



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**Aplicação de técnicas sorológicas e moleculares na detecção de Leishmania em doadores de sangue na cidade de Salvador, Bahia.**

**Kiyoshi Ferreira Fukutani**

**Salvador – Bahia**

**2011**



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**Aplicação de técnicas sorológicas e moleculares na detecção de Leishmania em doadores de sangue na cidade de Salvador, Bahia.**

Kiyoshi Ferreira Fukutani  
Orientador: Dra. Camila Indiani de Oliveira

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador – Bahia

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

F961a Fukutani, Kiyoshi Ferreira  
Aplicação de técnicas sorológicas e moleculares na detecção de Leishmania em  
doadores de sangue na cidade de Salvador, Bahia. [manuscrito] / Kiyoshi Ferreira  
Fukutani. - 2011.  
66 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Centro de  
Pesquisas**

**Gonçalo Moniz, 2011.**

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Camila Indiani de Oliveira, Laboratório de  
Imunoparasitologia.

1 Leishmania. 2. Banco de Sangue. 3. Leishmaniose. I.Título.

CDU 616.993.161

**Aplicação de técnicas sorológicas e moleculares na detecção de Leishmania em doadores de sangue na cidade de Salvador, Bahia.**

**Kiyoshi Ferreira Fukutani**

**FOLHA DE APROVAÇÃO  
COMISSÃO EXAMINADORA**

**Dr(a).**\_\_\_\_\_

**Dra. Marilda de Souza Gonçalves**

**Dr(a).**\_\_\_\_\_

**Dra. Cynara Gomes Barbosa**

**Dr(a).**\_\_\_\_\_

**Dra. Camila Indiani de Oliveira**

Dedico este trabalho à minha  
Família e a todas as pessoas que  
fazem, farão e fizeram parte da  
minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos membros da equipe:

Dra. Camila de Oliveira

Dra. Virginia Figueiredo

Dra. Aldina Barral

Dr. Manoel Barral

Juqueline Cristal

Fabiana Celes

Elze e Andrezza

Aos Colegas e Amigos:

Dirceu Costa e Maiana

Diego Moura e Márcia

Dra. Claudia Brodskyn

Ana Paula

Bruno Sangiorgio

Grupo Hamster “Natalia, Melissa, Robson e Larissa”

Grupo Camilux “Diego, Romulo, Fernanda e Sarah”

Adriano Martins e Tiago Ferreira Silva

Gilmar Ribeiro Junior e Jorge Lessa Tolentino

Pós Graduação “Todos”

“Eli, Tyta, Dieguinho, Ana Paula, Lari, Maria, Rach, Felipe, Vanessa, Nadja, Vitor e Léo”

Lucile, Marcos e Ricardo

Aos amigos do LIP/LIMI e demais conhecidos

Ao setor de coleta da HEMOBA/SESAB e a todos os doadores.

A Família:

Lizia, Yoshio, Kazuo e Yoshikazu

## ÍNDICE

<b>I.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
I.I Leishmanioses.....	17
I.II Leishmaniose visceral no Brasil.....	19
I.III Diagnostico da Leishmaniose.....	20
I.IV PCR.....	23
I.V Ciclo de vida da Leishmania, infecção clássica e infecção alternativa.....	24
<b>II. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
III.I Objetivo geral:.....	26
III.II Objetivos específicos:.....	26
<b>IV. DESENHO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>27</b>
IV.I Desenho Experimental 1.....	26
IV.II Desenho Experimental 2.....	26
<b>V. MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
V.I Delineamento do estudo.....	28
V.II Amostragem e cálculo amostral.....	28
V.III Coleta e fracionamento de amostras.....	28
V.IV Extração de DNA.....	29
V.V Cultivo de Leishmania, obtenção de SLA e do antígeno bruto de <i>T.cruzi</i> .....	29
V.VI ELISA.....	30
V.VII Curva padrão.....	30
V.VIII PCR em tempo real.....	31
V.IX PCR convencional.....	32
V.X Análise estatística.....	32
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
VI.I Caracterização da população estudada.....	33
VI.II Padronização do ELISA.....	34
VI.III Estabelecimento do ponto de corte empregando a curva ROC.....	35
VI.IV Comparação entre o SLA de <i>L. chagasi</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	36
VI.V Distribuição dos soros positivos para Leishmania.....	38
VI.VI Soro positividade anti Leishmania e reatividade cruzada com Chagas.....	39

VI.VII Padronização do PCR quantitativo .....	43
VI.VIII Detecção de Leishmania em amostras de doadores por PCR quantitativo.....	47
VI.IX PCR concencional utilizando kDNA, gene de cópia múltipla.....	48
<b>VII. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>VIII. CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>X. APÊNDICES .....</b>	<b>66</b>
X.I Apêndice 1 .....	66
X.II Apêndice 2 .....	67



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Mapa de Distribuição da leishmaniose visceral no mundo.** Em marrom observa-se a distribuição da leishmaniose visceral. Fonte: OMS, <http://www.who.int/leishmaniasis>, acessado em 7/12/2010.

**Figura 2. Mapa de distribuição da leishmaniose visceral no Brasil.** Fonte: SINAN-COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/MS (Brasil, 2006).

**Figura 3. Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil em 2010.** (Ministério da Saúde, 2010) (acessado: dia 20/01/2011 <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>).

**Figura 4. Ciclo biológico da *Leishmania* (REITHINGER *et al.*, 2007).**

**Figura 5. Teste do SLA de *Leishmania chagasi* e padronização da concentração do anticorpo de detecção.** Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 10 µg/ml de SLA e incubadas com os soros controle diluídos 1:100 e, em seguida, com diferentes concentrações do anticorpo de detecção (1:5000, 1:2500, 1:2000 e 1:1000). Os resultados estão representados pela mediana e intervalo interquartil, com tamanho amostral de n=20.

**Figura 6. Estabelecimento do ponto de corte através da curva ROC, utilizando o SLA de *Leishmania chagasi*.** Foram utilizados 20 soros verdadeiramente positivos e 20 soros verdadeiramente negativos, totalizando 40 soros, testados em duplicata. As D.Os. obtidas por meio do ELISA foram utilizadas para a construção da curva ROC. A linha pontilhada representa a linha de identidade e a área sob a linha contínua representa é igual a 0.99 AUC) (p<0.0001).

