a maioria é procedente da SER V, seguido da Região Metropolitana (ANEXO B), SER III, IV e VI (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição de moradia dos doadores de sangue de Fortaleza e no Estado Ceará no período de maio a novembro de 2011.

Localização	N	%
SER I	34	9,6
SER II	22	6,2
SER III	57	16,2
SER IV	50	14,2
SER V	72	20,5
SER VI	41	11,7
Região Metropolitana	60	17,0
Interior	13	3,7
Outros Estados	02	0,5
Total	351	100

Levando em conta os doadores de sangue, portadores assintomáticos, em relação ao local de moradia e os resultados de PCR e ELISA positivos para *Leishmania*, foi observada maior prevalência na Região Metropolitana, SER III, V e VI e. A menor prevalência foi na SER II (Gráfico 3).

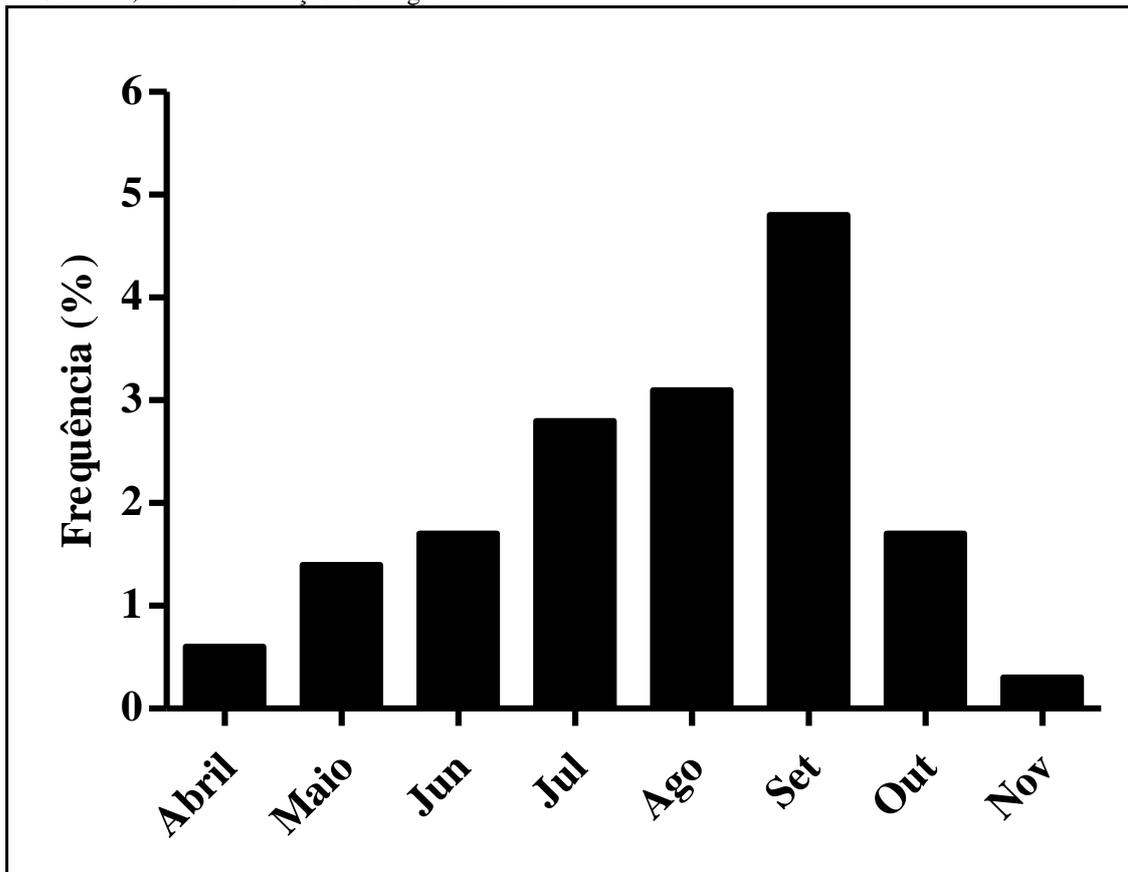
Gráfico 03 – Distribuição dos doadores de sangue (351), pelas regionais de Fortaleza, considerando os resultados de PCR (15) e ELISA(43) positivos para *Leishmania*, no período de maio a novembro de 2011.



5.5 Distribuição dos Doadores com Resultado Positivo para *Leishmania*, em Relação à Distribuição ao Longo do Ano

Em relação à captação de bolsas de portadores de *Leishmania* assintomáticos, ao longo do ano, foi observada a detecção de amostras positivas em todos os meses de coleta do estudo, variando de 0,3% a 2,6%. A maior frequência foi de 1,7% a 2,6%, nos períodos de maio a outubro de 2011. O mês de junho foi o que mais ocorreu doadores com parasito circulante (2,6%) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Distribuição dos doadores com teste molecular PCR (15) e ELISA (43) positivo para *Leishmania*, e sua distribuição ao longo do ano.



6 DISCUSSÃO

A prevalência de portadores assintomáticos de LV, em áreas endêmicas, tem sido relatada cada vez mais, na literatura, tanto no Brasil (D'OLIVEIRA *et al.*, 1997; LUZ *et al.*, 1997; OTERO *et al.*, 2000; RIERA *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2005.; SILVEIRA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012), como em diversos países do mundo (FEDERICO *et al.*, 1991; KUBAR *et al.*, 1997; LE FICHOUX *et al.*, 1999; KYRIAKOU *et al.*, 2003; MARY *et al.*, 2006; MARTIN-SANCHES *et al.*, 2004; SCARLATA *et al.*, 2008; DAS *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência de portadores assintomáticos para LV, no mundo, varia de 3% (LE FICHOUX *et al.*, 1999) a 73,4% (SILVEIRA *et al.*, 2010). Estas diferenças são atribuídas aos diferentes métodos diagnósticos utilizados, não se podendo excluir outros fatores, como a taxa de transmissão, a densidade de flebotomíneo, a pluviosidade, o tempo de endemidade.

No Brasil, tem sido relatada a ocorrência de urbanização da LV, em diversas cidades com grande densidade populacional (SILVA *et al.*, 2001; JERONIMO *et al.*, 2004; DRUMOND *et al.*, 2011; GONÇALVES, 2010; HARHAY *et al.*, 2011; PRADO *et al.*, 2011; BRAZUNA *et al.*, 2012; GOES *et al.*, 2012; LIMA, *et al.*, 2012). Este fato tem contribuído de forma significativa para o aumento da transmissão de *L. infantum*, aumentando a prevalência de LV assintomática em grandes centros urbanos (D'OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 1997; MORAL *et al.*, 2002; WERNECK *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2002; BARÃO *et al.*,

2007; BIGLINO *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2011; DOS SANTOS MARQUES *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2012).

Embora a possibilidade de transmissão de *Leishmania*, através de transfusão de sangue tenha sido admitida pela Organização Mundial de Saúde desde 1990 (WHO, 1991; MICHEL *et al.*, 2011), a importância do portador assintomático, como reservatório da LV, e o risco de transmissão pelo vetor ou por transfusão sanguínea, ainda não estão bem definidos.

O Ceará é um dos Estados que se destaca pela alta transmissão de LV. Nas duas últimas décadas, a prevalência da doença tem sido crescente (SESA, 2012). Desse modo, faz-se necessário investigar a possibilidade de transmissão de *Leishmania infantum*, por transfusão de sangue de doadores portadores assintomáticos. Para isso, o primeiro passo seria a determinação da prevalência de LV assintomática nos doadores de sangue em áreas de transmissão, para avaliar a magnitude do problema.

Neste trabalho, foi detectada uma prevalência de 16% de LV assintomática em doadores de sangue, no Hemocentro do Ceará (Hemoce), levando em conta o PCR e ELISA, simultaneamente. A soroprevalência foi de 12%. Estes achados assemelham-se aos encontrados em outros trabalhos (LUZ *et al.*; 1997; RIERA *et al.*, 2004, COLOMBA *et al.*; 2005, FUKUTANI, 2011, ATES *et al.*, 2012). No Brasil, através de ELISA ou IFI, foram realizados 3 trabalhos, onde a prevalência de anticorpos *anti-Leishmania* em doadores de sangue em Natal-RN, Montes Claros-MG e Salvador-BA, foi de 9,0%, 5,5% e 0,5%, respectivamente (LUZ, *et al.*, 1997; URIAS *et al.*, 2009; FUKUTANI *et al.*, 2011), o que corrobora com nossos dados. A baixa prevalência, encontrada em Salvador (FUKUTANI *et al.*, 2011), deve-se, possivelmente, ao fato desta cidade não ser endêmica para LV, enquanto as demais o são, inclusive Fortaleza (JERONIMO *et al.*, 1994; GONÇALVES, 2011).

Em outros países, a prevalência de doadores de sangue soropositivos assintomáticos variou de 0,5% - 36,4%. Podemos citar na Itália (FEDERICO *et al.*, 1991; COLOMBA *et al.*, 2005; SCARLATA *et al.*, 2008; TORDINI *et al.*, 2011), França (KUBAR *et al.*, 1997; LE FICHOUX *et al.*, 1999), Grécia (KYRIAKOU *et al.*, 2003), Espanha (RIERA *et al.*, 2003; RIERA *et al.*, 2008) e Istambul (ATES *et al.*, 2012).

PCR tem sido utilizado em diversos estudos para diagnóstico de leishmaniose, com a vantagem de poder ser realizado a partir de qualquer amostra biológica (pele, tecido de medula óssea, sangue) (GONTIJO & MELO, 2004). Detecção direta do DNA do parasito representa uma importante alternativa devido sua alta sensibilidade e especificidade. Além disso, quando a amastigota morre, seu DNA apresenta vida média curta, de até 24h (PRINA *et al.*, 2007). Assim, a sua presença no sangue periférico, indica presença de parasito viável. A

sensibilidade da técnica é dependente do alvo a ser amplificado e, também, da qualidade do DNA extraído (MARY *et al.*, 2004).

A reação de PCR utilizada, neste trabalho, apresentou sensibilidade para detectar DNA de *Leishmania*, como demonstrado nos PCR dos controles positivos com suspensão de promastigotas em diluições seriadas (Fig, 27). Nesta concentração, conseguiu-se detectar uma banda perfeitamente visível, o que evidenciou ser uma reação com boa sensibilidade, o que é extremamente importante, especialmente, em trabalhos com portadores assintomáticos, que usualmente apresentam baixa carga parasitária. Estes achados são compatíveis com os de Quaresma (2009) e Martin-Sanchez *e cols.* (2001), com PCR com sensibilidade para detectar 1 fg de DNA, o equivalente a 0,1 *Leishmania*.

Na literatura, a prevalência, de doadores de sangue portadores assintomáticos, determinada por PCR, é variável e por vezes não comparável entre si, em decorrência de abordagens com diferentes metodologias. Uma vantagem do presente trabalho, é que nele foi realizado o PCR convencional, a sorologia e a microcultura em todas as amostras. Foi possível amplificar o DNA de *Leishmania* em 15 (4,3%) doadores assintomáticos. Na literatura, apenas 3 estudos utilizaram a mesma abordagem, e a prevalência pelo PCR, encontrada pelos autores, confirma a observada no presente trabalho: na Grécia, 1,7% (KYRIAKOU *et al.*, 2003), na Itália, 6,8% (TORDINI *et al.*; 2011), e 0,43% em Salvador-BA-BR (FUKUTANI, 2011). Na maioria dos estudos, tem-se feito, primeiramente, uma triagem dos casos através de sorologia. Só então, é realizado o PCR e/ou cultura dos casos soropositivos (LE FICHOUX *et al.*, 1999; OTERO *et al.*, 2000; RIERA *et al.*, 2003; KYRIAKOU *et al.*, 2003; RIERA *et al.*, 2008; SCARLATA *et al.*, 2008). Esta abordagem cria um viés, porque ela mostra a detecção, do parasito ou do seu DNA, somente nos soropositivos, possivelmente não refletindo a realidade da população. Na literatura tem sido relatado trabalhos, onde tem sido observado PCR positivo com sorologia negativa, como 18,5% (RIERA *et al.*, 2004), 49,4% (MARY *et al.*, 2006), 10,4% QUARESMA *et al.*, 2007) e 5,9% (DOS SANTOS MARQUES *et al.*, 2012). No presente trabalho foi encontrado 3,8%, corroborando os achados da literatura.

Este achado, de PCR positivo sem detecção de anticorpos, pode ser interpretado de duas maneiras. A primeira poderia ser uma infecção com pouco tempo de evolução, ainda sem anticorpo suficiente para ser detectado, possivelmente em decorrência da baixa carga parasitária. A outra poderia ser decorrente de problema técnico dos testes de detecção.

Em relação ao PCR, deve-se estar atento a dois pontos primordiais: a contaminação com DNA exógeno e a especificidade do *primer*. Tordini e colaboradores (2011), para

investigar *L. infantum* em doadores de sangue, utilizaram PCR convencional, utilizando os iniciadores do kDNA (RV1 e RV2), e no *Nested* PCR (Ext-E2b e P1 e P2). No PCR convencional 11 (6,8%) amostras foram positivas, embora nenhuma tenha sido confirmada no *Nested* PCR. Três das amostras positivas foram sequenciadas, sendo, então, evidenciado que eram DNA mitocondrial humano. Os autores justificaram como uma possível reação cruzada, concluindo que os *primers* eram inespecíficos.

O DNA do cinetoplasto da *Leishmania* (kDNA) tem sido o alvo mais estudado, em pesquisas moleculares, para diagnóstico de LV humana (SILVA *et al.*, 2010). Bons resultados têm sido encontrados, utilizando tanto a técnica de PCR convencional como a PCR em tempo real (MARY *et al.*, 2004). Vergel e cols. (2005) relataram que já foram identificados vários alvos moleculares para diagnóstico *Leishmania*, mas que o ideal seria o kDNA, que contém regiões conservada e as variáveis, que apresentam sequências que se repetem 10.000/parasita e que permitem a diferenciação entre as espécies de *Leishmania*. No entanto, é possível ter sequências homólogas a outras espécies. Felizmente, atualmente, as ferramentas de bioinformática e os bancos genômicos, disponibilizados *on line*, permitem atestar a fidedignidade dos dados, significando um grande avanço, nos estudos da parasitologia molecular (VERGEL *et al.*, 2005).

No presente estudo, com o encontro de 15 amostras positivas no PCR, 6 (40%) delas foram selecionadas aleatoriamente, e encaminhadas para o sequenciamento. Foi confirmado que os DNAs isolados eram do gênero *Leishmania*, o que confirma a detecção de LV assintomática. Portanto, é importante realizar o sequenciamento de amostras com PCR positivos, para comprovação dos resultados e descartar a possibilidade de *primers* com baixa especificidade ou de contaminação com DNA exógeno.

Por outro lado, verificou-se também indivíduos com sorologia positiva e sem detecção de parasito, 43 (12,2%) doadores apresentaram sorologia positiva para *Leishmania*. Dos quais, não foi detectado DNA de *Leishmania* em 41 (11,7%). Estes dados são semelhantes aos encontrados por Kyriakou e cols. (2003), Fukutani (2011) e Tordini e cols. (2011), que utilizaram a mesma metodologia do presente trabalho (Tabela 2). Isto poderia significar um resultado falso positivo, possivelmente por reação cruzada com *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium sp* (ABRAMO *et al.*, 1993; GONTIJO & MELO, 2004), já que, para detecção de indivíduos assintomáticos, a diluição deve ser relativamente baixa (1:100), devido à baixa carga parasitária e consequente baixa produção de anticorpos.

Para avaliar a possibilidade de reação cruzada ou de uma infecção mista de *Leishmania* com *T. cruzi* (MENDES *et al.*, 2007), comparamos o resultado da sorologia de

triagem, realizada pelo Hemoce para D. de Chagas, com os de LV nas amostras que foram excluídas do estudo. Foi observado 1 (2,1%) amostra positiva para *T. cruzi* e para *Leishmania*. Estes achados foram semelhantes aos encontrados em Montes Claros, por Urias e cols (2009) que observaram 8,7%, e Fukutani (2011) em Salvador, com 2,6% de positividade para *Leishmania* e *T. cruzi*. Merece ser ressaltado que Montes Claros é uma região endêmica de D. de Chagas (DRUMOND, 2006; DIAS, 2007; CARNEIRO, 2008), o que justifica a prevalência maior que as observadas em Salvador e Fortaleza. Infelizmente não se pode discriminar entre reação cruzada ou a ocorrência das duas doenças. Estes doadores foram convidados para serem melhor avaliados, no Ambulatório de D. de Chagas do Hospital Universitário Walter Cantídio-UFC, e estão sendo aguardados.

Uma segunda hipótese, também plausível, na interpretação dos doadores soropositivos e sem detecção de DNA de *Leishmania*, seria que estes indivíduos teriam uma carga parasitária muito baixa, podendo não ser detectada em amostra de sangue de sangue periférico. Estima-se que a parasitemia, em portadores assintomático de área endêmicas, varie entre 0.001 parasito/ml a 1 parasito/ml. E, em pacientes com LV inicial, de 8 parasitos/ml a 1.400.000 parasitos/ml (MARY *et al.*, 2006). Assim, embora o PCR seja um teste ultra sensível, mesmo assim, nos portadores com baixa carga parasitária, pode resultar como falso negativo, quando pesquisado em sangue periférico. Além disso, nestes indivíduos com baixíssima carga parasitária, é possível que as repetidas picadas de flebotomíneos infectados funcionem como *boosting*, na produção de anticorpos.

A falta de uma técnica padrão para detectar infecções assintomáticas por *Leishmania* é uma desvantagem na epidemiologia da leishmaniose. A infecção é geralmente determinada por testes sorológicos quantitativos, tais como o ELISA, imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT), que apresentam alta sensibilidade para a doença, mas não discriminam entre infecção passada e atual (HAILU *et al.*, 1990; DE ALMEIDA SILVA *et al.*, 2006). Outro teste utilizado, também, é a Intradermo Reação de Montenegro, que tem boa sensibilidade para detectar resposta celular contra *Leishmania*, mas se apresenta positiva tanto em portadores assintomáticos, como em indivíduos com história prévia de LV. O PCR, utilizado para detecção do parasito, apresenta sensibilidade (variando de 75 a 98%) e especificidade (de 97 a 100%) (MARTIN-SANCHEZ *et al.*, 2004; RIERA *et al.*, 2004, MORENO *et al.*, 2009).

Alguns autores postulam, que os métodos diretos que demonstram o parasito - exame direto, cultura e PCR - são mais adequados para o diagnóstico de portador assintomático (MORENO *et al.*, 2009; FUKUTANI, 2011; MICHEL *et al.*, 2011). A confirmação é relevante,

mas isso não significa que não se deva usar a sorologia na detecção dos assintomáticos. Não se pode descartar o valor da sorologia, pela possibilidade dela apresentar uma maior chance da infecção ser detectada, no período em que a carga parasitária ainda é muito baixa, quando a *Leishmania* está mais restrita na medula óssea e baço (OTERO *et al.*, 2000; METTLER *et al.*, 2005). Assim, a realização dos dois testes aumenta a chance de detecção dos portadores assintomáticos. Ainda é necessário aprimorar os testes sorológicos com proteínas recombinantes que sejam mais específicas para *Leishmania infantum*, e desse modo, talvez se possa resolver ocorrência de reação cruzada. Uma falha, do presente trabalho, foi a de ter adotado o questionário do Hemoce, no momento da entrevista, e nele não tem a pergunta sobre história prévia de LV. Desta forma, ficou a impossibilidade de distinguir entre portador assintomático e indivíduo com história prévia de LV.