**Figura 7. Estabelecimento do ponto de corte através da curva ROC, utilizando o SLA de *Leishmania amazonensis*.** Foram utilizados 20 soros verdadeiramente positivos e 20 soros verdadeiramente negativos, totalizando 40 soros, testados em duplicata. As D.Os. obtidas por meio do ELISA foram utilizadas para a construção da curva ROC. A linha pontilhada representa a linha de identidade e a área sob a linha contínua representa equivale 0.97(AUC) (p<0.0001).

**Figura 8. Sobreposição da curva ROC obtida com o SLA de *L. chagasi* e com o SLA de *L. amazonensis*.** (A) As curvas foram geradas empregando o SLA derivado de cada espécie

em ensaios de ELISA, realizados com 20 soros verdadeiramente positivo e 20 soros verdadeiramente negativos. A área preenchida representa o incremento na área sob a curva dos resultados obtidos com SLA de *L. chagasi*. As amostras foram testadas em duplicata. (B) Informação detalhada obtida com cada curva ROC.

**Figura 9. Detecção de anticorpos anti\_Leishmania em doadores de sangue de Salvador.** As amostras (n=700) foram obtidas no HEMOBA/SESAB e foram testadas para reatividade contra SLA de *L. chagasi*. Como controle, foram utilizados soros positivos com baixa reatividade ao SLA (CTR+ baixo) e com alta positividade ao SLA (CTR+ alto). Os controles negativos consistiram de amostras de indivíduos de área não endêmica. Todas as amostras foram testadas em duplicata e o ponto de corte (*cut-off*) equivale a 0.01685.

**Figura 10. Mapa com a localização dos doadores soro positivo para Leishmania. A.** Mapa com menor aumento visualizando todos os doadores, inclusive os não residentes da região metropolitana de Salvador. **B.** Mapa da cidade de Salvador visualizando os soros positivos da cidade de Salvador. Estrelas representam o local de residência dos doadores

**Figura 11. Sorologia do HEMOBA/SESAB.** Resultado dos exames sorológicos de todos os doadores incluídos no trabalho, coletados durante o período de 12/01/2010 a 31/07/2010, n= 700.

**Figura 12. Estabelecimento do ponto de corte através da curva ROC, utilizando o antígeno bruto de *T. cruzi*.** Foram utilizados 20 soros verdadeiramente positivos e 20 soros verdadeiramente negativos, totalizando 40 soros, testados em duplicata. As D.Os. obtidas por meio do ELISA foram utilizadas para a construção da curva ROC. A linha pontilhada representa a linha de identidade e a área sob a curva continua é equivalente 0.98 (AUC) (<0.0001).

**Figura 13. Detecção de anticorpos anti\_Chagas em doadores de sangue com sorologia positiva para Leishmania.** As amostras (n=38) foram obtidas no HEMBOA e foram testadas para reatividade contra SLA de *T. cruzi*. Como controle, foram utilizados soros de pacientes com doença de Chaga (CTR+) e controles negativos (amostras de indivíduos de área não endêmica). Todas as reações foram realizadas em duplicata e o ponto de corte selecionado (*cut-off*) foi 0.07175.

**Figura 14. Determinação da concentração de iniciadores a ser utilizada na amplificação por PCR em tempo real.** A reação de PCR foi realizada com diferentes concentrações de iniciadores (0.1 $\mu$ M a 0.6 $\mu$ M, representadas pelas linhas coloridas) e com DNA de *Leishmania* equivalente a 10<sup>4</sup> parasitas. As amostras foram testadas em duplicata.

**Figura 15. Curva de dissociação utilizando diferentes concentrações de iniciadores.** Os produtos de amplificação gerados pela reação de PCR com diferentes quantidades de iniciadores foram analisados quanto à sua especificidade. As linhas coloridas mostram o produto único gerado, decorrente da dissipação da fluorescência incorporada após o aumento gradual da temperatura.

**Figura 16. Curva padrão para a quantificação de *Leishmania* por PCR em tempo real.** **A.** A reação de PCR foi realizada com iniciadores na concentração de 0.2 $\mu$ M e 10 $\mu$ l de DNA, equivalendo a diferentes concentrações de parasita (linhas coloridas). **B.** A curva apresentou o *slope* de -3.204,  $r^2=0.993$  e 105% de eficiência. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

**Figura 17. Curva padrão para a quantificação de *Leishmania*, empregando diferentes combinações de amostra de DNA.** **A.** A reação de PCR foi realizada com iniciadores na concentração de 0.2 $\mu$ M e 10 $\mu$ l de DNA, equivalendo a diferentes concentrações de parasita (linhas coloridas). **A.** Curva obtida a partir da extração de DNA da cultura de *Leishmania*, apresentou *slope* de -3.024,  $R^2$  de 0.99 e eficiência de 114%. **B.** Curva obtida a partir da extração conjunta de DNA de sangue humano e de *Leishmania*, apresentou *slope* de -3.206,  $R^2$  de 0.97 e eficiência de 105%. **C.** Curva de DNA de parasita acrescentada de DNA humano (*spiking*), *slope* de -2.800,  $R^2$  de 0.98 e eficiência de 120%. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

**Figura 18. Curva padrão para a quantificação de *Leishmania*, empregando concentrações diferentes de parasita (10<sup>6</sup> - 10)** A reação de PCR foi realizada com iniciadores na concentração de 0.2 $\mu$ M e 10 $\mu$ l de DNA, equivalendo a diferentes concentrações de parasita: 10<sup>6</sup> (vermelha), 10<sup>5</sup> (laranja), 10<sup>4</sup> (verde claro), 10<sup>3</sup> (verde escuro), 10<sup>2</sup> (azul claro), 10<sup>1</sup> (azul escuro). Todas as amostras foram testadas em duplicata.