Uma importante inconveniência dos estudos para detecção de portadores assintomáticos, é a dificuldade de diagnóstico, por conta do baixo nível de anticorpos específicos e do reduzido número de parasitas, como visto por Pampiglione e cols. (1974), Riera e cols. (2004), Moreno e cols. (2009). Em relação aos 13 (3,8%) doadores com PCR positivos e sorologia negativa, isto pode significar uma infecção recente, com baixa carga parasitária. A concentração de anticorpos produzida ainda não seria suficiente para positivar a reação de ELISA, na diluição utilizada de 1:100. Isto poderia estar relacionado às cinéticas diferentes da carga parasitária e da produção de anticorpos. No modelo da leishmaniose canina experimental, parasitos são detectados no sangue periférico 4 meses pós-infecção, enquanto anticorpos específicos para *Leishmania* só com 6 a 13 meses pós-infecção (RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.* 2007). Outra hipótese seria a de que o resultado do PCR tenha sido falso positivo. Como o sequenciamento confirmou que, o DNA isolado era do gênero *Leishmania*, pode-se descartar esta possibilidade, ficando mais provável a primeira possibilidade do portador se encontrar numa janela imunológica. Fortalecendo esta possibilidade, estão os dados de outros autores (MARY *et al.*, 2004; DE GOUVÊA VIANA *et al.*, 2008; BHATTARAI *et al.*, 2009; DOS SANTOS-MARQUES *et al.*, 2012), que observaram indivíduos assintomáticos com parasitemia inferior a 0,2 parasitas/ml e, que 6 desses indivíduos não apresentavam anticorpos específicos para *Leishmania*.

Na tentativa de isolar o parasito, foram realizadas microculturas, em duplicadas, das 351 amostras de creme leucocitário, que ficaram em avaliação durante quatro semanas. Todas as leituras se mostraram negativas. Na literatura, alguns trabalhos, envolvendo doadores de sangue, também utilizaram cultura como método parasitológico. No trabalho de Le Fichoux e cols (1999), com 576 doadores de sangue, foi feita uma triagem sorológica inicial e realizado

cultura e PCR somente dos doadores soropositivos. Das 76 culturas realizadas, 9 (11,8%) foram positivas. Esse achado diferente, possivelmente seja em decorrência da metodologia por eles adota. As culturas foram realizadas com 6 ml de creme leucocitário. Além disso, o período de cultivo foi de 6 meses, sendo o meio replicado duas vezes ao mês. No trabalho de Riera e cols. (2008), foi realizada cultura em NNN de 304 amostra, com duplicata em tubo com um inóculo de 250µl, e em garrafa de 20 ml, com de 1 ml de CMSP, mantidas também por seis meses, onde 2 (0,6%) culturas se mostraram positivas.

Os resultados negativos das culturas, do presente trabalho, podem ser justificados por ter sido utilizado microcultura. Pela baixa carga parasitária encontrada em pacientes com LV assintomática, e, levando em conta que o inóculo foi de 0,5ml CMSP/poço. O tamanho do inóculo influencia o crescimento da leishmania, em qualquer que seja o meio utilizado. Sendo baixa a parasitemia em indivíduos assintomáticos, de 0,001 parasitas/ ml a 1 parasita/ ml, é definitivamente reduzida a chance de ter isolamento do parasito, em meios de cultivo (MARY *et al.*, 2006). Além, disso, devido a carga parasitária inicial ser muito baixa, as promastigotas podem proliferar muito lentamente, por conta das pequenas quantidades de fator de crescimento autócrino (LEMESRE *et al.*, 1988), o que demandaria mais tempo que os cultivos de lesões de pacientes com doença ativa. Como o tempo utilizado neste trabalho foi só de 4 semanas, isto pode ter influenciado no resultado.

Deve-se ressaltar que a cultura é um teste padrão ouro, quando utilizada em pacientes sintomáticos, mas não é o método de escolha para provar a presença do parasita em indivíduos assintomáticos, devido à sua baixa sensibilidade (RIERA *et al.*, 2004; JIMENEZ-MARCO *et al.*, 2012).

Quanto ao perfil demográfico dos doadores de sangue deste estudo, houve predomínio do gênero masculino 67,5%, possivelmente, porque os homens podem doar sangue num intervalo menor que as mulheres, de 60 e 90 dias, respectivamente (ANVISA, 2011). O homem tem valores de hemoglobina mais constantes que as mulheres, que apresentam oscilações, por conta do período menstrual. Esses resultados assemelham-se com os encontrados por Urias *et al.*, 2009 que obteve 57,90% de doadores masculinos e Fukutani, (2011) com 74,5%.

Em relação à distribuição segundo a faixa etária, quando se avalia a positividade pelo PCR, não houve diferença entre elas (2,3% x 2,0%). No entanto, pela soropositividade, a prevalência é maior nos mais velhos, 3,7% x 8,5% (p=0,03). Uma maior prevalência em pessoas com mais idade, pode-se atribuir a uma maior exposição aos flebotomíneos infectados

e, conseqüentemente, mais tempo de infecção e mais tempo de produção de anticorpos. Estes dados são compatíveis com os observados por Biglino e cols. (2010).

Levando em conta a distribuição dos doadores de sangue com infecção assintomática por *Leishmania infantum*, em relação ao local de moradia, foi observada maior prevalência na Região Metropolitana, SER III, V e VI. A menor prevalência foi na SER II. Estas áreas de maior prevalência coincidem com os locais onde tem sido registrado maior ocorrência de LV sintomática em Fortaleza, em período endêmico (GONÇALVES, 2011). Elas integram os eixos de expansão/difusão da doença, e caracterizam-se por ter grande contingente populacional, constituído na sua maioria por migrantes da zona rural, carência de infraestrutura sanitária, residências com criação de animais no peridomicílio, grandes áreas verdes, bacia hidrográfica com rios (Maranguapinho e Ceará) e lagoas (Messejana, Parangaba e outras) (GONÇALVES, 2011).

Em relação à distribuição de doadores de sangue, portadores assintomáticos de *Leishmania*, segundo o mês da coleta ao longo do ano, observou-se que, embora tenha ocorrido captação de bolsas de portadores assintomáticos durante os meses de abril a novembro, a maior prevalência ocorreu no período de maio a outubro, variando de 1,4 a 4,8%. Estes achados corroboram com os de registro de LV sintomática em Fortaleza. A análise da incidência de LV sintomática mostra que ela ocorre de maneira cíclica, com registro de maior número de casos em dois períodos do ano, de junho a setembro e de dezembro a janeiro (GONÇALVES, 2011). Como a coleta de amostras do estudo não ocorreu no período de dezembro a fevereiro, não se pode fazer a comparação deste segundo pico de ocorrência.

Para se definir um hospedeiro como reservatório, é necessário o preenchimento de cinco critérios: o hospedeiro reservatório precisa ter uma densidade populacional grande e longa duração de vida; proporcionar uma significativa fonte de alimentos aos flebotomíneos; ter contato frequente com o vetor; a infecção deve ser pouco patogênica no hospedeiro reservatório, para permitir um longo tempo de sobrevivência do parasito; ter presença de parasita suficiente na pele e/ou no sangue (WHO, 2010).

Portadores de *Leishmania* assintomáticos apresentam carga parasitária baixa, até 1 parasita por ml de sangue (MARY *et al.*, 2004; MARY *et al.*, 2006; SELVAPANDIYAN *et al.*, 2008). Embora eles tenham *leishmania* circulando, a chance de infectar flebotomíneo é muito baixa (COSTA *et al.*, 2000). No entanto, devido ao crescente contingente de portadores assintomáticos em áreas endêmicas, esta hipótese não pode ser descartada (PAMPIGLIONE *et al.*, 1974; D'OLIVEIRA *et al.*, 1997; KUBAR *et al.*, 1997; LUZ *et al.*, 1997; LE FICHOUX *et al.*, 1999; RIERA *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2005; MARTIN-SANCHES *et al.*,

2006; MARY *et al.*, 2006; MORENO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; URIAS *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2010; TOPNO *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2011; OSTYN *et al.*, 2011; TORDINI *et al.*, 2011; ATES *et al.*, 2012.; LIMA *et al.*, 2012).

Outro ponto importante a ser ressaltado, em relação aos portadores assintomáticos, é a ocorrência de ciclo antroponótico artificial, como a transmissão por transfusão sanguínea, onde o baixo número de leishmania circulante, até 1 parasita/ml de sangue (MARY *et al.*, 2004), é contrabalançado pelo volume de sangue transfusionado. Fazendo uma estimativa da carga parasitária de uma bolsa de 400 ml de sangue, ela poderia conter até 3×10^3 leishmanias.

Diante do exposto, pode-se colocar que a possibilidade de transmissão de LV por portadores assintomáticos, deve ser avaliada de dois modos: primeiro, levando em conta o ciclo antroponótico natural, isto é, através do portador assintomático – vetor - indivíduo sadio; segundo, no ciclo antroponótico artificial, isto é, através do portador assintomático – transfusão / doação de órgão para transplante / indivíduo sadio.

No ciclo antroponótico natural, embora tecnicamente o portador assintomático preencha todos os critérios de hospedeiro reservatório, como o volume de sangue que o flebotomíneo suga é muito reduzido e a carga parasitária no sangue circulante também é muito baixa, a chance de ocorrer transmissão da LV é muito pequena. No entanto, no ciclo antroponótico artificial, a possibilidade de risco de transmissão de LV por transfusão existe, como em casos relatados na literatura (CHUNG *et al.*, 1948; KOSTMAN *et al.*, 1963; DEY & SINGH *et al.*, 2006) e este risco é mais eminente em pacientes imunossuprimidos, como crianças abaixo de 6 meses de idade, pacientes em uso de drogas imunossupressoras, pacientes com AIDS (PITTALIS *et al.*, 2006; WEISSER *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008), assim como em pacientes hemodialisados com múltiplas transfusões (LUZ *et al.*, 1997).

Nos bancos de sangue do Brasil são realizadas como triagem de rotina para os doadores de sangue os exames sorológicos de HIV1, HIV2, Sífilis, Doença de Chagas, Hepatite B, Hepatite C, HTLV1 e HTLV2, não sendo realizada a triagem sorológica para Leishmania. Deste modo, parece ser essencial a recomendação de incluir, nos bancos de sangue de áreas endêmicas de LV, a triagem para *Leishmania infantum*.

7 CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que:

- A prevalência de portadores de *Leishmania* assintomáticos, em doadores de sangue no Hemoce, foi de 16%, levando em conta dois métodos diagnósticos, ELISA e PCR;
- A sorologia foi capaz de detectar 12,2%;
- A detecção de DNA de *Leishmania* no sangue periférico de 4,3% dos doadores indica a circulação do parasita no sangue, e um risco de transmissão por transfusão sanguínea.
- O sequenciamento de 6 (40%) dos PCR positivos, confirmou que o gene isolado é pertencente ao gênero de *Leishmania*.
- Não foi possível isolar *Leishmania* do creme leucocitário dos doadores com Leishmaniose Visceral Assintomática, possivelmente em decorrência da baixa carga parasitaria e a baixa sensibilidade do teste de microcultura adotado.
- Em relação ao local de moradia dos doadores com Leishmaniose Visceral Assintomática, eles estavam mais concentrados na Região Metropolitana, SER III, V e VI.

REFERÊNCIAS

- ABRAMO, C.; FONTES, C.J.; KRETTLI, A.U. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the blood-stage forms of *Plasmodium falciparum* determined by indirect immunofluorescence. **Am J Trop Med Hyg**, v.53, p.202–205, 1995.
- ACEDO SANCHEZ, C.; MARTIN SANCHEZ, J., et al. Leishmaniasis ecoepidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). **Int. J. Parasitol**, v.26, p.303–310, 1996.
- ALAM, M.Z.; SHAMSUZZAMAN, A.K.M.; KUHLIS, K.; SCHONIAN G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine International Health**, v.14(5), p. 499-503, 2009.
- ALBORZI, A.; POURABBAS, B.; SHAHIAN, F.; MARDANEH, J.; POULADFAR, G.R.; ZIYAEYAN, M. 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. **Am J Trop Med Hyg**, v. 79, p. 839–842, 2008.
- ALBUQUERQUE, P.L.M.M.; SILVA, J. G. B.; FREIRE, C.C.F.; OLIVEIRA, S.B.C.; ALMEIDA, D.M.; SILVA, H.F.; CAVALCANTE, M.S.; SOUSA, A.Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (Kala-zar) in Fortaleza, Ceará, Brazil, **Pan Am J Public Health**, v. 26(4), 2009.
- ALENCAR, J.E. Endemias do Nordeste Brasileiro. **Ceará méd**, v. 4, p. 24-32, 1953 *Apud* GONÇALVES, R.P. Epidemia de leishmaniose visceral americana em Fortaleza, Ceará:

dinâmica espacial e temporal. 2010. **Dissertação de Mestrado em Patologia**. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2010.

ALENCAR, J.E. Expansão do Calazar no Brasil. **Ceará méd.**,v.5, p.86-102, 1983.

ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; BOER, M.D.; AVATE, C.C.; DEDET, J.P.; GRADONI, L.; HORST, R.T.; VELEZ, R.T.; MORENO, J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin Microbiol Rev**, v.21, p. 334–59, 2008.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.;GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J.Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years.**Clin Microbiol Rev**.v.10 (2), p.298-319, 1997.

ANDERS, G.PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and the West Bank. **Tese Doutorado**. Universität zu, Berlin, 2003.

ANTINORI, S.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; BIANCHI, R.; CORBELLINO, M.Leishmaniasis among organ transplant recipients.**Lancet Infect Dis**, v.8, p.191–99, 2008.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.31, p.109–118, 2012.

ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER F.The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil.**Emerg Infect Dis**, v. 2, p145–146, 1996.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses.**Int. J. Parasitol.**, v.30, p.1269–1281, 2000.

ATES, S.C.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A. M.; BADAR, S.Y.; KOC, R.C.; ELCICEK, S.; ABAMOR, E.S.; OZTEL, O.N. Detection of antileishmanial antibodies in blood sampled from blood bank donors in Istanbul. **Future Microbiology**, v.7, p.773-779, 2012.

BABIKER, Z. O.; DAVIDSON, R.; MAZINDA, C.; KIPNGETICH, S.; RITMEIJER, K. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. **Am. J.Trop. Med. Hyg.**, v.76, p. 689–693, 2007.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENCO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis.**, v. 154, p. 639–649, 1986.

BANERJEE, D.N. Possible congenital infection in kala-azar.**J. Indian Med. Assoc.**, v.24, p.433 – 435, 1955 *apud* MEINECKE, C.K.; SCHOTTELIUS, J.; OSKAM, L.; FLEISCHER, B. Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v.104, p.65, 1999.

BAÑULS, A.L.; BASTIEN,P.; POMARES, C.; AREVALO, J.; FISA, R.; HIDE, M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection.**Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 1451–1461, 2011.

BARÃO, S.C.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RESENDE, M.R.; SILVA, L.J. Human asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: a seroprevalence study in an urban area of low endemicity. Preliminary results. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.77(6), p.1051–1053, 2007.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; ALMEIDA, R. et al. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infections. **Am J Trop Med Hyg**, v.47, p.587-92, 1992.

BASSET, D.; FARAUT, F.; MARTY, P.; DEREURE, J.; ROSENTHAL, R.; MARY, C.; PRATLONG, F.; LACHAUD, L.; BASTIEN, P.; DEDETET, J.P. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and review of the literature. **Microbes Infect.**, v. 7, p.1370–75, 2005.

BASTIEN, P. Leishmaniasis control: what part for development and what part for research? **Clinical Microbiology and Infection European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, p.1449–1450, 2011.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, p.313, 2008.

BHATTARAI, N.R.; VAN, D.E.R.; AUWERA, G.; KHANAL, B.; DE DONCKER, S.; RIJAL, S.; DAS, M.L.; URANW, S.; OSTYN, B.; PRAET, N.; SPEYBROECK, N.; PICADO, A.; DAVIES, C.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.C. PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. **Trop Med Int Health**, v. 14(4), p.404-11, 2009.

BIGLINO, A.; BOLLA, C.; CONCIALDI, E.; TRISCIUOGGIO, 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**, v. 48, p. 131–136, 2010.

BLANC, C.; ROBERT, A. Cinquieme observation de kala-azar congenital. English translation: Fifth observation of congenital Kalazar. **La Presse Medicale**. v.13, p.1751, 1984.

BOGGILD, A.K.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; ESPINOSA, D.; AREVALO, J.; ADAUI, V.; TULLIANO, G.; et al. Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. **J Clin Microbiol.**, v.45 (11), p.3680-84, 2007.

BORST, A.; BOX, A.T.A., FLUIT, A.C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, p.289-299, 2004.

BRASIL. ANVISA- Portaria nº 1353/2011 de 13 de junho de 2011.

BRASIL. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo populacional 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acessado em 16/07/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, segundo UF de residência, Brasil, grandes regiões e unidades federadas.** 1990 a 2006. Brasília, 2008.

_____. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral Grave: Normas e Condutas.** Brasília, 2005.

_____. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral. Redução da Letalidade.** Brasília, 2011.

_____. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Brasília, 2004.

_____. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Secretaria de Vigilância em Saúde, p. 182, Brasília, 2006.

_____. Ministério da Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Ceará.** Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde, p. 38, Brasília, 2009.

_____. Ministério da Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Ceará.** Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. 5. ed., p. 16, Brasília, 2011.

BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E.T.; MARTINS, D.R.A.; WILSON, M.E.; PEARSON, R.D.; REED, S.G.; JERONIMO, S.M.B. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.67, p.344–348, 2002.

BRAZUNA, J.C.; SILVA, E.A.; BRAZUNA, J.M.; DOMINGOS, I.H.; CHAVES, N.; HONER, M.R.; VAN ONSELEN, V.J.; OLIVEIRA, A.L. Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.45(5), p.601-6, 2012.

BURNS, J.M.JR.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARÓ, R.; REED, S. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci.**, v.90, p. 775-779, 1993.

CALDAS, A.J.M.; COSTA, J.M.L.; GAMA, M.E.A.; RAMOS, E.A.G.; BARRAL, A. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case report. **Acta Tropica**, v.88, p. 39-43, 2003.

CAMARGO, L. M.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência Cultura**, São Paulo, v.55, n. 1, p.34-37, 2003.

CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.M. ;PRATLONG, F.; ANTUNES, F.; MAURÍCIO, I.; DEDET, J.P.; ABRANCHES, P. HIV/Leishmania co-infections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.91, p. 433-6, 1997.

CARDO, L. Leishmania: risk to the blood supply. **Transfusion.** v. 46, p.1641-1645, 2006.

CARNEIRO FILHO, N. V.; LIMA, S. C. Distribuição da Doença de Chagas em Minas Gerais, 1998-2007. VIII Encontro Interno e XII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Uberlândia, **PROPP/UFU**, 2008.