**Figura 19. Amplificação por PCR convencional para detecção de parasita em doadores de sangue som sorologia positiva para *Leishmania*.** MW, 100pb, 1, Controle negativo e 2,

controle positivo, 3-40, amostras soro-positivas.

**Figura 20. Comparação entre as D.Os. dos doadores de sangue cujo PCR foi positivo ou negativo para Leishmania.** Os resultados das D.Os. obtidas no ELISA foram comparados com o resultado do PCR convencional, positivo ou negativo (n=38). Os resultados estão mostrados pela mediana e os intervalos interquartil.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Dados demográficos dos doadores de sangue no período de 12/01/2010 a 31/07/2010, HEMOBA/SESAB/Salvador/BA.

**Tabela 2.** Comparação dos resultados da sorologia dos 38 doadores soros positivos para Leishmania com a sorologia para outros patógenos, realizada no HEMOBA/SESAB.

## LISTA DE SIGLAS

*CUT-OFF* – Ponto de Corte

D.O. – Densidade Óptica

ELISA – Ensaio imunoenzimático

G6PD - Glicose-6-fosfate desidrogenase

GP63 - *promastigote surface protease 63*

HEMOBA/SESAB – Fundação Hematologia e Hemoterapia da secretaria de saúde do estado da Bahia

IgG – Imunoglobulina G

LSH – Leishmania

kDNA – DNA do cinetoplasto

PBS – Tampão Fosfato Salina

PCR – Reação de polimerase em cadeia

RIFI – Reação de Imunofluorescencia Indireta

ROC - *Receiver Operator Curve I* (Característica Operatória do Receptor)

SLA – Antígeno Solúvel de Leishmania

SSU-rRNA - subunidade menor do ribossomo

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## **LISTA DE APÊNDICES**

1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
2. Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa.

## RESUMO

**Aplicação do Exame sorológico (ELISA) e do PCR na detecção de *Leishmania chagasi* em doadores de sangue na cidade de Salvador.** A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e constitui um problema grave de saúde pública na Bahia. A transmissão do protozoário pela transfusão de sangue já foi relatada e existe a possibilidade dos hemoderivados serem um potencial risco para a manutenção da doença. O presente trabalho teve como objetivo avaliar positividade sorológica contra *Leishmania* e a presença deste parasita no sangue periférico de doadores, na cidade de Salvador, BA. Para estipulando a soroprevalência de leishmaniose em doadores de sangue, foram coletadas amostras de sangue periférico de 700 indivíduos, no Hemocentro da Bahia (HEMOBA/SESAB), de janeiro a setembro de 2010. As amostras foram processadas para a obtenção de plasma e de DNA. A sorologia anti-*Leishmania* foi feita por ELISA, empregando antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* (SLA). A presença de parasitas foi determinada por PCR qualitativo e por PCR quantitativo (qPCR). A população amostral foi composta por 74.5% de indivíduos masculinos, com média de idade de 34 anos. A partir de uma curva ROC, empregando soros de pacientes com leishmaniose visceral e soros de pacientes residentes em área não endêmica, o ponto de corte para o teste sorológico foi estabelecido em 0,0167 (DO em 405nm). A sorologia anti-*Leishmania* foi positiva em 5.4% (38/700) das amostras. Destes indivíduos, 73% (28/38) apresentaram amplificação para uma região repetitiva do genoma de *Leishmania*, empregando-se o PCR qualitativo. Empregando o qPCR, foi possível determinar a presença de parasitas em 0.4% (3/700) amostras e, nestas, a quantificação foi inferior a 10 parasitas. Nossos resultados mostram a prevalência de sorologia anti-*Leishmania* é de 5.4%, em doadores do HEMOBA/SESAB, similar ao encontrado em outras área onde ocorre a leishmania.

Palavras Chaves: *Leishmania*, banco de sangue, leishmaniose.



## ABSTRACT

**Application of serological examination (ELISA) and PCR detection of *Leishmania chagasi* infection in blood donors in Salvador.** Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is a serious public health problem in Bahia. The transmission of the parasite by blood transfusion has been reported and the possibility of blood products being a potential risk for disease transmission currently exists. This study aimed to evaluate seropositivity against *Leishmania* and the presence of parasites in peripheral blood from blood donors in Salvador, Bahia. To assess the prevalence of anti-*Leishmania* antibodies in blood donors, we collected peripheral blood samples from 700 individuals in the Blood Bank of Bahia (HEMOBA/SESAB), from January to September 2010. The samples were processed to obtain plasma and DNA. The anti-*Leishmania* serology was performed by ELISA employing *Leishmania chagasi* soluble antigen (SLA). The presence of parasites was determined by qualitative PCR and quantitative PCR (qPCR). The sample population comprised 74.5% of males with a mean age of 34 years. From a ROC curve, using sera from patients with visceral leishmaniasis and sera from patients residing in non-endemic areas, the cutoff for the serologic test was set at 0.0167 (OD at 405nm). The anti-*Leishmania* serology was positive in 5.4% (38/700) samples. Of these, 73% (28/38) showed amplification of a repetitive region of the genome of *Leishmania*, using the qualitative PCR. Using the qPCR, we determined the presence of parasites in 0.4% (3 / 700) samples, and in these, the amount was less than 10 parasites. Our results show the prevalence of anti-*Leishmania* serology is 5.4% in donors, similar to that found in other areas where *Leishmania* is.

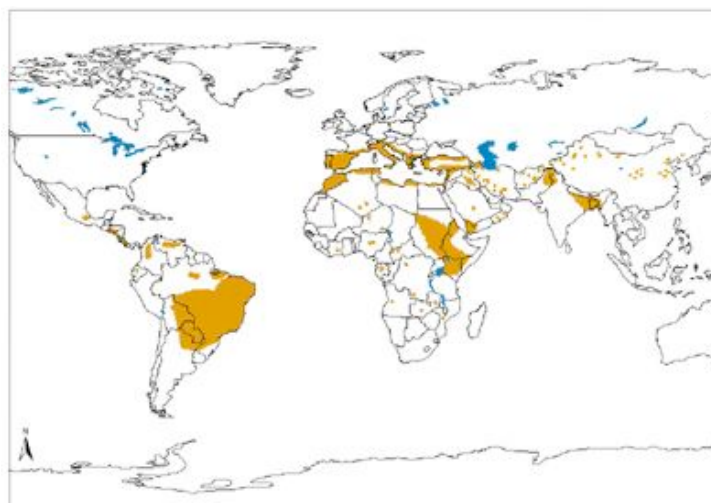
Keywords: *Leishmania*, Blood Supply, Leishmaniasis.

## I. INTRODUÇÃO

### I.I. Leishmaniose

A leishmaniose é causada por protozoários unicelulares, do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. O gênero *Leishmania* pode ser dividido em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania*, que engloba o complexo *Leishmania donovani* e o complexo *Leishmania mexicana*, e o subgênero *Viannia*, que engloba apenas o complexo *Leishmania braziliensis*. Estes protozoários são parasitos digenéticos (heteroxenos), encontrados nas formas: promastigotas, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e amastigotas, em células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (GRIMALDI & TESH, 1993).

A leishmaniose constitui um crescente problema de saúde pública, não somente no Brasil, onde é considerada uma das endemias de interesse prioritário (COSTA, 2005). De fato, a leishmaniose afeta cerca de 12 a 15 milhões de indivíduos em todo o mundo, principalmente aqueles residentes em áreas tropicais e subtropicais do planeta (OMS, 2010): é endêmica em 88 países abrangendo a América do sul, a África, a Europa e a Ásia (Figura 1) e é considerada a segunda doença mais importante causada por protozoários (OMS, 2010).



**Figura 1. Mapa de Distribuição da leishmaniose visceral no mundo.** Em marrom observa-se a distribuição da leishmaniose visceral. Fonte: OMS, <http://www.who.int/leishmaniasis>, realizado em 7/12/2010.

A leishmaniose apresenta um amplo espectro de formas clínicas, que variam desde uma infecção assintomática até a forma tegumentar (cutânea e/ou mucosa) ou visceral

(ROBERTS, 2005). As manifestações clínicas da leishmaniose dependem de interações complexas que abrangem o parasita e o hospedeiro, tais como: a espécie de *Leishmania*, sua capacidade infectiva e até o estado imunológico e nutricional do hospedeiro (PEARSON & SOUSA, 1996). A leishmaniose tegumentar apresenta duas manifestações clínicas clássicas: A leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM). A LCL é caracterizada por lesões isoladas no local da picada do inseto vetor e pela formação de úlceras com fundo necrótico e bordas elevadas. Alguns casos evoluem para a cura espontânea, porém, a maioria dos casos requer tratamento com drogas leishmanicidas.

A droga de primeira escolha recomendado pelo ministério da saúde é o antimônio tetra valente e a droga de segunda escolha é a anfotericina B, em ambas as drogas existe uma toxicidade elevada e devem ser ministradas sobre observação medica (COSTA *et al.*, 1990; MARSDEN *et al.*, 1984). Os Pacientes com LCL apresentam reação positiva ao teste cutâneo com antígeno de *Leishmania* (Teste de Montenegro), indicando que há uma resposta imune celular contra o parasita (CASTES *et al.*, 1983; SARAVIA *et al.*, 1989). A leishmaniose cutâneo-mucosa se caracteriza por lesões mucosas agressivas, levando à destruição de tecido epitelial principalmente das narinas e da cavidade oral (OMS, 2010).

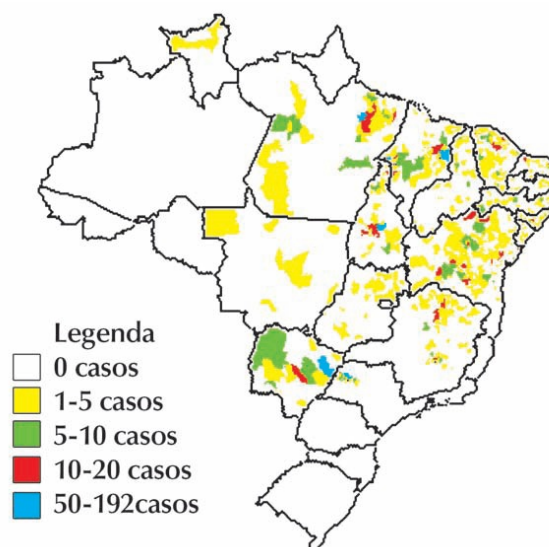
A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença, apresentando índices altos de letalidade quando não tratada adequadamente (COSTA, 2005). O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias presentes nas áreas onde incide a LV, como, por exemplo: doença de Chagas, malária, esquistossomose, febre tifóide e tuberculose. Os Pacientes com LV podem apresentar febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia. O diagnóstico rápido nos casos humanos é realizado rotineiramente com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. Entretanto, um diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasita por métodos parasitológicos (GONTIJO; MELO, 2004).

A forma assintomática da leishmaniose visceral é conhecida por não apresentar qualquer tipo de sinal clínico e só é reconhecida pelo exame sorológico positivo, sendo estes indivíduos portadores de uma carga parasitária baixa (8 parasitas por mL de sangue) (MARY *et al.*, 2004; SELVAPANDIYAN *et al.*, 2008). A forma assintomática no Brasil é descrita como uma forma que pode ser detectável por PCR, pela sorologia e comumente não evolui para doença (MORENO *et al.*, 2006). Um estudo em Natal, realizado em crianças entre 0-5 anos com suspeita de leishmaniose, classificou as formas clínicas da LV em: sintomática, oligossintomática, subclínica e assintomática. Esta última foi detectada em pelo menos 18%

dos indivíduos e só foi identificada por meio do ELISA positivo (GAMA *et al.*, 2004). Em outra área endêmica localizada em Teresina, no Piauí, 71% da população foi classificada como assintomática pelo Teste de Montenegro (COSTA *et al.*, 2002).

## I.II. Leishmaniose visceral no Brasil

O Brasil está entre os cinco países com número maior de casos de LV, com destaque para as regiões norte, centro-oeste e nordeste (Figura 2).



**Figura 2. Mapa de distribuição da leishmaniose visceral no Brasil.** Fonte: SINAN-COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/MS (Brasil, 2006).