CEARÁ, SESA-Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Informe Epidemiológico (12/06/08). Disponível em : www.saude.ce.gov.br. Acesso em 07/03/2010.

_____, SESA- Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Informe Epidemiológico do Governo do Estado do Ceará. Disponível em: www.saude.ce.gov.br. Acesso em 02/02/2010.

_____, SESA- Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Informe Epidemiológico do Governo do Estado do Ceará 2012. Disponível em: www.saude.ce.gov.br. Acesso em 02/11/2012.

_____, SESA- Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Informe Epidemiológico do Governo do Estado do Ceará. Disponível em: www.saude.ce.gov.br. Acesso em 12/06/2008.

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; SOTO, A.; MENTEN, J.; BOELAERT, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ**, v. 333, p.723, 2006.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.P.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature**, v.5, p.873-82, 2007.

CHENIK, M.; LAKHAL, N.; KHALEF, B.; ZRIBI, L.; LOUZIR, H.; DELLAGI, K. Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *Leishmania major* parasites. **Parasitology**, v. 132, p. 493-509, 2006.

CHULAY, J.D.; BRYCESON, A.D. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 32, p. 475, 1983.

CHUNG, H.L.; CHOW, K.K.; LU J.P. The first two cases of transfusion kala-azar. **Chin Med J**, v.66, p.325-6. 1948.

COLOMBA, C.; SAPORITO, L.; POLARA, V. F.; BARONE, T.; CORRAO, A.; TITONE, L. Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy). **Transfusion and Apheresis Science**, v.33, p.311–314, 2005.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* - specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 7-12, 2004.

CORTES, S.J.C. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. **Tese (Doutorado)**—Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. p.163, 2008.

COSTA, C.H.; GOMES, R.B.; SILVA, M.R.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.; SANTOS, R.S.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAQUIRE, J.H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, 182, p.997–1000, 2000.

COSTA, C.H.; PEREIRA, H.F.; ARAUJO, M.V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980–1986. **Rev Saude Publica**, v. 24, p. 361–372, 1990.

COSTA, C.H.; STEWART, J.M.; GOMES, R.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.; BOZZA, M.; SATOSKAR, A.; DISSANAYAKE, S.; SANTOS, R.S.; SILVA, M.R.B.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, H. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v.66, p. 334–337, 2002.

COSTA, C.H.; WERNECK, G.L.; RODRIGUES, L.J.R.; SANTOS, M.V.; ARAUJO, I.B, et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v.99, p. 229–236, 2005.

CRUZ, I.; CANAVATE, C.; RUBIO, J.M.; MORALES, M.A.; CHICHARRO, C.; LAGUNA, F.; JIMENEZ-MEJIAS, M.; SIRERA, G.; VIDELA, S.; ALVAR, J. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. **Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.96, p.185- 189, 2002.

CRUZ, I.; MORALES, M.A.; NOGUER, I.; RODRÍGUEZ, A.; ALVAR, J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **Lancet**, v.359, p.1124–1125, 2002.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol**, v. 72, p. 132-141, 2002.

D'OLIVEIRA, A. JR; COSTA, S.R.M.; BARBOSA, A.B.; ORGE, M.G.O.; CARVALHO, E.M. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.92, p. 15 – 20, 1997.

DAS, V.N.R.; SIDDIQUI, N.A.; VERMA, R.B.; TOPNO, R.K.; SINGH, D.; DAS, S.; RANJAN, A.; PANDEY, K.; KUMAR, N.; DAS, P. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to kala-azar elimination programmes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, p. 661– 666, 2011.

DAVIES, C.R.; KAYE, P.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ**, v.326, p.377–82, 2003.

DE ALMEIDA SILVA, L.; ROMERO, H.D.; PRATA, A.; COSTA, R.T.; NASCIMENTO, E.; CARVALHO, S.F.G.; RODRIGUES, V. Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.75, p. 739–743, 2006.

DE CAMARGO-NEVES, V.L.; SPINOLA, R.; LAGE, L. American leishmaniasis in the state of São Paulo: epidemiological status in 2001–2002. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.36, p. 27–29, 2003.

DE GOUVÊA VIANA, L.; DE ASSIS, T.S.; ORSINI, M.; DA SILVA, A.R.; DE SOUZA, G.F.; CALIGIORNE, R.; DA SILVA, A.C.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARCIANO, A.P.; MARTINS-FILHO, O.A.; RABELLO, A. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. **Trans Royal Soc of Trop Med and Hyg**, v.102, p.548-555, 2008.

DE OLIVEIRA, C. I.; BAFICA, A.; OLIVEIRA, F.; FAVALI, C.B.F.; Correa, T.; FREITAS, L.A.R.; COSTA, J.M.; BARRAL, A. Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction—Based Detection of *Leishmania* in the Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**, v. 37, p. 149-153, 2003.

DEANE, M.P.; DEANE, L.M. Observações sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Ceará. **Hospital**, v.48, p.347 – 364, 1955.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. 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.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol Infect Dis**, v. 27, p. 305-18, 2004.

DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. **Indian J Med Microbiol**, v. 24, n. 3, p. 165-170, 2006.

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**. v.11,p.13-22, 2007.

DOS SANTOS MARQUES, L.H., GOMES, L.I.; ROCHA, I.C.M.; SILVA, T.A.M.; OLIVEIRA, E.; MORAIS, M.H.F.; RABELLO, A.; CARNEIRO, M. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6 (12), p. e1955, 2012.

DRUMOND, J.A.G.; MARCOPITO, L.F. Migração interna e a distribuição da mortalidade por doença de Chagas, Brasil, 1981/1998. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22(10)p. 2131-2140, 2006.

DRUMOND, K.O.; COSTA, F.A. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.53 (1), p. 3-11, 2011.

EL-TOUM, I.A.; ZIJLSTRA, E.E.; ALI, M.S.; et al. Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta. **Am J Trop Med Hyg.**, v.46, p.57–62, 2005.

ELAMIN, A.; OMER, M.I.A. Visceral leishmaniasis in a 6-week-old infant: possible congenital transmission. **Trop Doct.**, v. 22, p.133–135, 1992.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry.**, v.8(9), p.871-874, 1971.

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v.20, p.524-530, 2004.

EVANS, T.G.; KRUG, E.C.; WILSON, M.E.; VASCONCELOS, A.; ALENCAR, J.E.; PEARSON, R.D. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA e Immunoblot. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.84, p. 157-166, 1989.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; MCAULIFE, I.T.; VASCONCELOS, I.; SOUSA, A.; LIMA, J.W.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J Infect Dis**, v.166, 1124-32, 1992.

FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G.R.; ASGARI, Q.; KALANTARI, M.; MOHEBALI, M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. **Ann. Trop. Med. Parasitol**, v.102, p. 577–583, 2008.

FEDERICO, G.; DAMIANO, F.; CALDAROLA, G.; FANTINI, C.; FIOCCHI, V. A seroepidemiological survey on *Leishmania infantum* infection. **Eur. J. Epidemiol.**, v.7, p.380–383, 1991.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A.; DUARTE, G.; EL-BEITUNE, P.; QUINTANA, S.M.; MAIA, T.L. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in pregnancy. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v.12, p.31-40, 2004.

FUKUTANI, K.F.; Aplicação de técnicas sorológicas e moleculares na detecção de *Leishmania* em doadores de sangue na cidade de Salvador, Bahia. **Dissertação (Mestrado)** Fio Cruz/Bahia, 2011.

GAMA, M. E.; COSTA, J. M.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 889-893, 2004.

GAO, C.H.; WANG, J.Y.; et al. Study on PCR method for detecting the asymptomatic infection of *Leishmania infantum*. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 24, p. 92–96, 2006.

GENARO, O. NEVES, D. P. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Parasitologia Humana**. 10ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003, p.97-100.

GÓES, M.A.; DE MELO, C.M.; JERALDO, V.D.E. Time series of visceral leishmaniasis in Aracaju, state of Sergipe, Brazil (1999 to 2008): human and canine aspects. **Rev Bras Epidemiol**. 2012 Jun;15(2):298-307.

GONÇALVES, R.P. Epidemia de leishmaniose visceral americana em Fortaleza, Ceará: dinâmica espacial e temporal. 2010. **Dissertação de Mestrado em Patologia**. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2010.

GONTIJO, B.; CARVALHO, L.B. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, F. C. M.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338-349. 2004.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infect Dis Clin N Am**, v.26, p. 309–322, 2012.

GRIMALDI, JR. G. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n.3, p. 230-50, 1993.

GROGL, M.; DAUGIRDA, J.L.; HOOVER, D.L.; MAGILL, A.J.; BERMAN, J.D. Survivability and infectivity of viscerotropic *Leishmania tropica* from operation Desert Storm participants in human products maintained under blood bank conditions. **Am J Trop Med Hyg**, v. 49, p. 308-15, 1993.

HAILU, A. Pre- and post-treatment antibody levels in visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v.84, p. 673–675, 1990.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, p. 403-408, 2011.

HERNANDEZ-PEREZ, J.; YEBRA-BANGO, M.; JIMENEZ-MARTINEZ, E.; SANZ-MORENO, C.; CUERVAS-MONS, V.; PULPO, L.A.; RAMOS-MARTINEZ, A.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, J. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in solid organ transplantation: report of five cases and review. **Clin Infect Dis**, v. 29, p. 918–21, 1999.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **The Lancet**. v. 354, p. 1191-99, 1999.

HERWALDT, B.L.; JURANEK, D.D. Laboratory-acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis, and toxoplasmosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, p. 313-23. 1993.

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.

HOUGHTON, R.L.; PETRESCU, M.; BENSON, D.R.; SKEIKY, Y.A.; SCALONE, A.; BADARÓ, R.; et al. A cloned (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. **J Infect Dis, Hyg**, v. 62, n. 1, p. 128-131, 2000.