A LV é encontrada em quatro das cinco regiões brasileiras, sendo a região nordeste a mais atingida, com aproximadamente 70% dos casos em 2006 (VIEIRA *et al.*, 2007). Em 25 anos de notificação (1980-2005), os casos de LV somaram 60.969 e os estados do nordeste apresentaram o maior número de casos, liderando com a Bahia (32,5 %) seguida pelo Maranhão (16,9%), Ceará (14,1%) e Piauí (14%). Nestes estados, o coeficiente de incidência da doença atingiu 20,4 casos /100.000 habitantes (VIEIRA *et al.*, 2007).

No ano de 2010, os casos de LV notificados somaram 1.630 no Brasil e os estados do nordeste apresentaram o maior número de casos (50%), liderando com o Ceará (274 casos) seguido pela Bahia (188 casos), Maranhão (137 casos) e Paraíba (64 casos) (Figura 3).

LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net																
Casos confirmados por UF Notificação segundo Ano Notificação																
Período: 2010																
Ano Notificação	AM	RR	PA	PI	CE	RN	PB	PE	AL	SE	BA	S	MT	GO	DF	Total
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>64</b>									<b>08</b>	<b>33</b>	<b>14</b>	<b>26</b>	<b>1.630</b>
2010	1	7	64	<b>20</b>	<b>274</b>	<b>42</b>	<b>18</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>41</b>	<b>188</b>	08	33	14	26	1.630
				<b>20</b>	<b>274</b>	<b>42</b>	<b>18</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>41</b>	<b>188</b>					

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

Notas:

- 1) Excluídos casos não residentes no Brasil.
- 2) Períodos Disponíveis ou período - Correspondem aos anos de notificação dos casos.
- 3) Excluídas duplicidades de dados de 2007, 2008 e 2009.
- 4) Para tabular dados epidemiológicos de um determinado ano selecione na linha a variável de interesse, na Coluna Ano dos 1ºs sintomas; em Períodos Disponíveis assinale o ano inicial da série e todos os posteriores até o ano atual (p/ incluir casos notificados com atraso) e em Seleções Disponíveis assinale os anos dos 1ºs sintomas (ex: nº de casos com início de sintomas 2007; selecione na linha UF de residência, na Coluna Ano de 1ºs sintomas, em Períodos disponíveis 2007 até o ano atual e em Seleções assinale Ano de 1ºs sintomas 2007).
- 5) Para cálculo da incidência utilize locais de residência.
- 6) Dados validados pela Gerência Técnica de Leishmanioses/CGDT/DEVEP/SVS/MS.
- 7) Dados de 2008 atualizados em 25/03/2010.
- 8) Dados de 2009 atualizados em 20/08/2010, sujeitos à revisão.
- 9) Dados de 2010 atualizados em 20/08/2010, dados parciais.

**Figura 3. Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil em 2010.** Destacando-se a região do Nordeste (Ministério da Saúde, 2010) (acessado: dia 20/01/2011 <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>).

Nos últimos anos (2006-2009), tem-se constatado o crescimento no número de casos de leishmaniose, especialmente na região Nordeste, onde os determinantes sócio-econômicos favorecem a expansão da doença. Provavelmente, as estratégias de prevenção não têm sido suficientes para o controle desta endemia, uma vez que as diferentes formas clínicas da leishmaniose e as mudanças constantes dos seus padrões epidemiológicos dificultam as ações de controle (GAMA *et al.*, 2004).

### I.III. Diagnóstico da leishmaniose

O diagnóstico por meio da demonstração do parasito pode ser feito em material de biópsia ou em punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodo. O material é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, para o isolamento em meio de cultura ou para a inoculação em animais de laboratório (CARDO, 2006b; VIEIRA *et al.*, 2007). Estes métodos apresentam alta especificidade, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido (GONTIJO & MELO, 2004). As punções esplênicas e de medula óssea são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala. Os testes sorológicos apresentam limitações, podem permanecer positivos durante longo tempo após o tratamento e podem apresentar reações cruzadas com outras doenças (MORENO *et al.*, 2006). No Brasil, os testes mais utilizados no

diagnóstico de LV humana e canina são o RIFI (reação de imunofluorescência indireta) e a ELISA (Ensaio imunoenzimático), sendo considerado, sobretudo este último como o teste de escolha para inquéritos populacionais. Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar. Isto dificulta a interpretação dos dados epidemiológicos, pois no Brasil ocorre superposição da LV com a leishmaniose tegumentar e a doença de Chagas (GONTIJO & MELO, 2004; MORENO *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2007).

A partir da década de 80, as técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitos do gênero *Leishmania*, sem necessidade de isolamento do parasita em cultura. Métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a PCR, para detecção de DNA, estão disponíveis para identificação do parasito. Diferentes tipos de amostras biológicas tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, amostras de cultura e sangue coletado em papel-filtro podem ser utilizados como fonte de material para as reações (GONTIJO & MELO, 2004). Esta técnica tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2008; TUPPERWAR *et al.*, 2008). Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania*, a PCR é mais usada em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina (GONTIJO & MELO, 2004).

#### **I.IV. PCR**

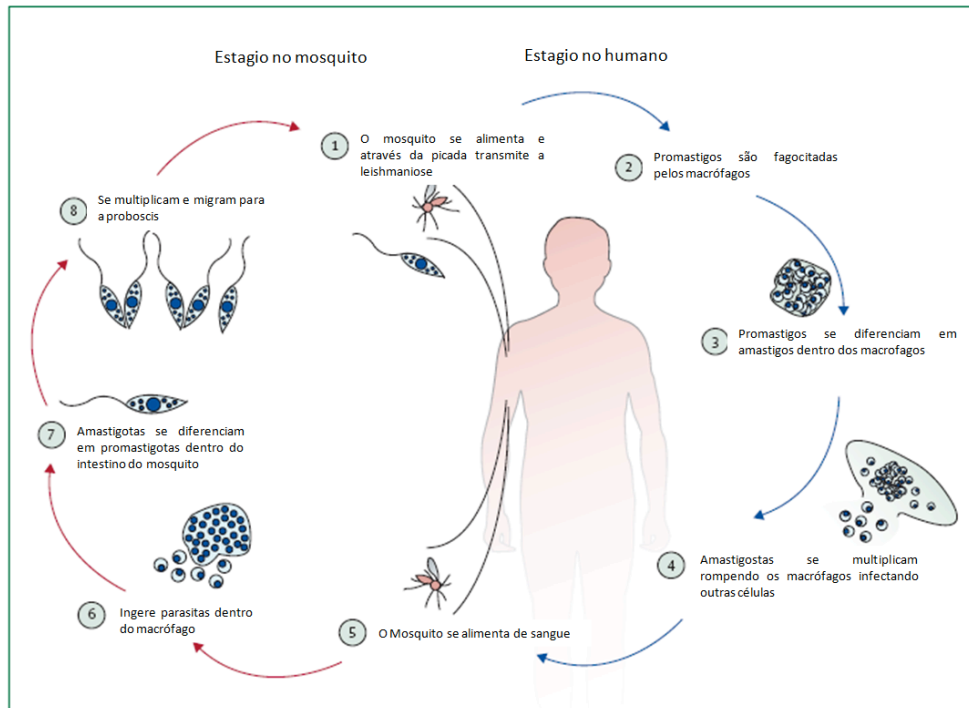
Com o avanço do diagnóstico molecular e com a possibilidade de utilização de diversos tipos de tecidos tais como: biópsias de pele, aspirado de medula óssea, aspirados de linfonodo e sangue periférico, a PCR se tornou um método de escolha na identificação molecular do parasita e no diagnóstico da LV nos laboratórios de pesquisa (GONTIJO & MELO, 2004). A sua sensibilidade pode variar a depender do alvo utilizado como, por exemplo, G6PDH (CASTILHO *et al.*, 2003), DNA Polimerase (BRETAGNE *et al.*, 2001), cisteína proteinase (QUISPE-TINTAYA *et al.*, 2005) ou genes de cópias múltiplas como GP63 (YAO *et al.*, 2003), SSU-rRNA (WORTMANN *et al.*, 2001) e kDNA (MARY *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005; MARY *et al.*, 2004). Em ambas as abordagens ocorre a amplificação do material genético da *Leishmania*, determinando assim a sua presença. Para o diagnóstico da LV, a PCR convencional do aspirado da medula óssea e do linfonodo, utilizando o kDNA (gene de cópias múltiplas), tem demonstrado uma sensibilidade elevada,

por volta de 90% a 100%. No entanto, a utilização de sangue periférico como material inicial diminui esta sensibilidade para 70%-90% (SCHALLIG & OSKAM, 2002).

Com os avanços das técnicas de PCR atualmente é possível acompanhar a amplificação do material genético em tempo real, através do aumento do sinal de fluorescência gerado quando o DNA é sintetizado (HIGUCHI *et al.*, 1992). Este método de detecção possibilita a quantificação do número de moléculas de DNA, a partir de uma concentração de DNA inicial conhecido. A PCR em tempo real ou PCR quantitativo é uma técnica de PCR mais sensível do que o PCR convencional, pois reconhece a variação de fluorescência de uma determinada amostra. Esta técnica é comumente utilizada na quantificação de DNA e na análise da expressão gênica. Diversos autores publicaram protocolos para a aplicação do PCR em tempo real na quantificação de *Leishmania* (CASTILHO *et al.*, 2003; MARY *et al.*, 2004; SCHULZ *et al.*, 2003), tanto para o acompanhamento da doença como para avaliar a eficácia do tratamento (TUPPERWAR *et al.*, 2008). A dificuldade atual é a possibilidade de contaminação e a quantificação de poucos parasitas. No entanto, é um excelente método para condições experimentais e o acompanhamento da fase crônica da doença (MARY *et al.*, 2004). Deve-se levar em consideração também a escolha do gene alvo, o qual pode ser de cópia única ou um gene de cópias múltiplas, como colocado acima.

#### **I.V. Ciclo de vida da *Leishmania*, transmissão natural e transmissão não natural**

A transmissão do parasita é classicamente descrita quando a *Leishmania* é inoculada (forma promastigota metacíclica) pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo (Figura 4). Uma vez inoculadas na derme, as promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas e estas, por sua vez, infectam macrófagos. Já no interior dos macrófagos o parasito torna-se capaz de desenvolver-se e multiplicar-se, por divisão binária. Após sucessivas multiplicações, o macrófago rompe-se e as amastigotas liberadas são fagocitadas por outras células hospedeiras, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado.



**Figura 4. Ciclo biológico da *Leishmania* (REITHINGER *et al.*, 2007).**

Porém, atualmente já são conhecidos outros métodos de transmissão como, por exemplo: o compartilhamento de seringas entre os usuários de drogas (CRUZ *et al.*, 2002), pela transfusão de sangue e de hemoderivados (CARDO, 2006a; RIERA *et al.*, 2008) e em transplante de órgãos (BASSET *et al.*, 2005; COHEN *et al.*, 1991; CUMMINS *et al.*, 1995; MPAKA *et al.*, 2009). A circulação do parasito em sangue periférico já foi documentada em indivíduos assintomáticos (GUEVARA *et al.*, 1993) e a transmissão da LV a partir da transfusão de sangue contaminado tem sido relatada em países com prevalência elevada da infecção (DEY & SINGH, 2006; SINGH *et al.*, 1996).

Observou-se em uma área endêmica da França, 13% pessoas apresentam sorologia positiva para *Leishmania* e quatro destas apresentaram PCR positivo (LE FICHOUX *et al.*, 1999). Na Espanha, observou-se soroprevalência de 3.1% em doadores de sangue assintomáticos, por *Western blot* com o SLA de *L infantum* (RIERA *et al.*, 2008). Em trabalhos realizados aqui no Brasil, observou-se que, no Rio Grande do Norte, 9% da população doadora de sangue apresentam anticorpo anti-*Leishmania*, detectado pelo FML-ELISA (LUZ *et al.*, 1997; OTERO *et al.*, 2000), que consiste em um ELISA utilizando a fucose manose ligante, e 22% dos pacientes que fazem hemodiálise também apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* na cidade de Natal, detectados pelo RIFI (SOUZA *et al.*, 2009). Os parasitas que se encontram no sangue, no interior de monócitos infectados, ou como amastigotos liberados de macrófagos infectados podem causar uma infecção silenciosa e pode ser transmitidos entre os doadores de sangue (DEY & SINGH, 2006; RIERA *et al.*, 2008).