HO, M.; SIONGOK, T.K.; LYERLY, W.H.; SMITH, D.H. Prevalence and disease spectrum in a new focus of visceral leishmaniasis in Kenya. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v.76(6), p.741-6, 1982.

INDIANE DE OLIVEIRA, C.; BAFICA, A.; OLIVEIRA, F.; FAVALI, C.B.F.; CORREA, T.; FREITAS, L.A.R.; NASCIMENTO, E.; COSTA, J.M.; BARRAL, A. Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction–Based Detection of *Leishmania* in the Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 149–53, 2003.

INDIANI DE OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, C.R.; DE JESUS, J.R.; BOMURA ROSATO, A.; DA SILVA, J.S.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. **Microbes Infect.**, v.6, p.977-984, 2004.

JERONIMO, S.M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R.F.; CHENG, C.; MONTEIRO, G.R.; NASCIMENTO, E.T.; MARTINS, D.R.; KARPLUS, T.M.; XIMENES, M.F.; OLIVEIRA, C.C.; PINHEIRO, V.G.; PEREIRA, W.; PERALTA, J.M.; SOUSA, J.; MEDEIROS, I.M.; PEARSON, R.D.; BURNS, T.L.; PUGH, E.W.; WILSON, M.E. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand J Infect Dis**. v.36 (6-7), p.443-9, 2004.

JERONIMO, S.; SOUSA, A.; PEARSON, R. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-azar), Cutaneous, and Mucocutaneous *Leishmaniasis*. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005. p. 3145-56.

JERONIMO, S.M.; OLIVEIRA, R.M.; MACKAY, S.; COSTA, R.M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E.T.; LUZ, K.G.; FERNANDES, M.Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, R.D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.88(4), p. 386-8, 1994.

JERONIMO, S.M.B.; TEIXEIRA, M.J.; SOUSA, A.Q.; THIELKING, P.; PEARSON, R.D.; EVANS, T.G. Natural History of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: Long-Term Follow-Up. **Clin Infect Dis**, v.30, p.608-9, 2000.

JIMENEZ-MARCO, T.; RIERA, C.; FISA, R.; GIRONA-LLOBERA, E.; SEDEÑO, M.; GOODRICH, R.P.; PUJOL, A.; GUILLEN, C.; MUNCUNILL, P. 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.

KATAKURA, K.; KAWAZU, S.; NAYA, T.; NAGAKURA, K.; ITO, M.; AIKAWA, M.; QU, J.Q.; GUAN, L.R.; ZUO, X.P.; CHAI, J.J.; CHANG, K.P.; MATSUMOTO, Y. Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 2173-77, 1998.

KOSTMAN, R.; BARR, M.; BENGTSSON, E.; GARNHAM, E.P.C.C.; HULT, G.; KALA-AZAR transferred by exchange blood transfusion in two Swedish infants, p. 384. In, Proceedings of the Seventh International Congress of Tropical Medicine and Malaria. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, p. 384, 1963.

KUBAR, J.; QUARANTA, J.F., et al., Transmission of *L. infantum* by blood donors. **Nat. Med**, v.3 (4), p. 368, 1997.

KUMAR, R.; PAI, K.; PATHAK, K. & SUNDAR, S. Enzymelinked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.8, p.1220-1224, 2001.

KYRIAKOU, D.S.; ALEXANDRAKIS, M.G.; et al. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? **Transfus. Med.**, v.13, p. 59-62, 2003.

LACHAUD, L.; DEREURE, J.; CHABBERT, E.; REYNES, J.; MAUBOUSSIN, J.M.; OZIOL, J.P.; DEDET, E.; BASTIEN, P. Optimized PCR using patient blood samples for

diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients, **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.236–240, 2000.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.82, p. 421-424, 1987.

LE FICHOUX, Y.; QUARANTA, J.F.; AUFEUVRE, J.P.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **J Clin Microbiol**, v.37, p.1953-7, 1999.

LEMESRE, J.L.; DARCY, F.; KWEIDER, M.; CAPRON, A.; SANTORO, F.; Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. **Acta Trop.**, v.45, p.99-108, 1988.

LESSA, M.M.; LESSA, H.A.; CASTRO, T.W.N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 73(6), p.843-7, 2007.

LIMA, I.D.; QUEIROZ, J.W.; LACERDA, H.G.; QUEIROZ, P.V.S.; PONTES, N.N.; BARBOSA, J.D.A.; MARTINS, D. R.; WEIRATHER, J.L.; PEARSON, R.D.; WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.B. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic Infection at the Urban Perimeter. **Am. J. Trop. Med. Hyg**.v.86 (1), p. 99–107, 2012.

LIMA, M.B.; BATISTA, E.A.R. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral humana em Fortaleza-Ce. **RBPS**, v. 22 (1), p.16-23, 2009.

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 her child. **Pediatrics**, v.104, p.65, 1999.

LUZ, K.G.; DA SILVA, V.O.; et al., Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. v. 57, p.168–171, 1997.

MA D.D.; CONCANNON, A.J.; HAYES, J. Fatal leishmaniasis in renal transplant patient. **Lancet**, v.2, p.311–12, 1979.

MAGILL, A.J. Epidemiology of leishmaniasis. **Dermatol Clin**, v.13, p.505-23, 1995.

MAIA-ELKHOURY, A.N.; ALVES, W.A.; GOMES, M.L.S.; SENA, J.S.; LUNA, D.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saude Publica**, v. 24, p. 2941–2947, 2008.

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C.M.C.; MEHTA, S.R, et al. Comparative Study of rK39 *Leishmania* Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6 (1), p. 1484, 2012.

MALTEZOU. Visceral Leishmaniasis during Childhood in Southern Greece. **Clin Infect Dis.**, v.31, p. 1139-1143, 2000.

MANSON-BAHR, P.E. East African kala-azar with special reference to the pathology, prophylaxis and treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.53(2), p.123–137, 1959.

MANTOVANI, R.M.; PORTO, G.R.; RODRIGUES, A.R.; NUNES, J.B.S.; JOSE, F.; ANDRADE, G.M.Q. Leishmaniose visceral congênita: revisão da literatura. **Rev Méd Minas Gerais**, v.15 (1 Supl 1), p. 839-43, 2005.

MARCO, T. J.; FISA, R.; RIERA, C.; LLOBERA, E.G.; SEDEÑO, M.; SAURA, A.; INIESTA, L.; GUILLEN, C.; MUNCUNILL. Pathogen inactivation technology applied to a blood component collected from an asymptomatic carrier of *Leishmania infantum*: a case report. **Vox Sanguinis**, p. 1-3, 2012.

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.

MARTIN-SANCHEZ, J.; PINEDA, J.A.; MORILLAS-MARQUEZ, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. **Am J Trop Med Hyg**, v.70, p.545-548, 2004.

MARTIN-SANCHEZ, J.; LOPEZ-LOPEZ, M.C.; ACEDO-SANCHEZ, C.; CASTRO-FAJARDO, J.J.; PINEDA, J.A.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. **Parasitology**, v.122, p. 607-15, 2001.

MARTINEZ, V.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, A.; ROURA, X.; FRANCINO, O.; ALTET, L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasit Vectors**; v.4, p. 57, 2011.

MARTY, P.; LE FICHOUX, Y.; et al., Leishmanin reaction in the human population of a highly endemic focus of canine leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.86, p.249–250, 1992.

MARTY, P., LELIEVRE, A., et al. Detection by Western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 89, p. 690–691, 1995.

MARTY, P.; LELIEVRE, A.; et al. Use of the leishmanin skin test and Western Blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes-Maritimes (France). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.88, p. 658–659, 1994.

MARY, C.; FARAUT, F., et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.75, p.858–863, 2006.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p.5249–5255, 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M. R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, p. 69-84, 1981.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K,B,F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública**, vol.10, p. 359- 375, 1994.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, p.237 – 246, 1999.

MAURÍCIO, I.L.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Quality control of the micro-ELISA technic applied to the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Médica Portuguesa**, v.8, p. 607-611, 1995.

MAURYA, R.; SINGH, R.K.; KUMAR, B.; SALOTRA, P.; RAI, M.; SUNDAR, S.; Evaluation of PCR for Diagnosis of Indian Kala-Azar and Assessment of Cure. **J Clin Microbiol**, v.43, p. 3038, 2005.

MEINECKE, C.K.; SCHOTTELIUS, J.; OSKAM, L.; FLEISCHER, B. Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v.104, p.65, 1999.

MENDES, D.G.; LAURIA-PIRES, L.; NITZ, N.; LOZZI, S.P.; NASCIMENTO, R.J.; MONTEIRO, P.S.; REBELO, M.M.; ROSA, A.C.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R. Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. **Trop. Med. Int. Health** , v.12, p. 629–636, 2007.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel test) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

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.

MIGONE, L,E. Un caso de kala-zar a Asunción (Paraguay). **Bull Soc Path Exot.**, v. 6, p. 118-120, 1913 *apud* SOUZA, A. Q. Leishmaniose cutânea no Ceará: Aspectos Historicos, Clínicos e evolução terapêutica. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Ceará, 2009.

MIRALLES, G.D.; STOECKLE, M.Y.; MCDERMOTT, D.F.; FINKELMAN, F.D.; MURRAY, H.W. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.62, p. 1058-1063, 1994.

MITTAL, V.; SEHGAL, S.; YADAV, T.P.; SINGH, V.K. Congenital transmission of kala-azar. **J Commun Dis.** v.19, p.184–185, 1987.

MOHAPATRA, T.M.; SINGH, D.P.; SEN, M.R.; BHARTI, K.; SUNDAR, S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, v.4(2), p.114-117, 2010.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Ann Trop Med Parasitol**, v.97(suppl 1), p.29–45, 2002.