## II. JUSTIFICATIVA

Já foi demonstrado que a PCR é capaz de detectar a presença do DNA de *Leishmania* em indivíduos assintomáticos, residentes em uma área endêmica, positivos para o teste de Montenegro (DE OLIVEIRA CAMERA *et al.*, 2006; SCARLATA *et al.*, 2008a; SCARLATA *et al.*, 2008b; SOUZA *et al.*, 2009). No presente momento, não é feita a triagem sorológica em doadores de sangue no Brasil e o anticorpo anti-*Leishmania* possui circulação desconhecida no nosso meio. Sua ocorrência apresenta um aumento nos centros urbanos (SOUZA *et al.*, 2009) e sabe-se que as condições de armazenamento dos hemoderivados permitem a sobrevivência e manutenção da infectividade da *Leishmania* (Estudos experimentais demonstraram que a *Leishmania* consegue resistir no interior de macrófagos por até 30 dias, em sangue conservado a 4°C (DEY & SINGH, 2006; GROGL *et al.*, 1993; SINGH *et al.*, 1996)). Assim, existe a possibilidade dos hemoderivados serem um potencial risco para a transmissão da *Leishmania* (SHULMAN, 1994).

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.I. Geral:**

Avaliar a prevalência de leishmaniose em doadores de sangue assintomáticos na cidade de Salvador.

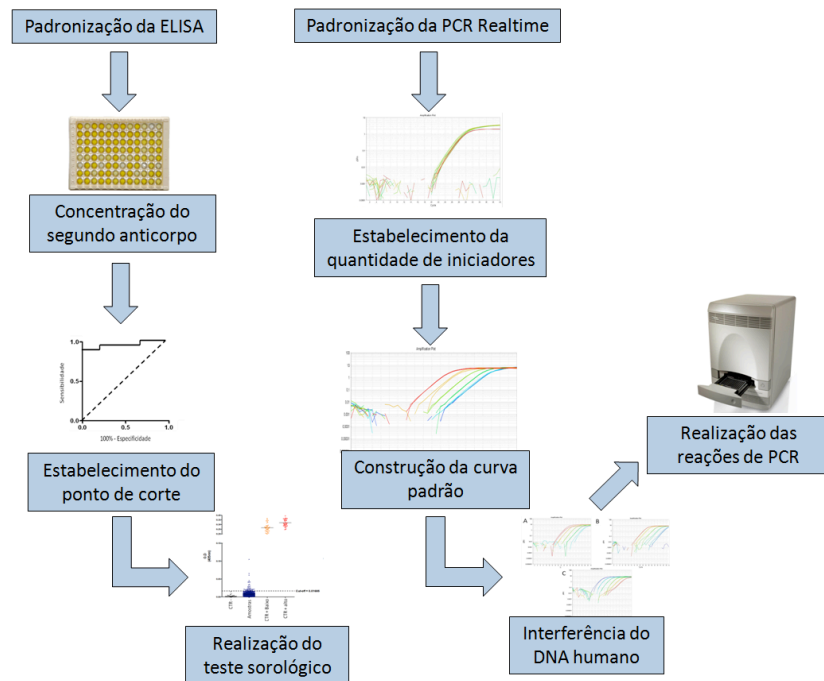
#### **III.II. Específicos:**

1. Validar um teste sorológico para detecção do anticorpo anti-Leishmania;
2. Determinar a presença de sorologia anti-Leishmania em doadores de sangue;
3. Avaliar a presença de DNA do parasita em doadores de sangue.

## IV. DESENHO EXPERIMENTAL

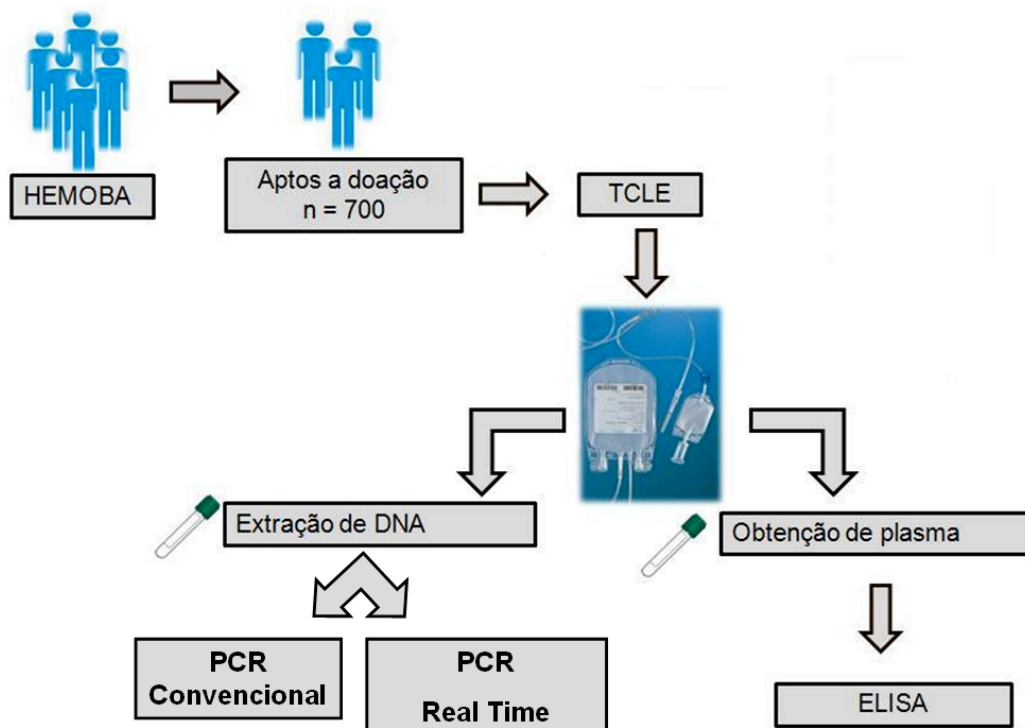
### IV.I Desenho experimental 1.