MONTEIRO, E.M.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotômíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.38, p.147-152, 2005.

MORAL, L.; RUBIO, E.M.; et al., A leishmanin skin test survey in the human population of L'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.96, p.129–132, 2002.

MORENO, E.C.; GONCALVES, A.V.; CHAVES, A.V.; MELO, M.N.; LAMBERTUCCI, J.R.; ANDRADE, A.S.R. et al. Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by *Leishmania infantum*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.3, p.536, 2009.

MORILLAS, F.; SANCHEZ, R., OCAÑA, J.; et al. Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. **Parasitol. Res.** v.82, p.569–570, 1996.

MURRAY, H.W.; STERN, J.J.; WELTE, K.; RUBIN, B.Y.; CARRIERO, S.M; NATHAN, C.F. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. **J Immunol**, v.138, p. 2290-2297, 1987.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, p. 1561–77, 2005.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; SOUZA, E.C.; SILVA, L.M.; LEAL, P.C.; et al. Prevalence of infection by *Leishmania chagasi* using ELISA (rK39 and CRUDE) and the Montenegro skin test in an endemic leishmaniasis area of Maranhão, Brazil. **Cad Saude Publ.**, v.21, p, 1801–1807, 2005.

NYAKUNDI, P.M.; MUIGAI, R.; WERE, J.B.O.; OSTER, C.N.; GACHIHI, G.S.; KIRIGI, G. Congenital visceral leishmaniasis: case report. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.82, p.564, 1988.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V.F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and timecourse of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogsexposed to three consecutive transmission seasons. **J Clin Microbiol**, v. 44, p.1318–1322, 2006.

OLIVEIRA, A.L.L; PANIAGO, A. M. M; SANCHES, M. A; DORVAL, M. E. C; OSHIRO, E. T, LEAL, C. R. B; PAULA. F. H; PEREIRA, L .G; CUNHA, R. V.; BOIA, M. N. Asymptomatic infection in Family contacts of contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas , Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24(12), p.2827-2833, 2008.

OLIVEIRA, R.A.; SILVA, L.S.; CARVALHO, V.P.; et al. Visceral leishmaniasis after renal transplantation: report of 4 cases in northeastern Brazil. **Trans- pl Infect Dis**, v. 10, p.364–368, 2008.

OSTYN, B.; GIDWANI, K.;KHANAL, B.; PICADO, A.; CHAPPUIS, F.; SINGH, S.P.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.,; BOELAERT, M. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study.**PLoS Negl Trop Dis**. v.5(10), p. e1284,2011.

OTERO, A. C.; DA SILVA, V. O.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. Short report: occurrence of *Leishmaniadonovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **Am J Trop Med Hyg**.v.62(1), p. 128–131, 2000.

PALASSON, R.R .Leishmaniose visceral e gestação: Análise de casos e transmissão vertical no município de Campo Grande, MS, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR, P.E., *et al.* Studies on Mediterranean leishmaniasis 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis.**Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.68, p.447–453, 1974.

PARAGUAI DE SOUSA, E.; ESTEVES PEREIRA, A.P.; SOARES MACHADO, F.C, et al. Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamsters. **Acta Trop**, v.80, p.69-75, 2001.

PAREDES, R.; MUNOZ,J.; DIAZ, I.; DOMINGO, P.; GURGUI, M.; CLOTET, B. *Leishmania* in HIV Infection. **J Postgrad Med**, v. 49, p. 39-49, 2003.

PATEL, R.; PAYA, C.V. Infections in solid-organ transplant recipients. **Clin Microbiol Rev**,v. 10, p.86–124, 1997.

PATTABHI, S.; WHITTLE, J.; MOHAMATH, R.; EL-SAFI, S.; MOULTON, G.G.; et al. Design, Development and Evaluation of rK28-Based Point-of-Care Tests for Improving Rapid Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** v. 4(9), p. 822, 2010.

PEARSON, R.; SOUSA, A. Q.; JERONIMO, S. M. B. *Leishmania species*: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. **Principles and Practice of Infections Diseases**, 5 ed. New York: Churchill Livington, 2000. p. 2832-2845.

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

PEDRAS, M.J.; VIANA, L.G.; OLIVEIRA, E.J.; RABELLO, A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p.172-178, 2008.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Bras Méd**, v. 48, p. 949-950, 1934. *Apud* GONTIJO, F. C. M.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338-349. 2004.

PESSÔA, S.B; MARTINS, A.V; **Parasitologia Médica**. 11ª edição, Guanabara Koogan, 11ª edição, 1982.

PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A.M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.; GAMBARELLI, F.; FONTES, M.; DUMON, H.; QUILICI, M. Isolation and characterization of repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, p. 364-369, 1993.

PITTALIS, S.; NICASTRI, E.; SPINAZZOLA, F.; et al. *Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid-treated patients. **BMC Infect Dis**, v. 6, p.177, 2006.

PRADO, P.F.; ROCHA, M.F.; SOUSA, J.F.; CALDEIRA, D.I.; PAZ, G.F.; DIAS, E.S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 44(5), p.561-6, 2011.

PRINA, E.; ROUX, E.; MATTEI, D.; MILON, G. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v. 9, p.1307– 1315, 2007.

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

QUARESMA P.F. Diagnóstico Molecular da Leishmaniose Visceral Canina e Quantificação da Carga Parasitária Através da Reação em Cadeia da Polimerase. **Dissertação Mestrado** em Ciências da Saúde na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. MG, 2007.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.; FERREIRA, E.D.E, DA ROCHA-LIMA, A.C.; XAVIER, A.A.; GONTIJO, C.M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Trop**. V.111(3), p.289-94, 2009.

REBÊLO, J.M.M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão. **Cad Saúde Pública**, v.17, p.221-227, 2001.

RIERA, C.; FISA, R.; UDINA, M.; 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. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v.98, p.102–110, 2004.

RIERA, C.; FISA, R.; LOPEZ-CHEJADE, P.; SERRA, T.; GIRONA, E.; JIMENEZ, M.; MUNCUNILL, J.; SEDENO, M.; MASCARO, M.; UDINA, M.; GALLEGU, M.; CARRIO, J.; FORTEZA, A.; PORTUS, M. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). **Transfusion**, v. 48, n. 7, p. 1383-1389, 2008.

ROBERTS, M. T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br Med Bull**, v. 75-76, p. 115-130, 2005.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGU, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v.37, p.683–693, 2007.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4 (1), p. 584, 2010.

ROSENTHAL, P.J.; MARTY, P.P.A. *Leishmania* in bronchoalveolar lavage. **Ann Intern Med**, v.114, p. 1064-5, 1991.

SANTAREM, N.; SILVA, C.; Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 839-846, 2007.

SCARLATA, F.; VITALE, F.; et al. Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v.102, p.394–396, 2008.

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.47, p. 349-358, 2003.

SCHOONE, G.J.; HAILU, A.; KROON, C.C.; NIEUENHUYS, J.L.; SCHALLING, H.D.F.H.; OSKAM, L. A fast agglutination screening test (FAST) for detection of anti-*Leishmania* antibodies. **Trans R S Trop Med Hyg**, v. 95, p.400-401, 2001.

SCHUSTER, F.L.; SUKKIVAN, J.J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. **Clin Microbiol Rev**. v.15(3), p.374-89, 2002.

SELVAPANDIYAN, A.; DUNCAN, R.; MENDEZ, J.; KUMAR, R.; SALOTRA, P.; CARDO, L. J.; NAKHASI, H. L. A *Leishmania* minicircle DNA footprint assay for sensitive detection and rapid speciation of clinical isolates. **Transfusion**, v. 48, n. 9, p. 1787-1798, 2008.

SHARMA, M.C.; GUPTA, A.K.; DAS, V.N.; VERMA, N.; KUMAR, N.; SARAN, R.; KAR, S.K. *Leishmania donovani* in blood smears of asymptomatic persons. **Acta Trop.**, v.18, 76 (2), p.195-6, 2000.

SHARMA, R.; BAHL, L.; GOEL, A.; et al. Congenital kala-azar: a case report. **J Commun Dis.** v. 28, p.59–61, 1996.

SILVA, E.S.;GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil.**Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96(3), p. 285-91, 2001.

SILVA ,L.A.; ROMERO, H.D.; NASCENTES , G.A.N.; COSTA, R.T.; RODRIGUES , V.; PRATA, A. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in avisceral leishmaniasis-endemic area in Brazil.**Am. J. Trop. Med. Hyg.**,v.84(2), p. 261–266, 2011.

SILVA, M. A. L.; MEDEIROS, R. A.; FILHO, S. B.; MELO, L. F.; MEDEIROS, Z. Alvos moleculares e iniciadores estudados para o diagnóstico da LV humana.**Revista Eletrônica de Farmácia**,v.7 (3), p. 01-15, 2010.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.104, p.529–535, 2010.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v.123, p. 311-330, 2006.

SINGH, S.P.; PICADO, A.; BOELAERT, M.; et al. The epidemiology of *Leishmaniadonovani* infection in high transmission foci in India. **Trop Med Int Health**, v.15 (suppl 2), p. 12–20, 2010.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. **Rev Expert Rev Mol Diagn**, v. 5, p. 251-65, 2005.

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

SOUZA, A. Q. Leishmaniose cutânea no Ceará: Aspectos Históricos, Clínicos e evolução terapêutica. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 1–6, 2011.

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.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9, p. 951-958, 2002.

SUNDAR, S.; SAHU, M.; MEHTA, H.; et al. Noninvasive management of Indian visceral leshmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. **Clin Infect Dis**, v. 35, p.581–86, 2002.

TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 3, p. 657-667, 2003. TAVORA, E.R.; LASMAR, E.P.; OREFI, C.E. J.; GONTIJO, C.M.F.; ANDARDE FILHO, J.S. Unusual manifestation of leishmaniasis in renal transplant. **Transplant Proc**, v.34, p.502-03, 2001.

TOPNO, R.K.; DAS, V.N.; RANJAN, A.; PANDEY, K.; SINGH, D.; KUMAR, N.; SIDDIQUI, N.A.; SINGH, V.P.; KESARI, S.; KUMAR, N.; BIMAL, S.; KUMAR, A.J.; MEENA, C.; KUMAR, R.; DAS, P. Asymptomatic infection with visceral leishmaniasis in a disease-endemic area in bihar, India. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 83(3), p.502-6, 2010.

TORDINI, G.; PUTTINI, C.; ROSSETTI, B.; SAMMARRO, G.; FANETTI, A.; CIANCHINO, S.; VALORIANI, B.; FOSSOMBRONI, V.; CAMPOCCIA, G.; CAVION, M.A.; ZANELLI, G. *Leishmania infantum* e donatori di sangue: quale screening? **Le Infezioni in Medicina**, v.3, p. 152-156, 2011.

URIAS, E. V. R.; CARVALHO, S. F. G.; OLIVEIRA, C. L.; CARVALHO, M. L. M.; TELES, L. F.; RODRIGUES, M. C.; MAIA, C. N. Prevalence of adults infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* among blood donors of the Hemominas Foundation in Montes Claros, Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.31, n. 5, p. 1-7, 2009.

VAN EYS, G.J.; SCHOONE, G.J.; KROON, N.C.; EBELING, S.B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.51, p. 133-42, 1992.

VARELA, I.C.; LEN, O.; CASTELLS, L.; TALLADA, N.; RIBERA, E.; DOPAZO, C.; et al. Visceral Leishmaniasis among liver transplant recipients: An Overview. **Liver Transplantation**, v.14, p.1816-1819, 2008.

VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; FE FILHO, N.M.; QUEIROZ, R.G.; SANTANA, E.W.; BOZZA, M.; SALLENAVE, S.M.; VALIM, C.; DAVID, J.R.; LOPES, U.G. The identity of *Leishmania* isolate from sand flies and vertebrate host in a major focus of cutaneous leishmaniasis em Baturite, northeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 50, p. 158-164, 1994.

VEEKEN, H.; RITMEIJER, K.; SEAMAN, J.; DAVIDSON, R. Comparison of a rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. **Trop Med Int Health**, v. 8, p. 164-67, 2003.

VERGEL, C.; WALKER, J.; SARAVIA, N.G. Amplification of human DNA by primers targeted to leishmania kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.72, p.423-429, 2005.

VIANA, G.M.C.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; VIANA, M.G.C.; BURATTINI, M.M. Transmissão congênita do calazar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.34 (Suppl I), p. 247, 2001.

WEISSER, M.; KHANLARI, B.; TERRACCIANO, L.; et al. Visceral leishmaniasis: a threat to immunocompromised patients in non-endemic areas? **Clin Microbiol Infect**, v.13, p. 751-753, 2007.

WERNECK, G.L.; COSTA, C.H.; WALKER, A.M.; DAVID, J.R; WAND, M.; et al. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiol Infect**, v.135, p.195–201, 2007.

WERNECK, G.L.; RODRIGUES, L.; et al. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop.**, 83, 13–18, 2002.

WHO. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Technical Report Series 811, pp. 1-95. 1991

_____. Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26. 2010.

_____. The global burden of disease: 2004 update. Geneva, 2008.

_____. Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949, pp.1185.2010.

_____. Urbanization: an increasing risk factor for visceral leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record* 77: 365–370, 2002.

_____. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO reported on neglected tropical diseases, 92-93, 2010.

YADAV, T.P.; GUPTA, H.; SATTEYA, U.; KUMAR, R.; MITTAL, V. Congenital kalaazar. **Ann Trop Med Parasitol**. v. 83, p.535–537, 1989.

ZIJLSTRA, E. E.; ALI, M.S.; EL-HASSAN, A.M.; EL-TOUM, I.A.; SATTI, M.; GHALIB, H.W.; KAGER, P.A. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.86, p. 505–507, 1992.

APÊNDICE

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



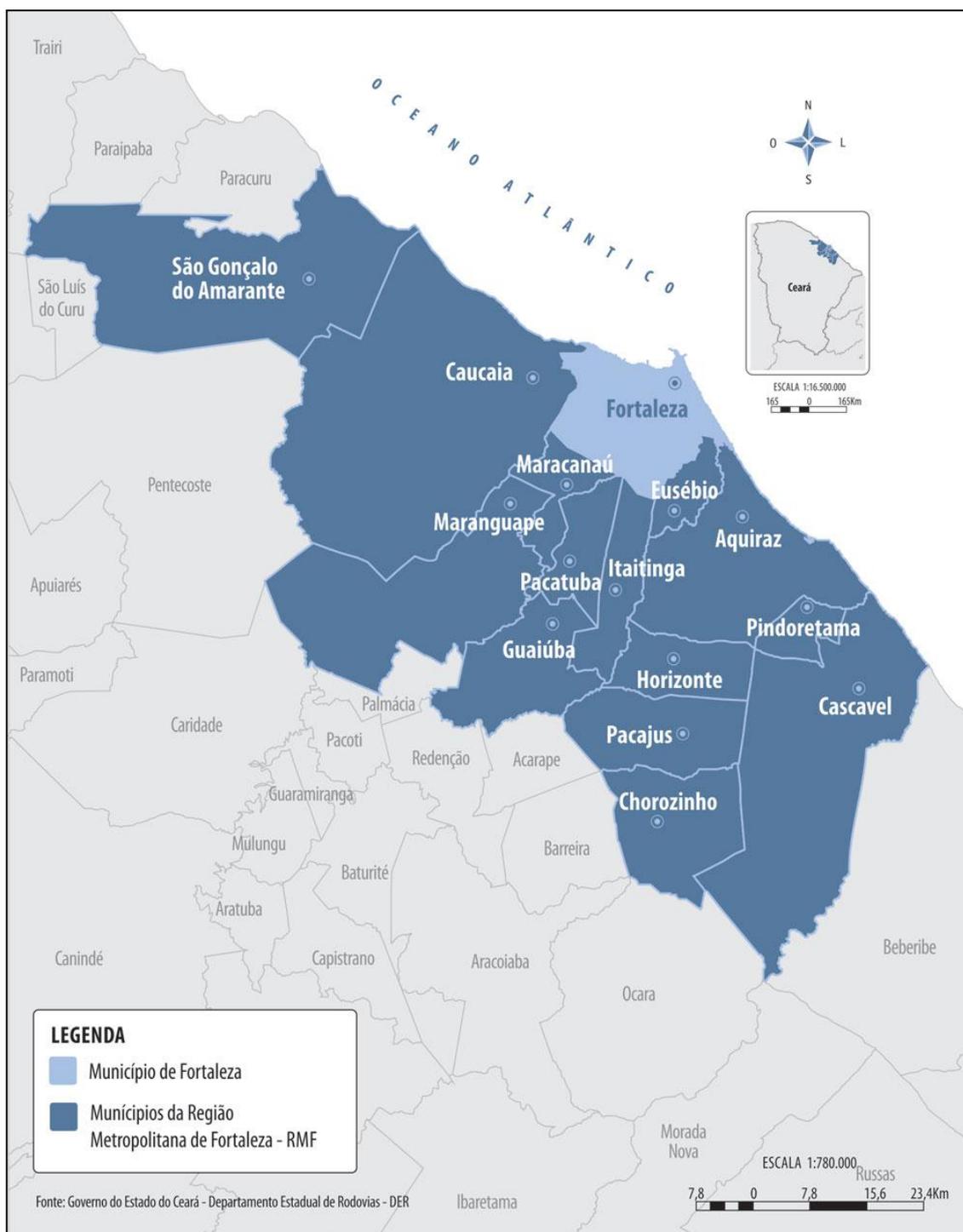
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença causada por um protozoário chamado *Leishmania chagasi* que infecta o ser humano pela picada de um inseto chamado flebótomo (mosquito palha). A doença causa febre, palidez, barriga grande, emagrecimento, cansaço, crescimento de fígado e baço e alterações do sangue como anemia, baixa de defesa do organismo e possibilidade de sangramentos. Há diferentes formas de apresentação da doença sendo, portanto necessária a identificação de algumas alterações no sangue que possam prever o desenvolvimento da forma grave da doença, fundamental para melhorar o tratamento e prevenir as mortes. O Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE em parceria com a Universidade Federal do Ceará estão realizando o projeto: **Avaliação do risco de transmissão de *Leishmania chagasi* por doadores de sangue com infecção assintomática, em áreas endêmicas para leishmaniose visceral no Ceará**, onde doadores de sangue estão sendo convidados a participar do estudo. Em caso do seu exame dar positivo para calazar, você será orientado e encaminhado para ser atendido pelo infectologista para o tratamento adequado da doença seguindo as orientações do Ministério da Saúde para o tratamento da doença. As informações ficarão em sigilo. O nome do paciente não será revelado. Eu, _____, declaro que é de livre e espontânea vontade que estou participando como voluntario desta pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

Fortaleza, _____ de _____ de _____.

Assinatura do doador

ANEXO B – MAPA DA REGIÃO METROPOLITANA DE FORTALEZA – CEARÁ



Fonte: <http://www.google.com/imgres?hl=ptBR&client=gmail&sa=X&tbo=d&rls=gm&biw=1920&bih=955&tbm=isch&tbnid=JVMSelZ7L3KfIM:&imgrefurl=http://marcelomeireles.opovo.com.br/a-cidade/mapa-da-regiao-metropolitana-defortaleza>, acessado em 29/11/2012.