#### Padronização ELISA e PCR



### IV.II Desenho experimental 2.

#### Coleta de amostras e experimentos



## **V. MATERIAL E MÉTODOS**

### **V.I. DELINEAMENTO DO ESTUDO**

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

### **V.II. CASUÍSTICA**

A casuística foi composta por doadores voluntários de sangue, adultos, recebidos na HEMOBA/SESAB. Estimando-se prevalência de 13% (OTERO *et al.* 2000), com um intervalo de confiança de 99%, o tamanho amostral foi calculado em pelo menos 664 doadores, levando-se em conta a população doadora de sangue no estado da Bahia, a qual equivale a 1% da população do estado. Como critérios de inclusão no estudo foram considerados a aptidão para a doação voluntária de sangue e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Como critérios de exclusão foram considerados a não aplicação às exigências acima e/ou a não assinatura do TCLE. O trabalho foi desenvolvido sob os critérios da Regulamentação da Bioética no Brasil, Resolução 196/96 de 10 de Outubro de 1996 e resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde, o qual determina as diretrizes a serem adotadas nas pesquisas que envolvem seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA (Parecer N° 215/2010; Protocolo: 322; Título: Pesquisa de prevalência de leishmaniose em doadores de sangue assintomáticos na cidade de Salvador (Apêndice 2), sob responsabilidade da Dr<sup>a</sup> Camila Indiani de Oliveira

### **V.III. COLETA E FRACIONAMENTO DAS AMOSTRAS**

Foram coletadas alíquotas de 5ml de sangue periférico, em tubos do tipo *vacutainer* com anticoagulante EDTA. A coleta de sangue no HEMOBA/SESAB é feita por punção venosa em bolsas de doação de sangue com anticoagulante CPD (citrato, fosfato e dextrose) ou CPD-SAG-M (salina, adenina, glicose e manitol), estas bolsas possuem capacidade para 450 mL de sangue com variação de mais ou menos 45 mL. As amostras coletadas neste trabalho foram provenientes das bolsas de triagem, anexadas às bolsas de coleta, de onde são retiradas amostras para os exames sorológicos de rotina, realizados pelo HEMOBA/SESAB. A coleta das amostras ocorreram no período de 12/01/2010 a 30/07/2010m cerca de 12 amostras foram coletados por dia, totalizando 700 amostras. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ), onde foram separadas em dois tubos do tipo *ependorf* de 1.5 mL: um

tubo contendo 200µl de sangue foi utilizado para a extração de DNA e o segundo tubo contendo 1.5mL de sangue foi utilizado para a obtenção do plasma. O plasma foi obtido por centrifugação a 405 x g por 10 minutos e as amostras foram armazenadas em banco de material biológico, a -20°C, sob responsabilidade da Dra. Camila Indiani de Oliveira. As amostras foram mantidas de acordo com os critérios na resolução CNS 347/2005, etiquetadas com código numérico, garantindo o sigilo e a confidencialidade dos doadores.

#### **V.IV. EXTRAÇÃO DE DNA**

Para a extração de DNA, utilizou-se o Kit *Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit*<sup>TM</sup> (GE Healthcare - EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA foi eluído em 100µL de água estéril livre de contaminantes e ácidos nucléicos, logo em seguida quantificamos as amostras em espectrofotômetro (NANODROP, ND-2000) (Thermocientific). A pureza do DNA foi avaliada por meio da razão do comprimento de onda de 260/230nm e 260/280nm, considerando-se adequada a amostra cuja razão foi maior ou igual a 1.7. As amostras de DNA foram armazenadas em banco de material biológico, a -20°C, sob responsabilidade da Dra. Camila Indiani de Oliveira. As amostras estão mantidas de acordo com os critérios da resolução CNS 347/2005, etiquetadas com código numérico, garantindo o sigilo e a confidencialidade dos doadores.

#### **V.V. CULTIVO DE LEISHMANIA, OBTENÇÃO DO SLA E DO ANTIGENO BRUTO DE *T. cruzi*.**

As cepas de Leishmania utilizadas foram *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/00/BA262) e *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1985/BA32). Os parasitas foram cultivados a 26°C, em meio Schneider, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina e estreptomicina. Para a obtenção do antígeno solúvel de Leishmania (SLA), a cultura de parasitas, em fase estacionária, foi centrifugada para a obtenção de um precipitado (equivalente a 15mL em um tubo de 50mL). O SLA foi então gerado por meio do congelamento em nitrogênio líquido seguido de descongelamento do precipitado de parasitas, conforme descrito anteriormente (IBORRA *et al.*, 2005). A amostra resultante foi ressuspensa em PBS 1x e centrifugada a 405 x g, por 15 minutos. A porção solúvel foi separada e quantificada, utilizando-se o kit *Quick Start*<sup>TM</sup> *Bradford Protein Assay* (BIO-RAD), seguindo o protocolo do fabricante. O antígeno bruto de *T. cruzi* foi gentilmente cedido pela Dr<sup>a</sup> Aldina Barral (FIOCRUZ-BA).

## V.VI. ELISA

Para quantificação dos anticorpos específicos para *Leishmania* foi adotado o protocolo de ELISA descrito por CUBA CUBA e colaboradores (1980) e repetido por BOAVENTURA e colaboradores (2006). Brevemente, placas de 96 poços (Linbro/Titertek) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de antígeno (SLA de *L. chagasi*, SLA de *L. amazonensis* e ou antígeno bruto de *T. cruzi*) e incubadas por 12h a 4°C. As placas foram então lavadas quatro vezes com PBS/Tween 0.05% (250 µl por poço) e bloqueadas com PBS/Tween 0.05% + 1% Soro Bovino Fetal. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e foram adicionadas 100µl das amostras de plasma diluídas 1:100 em PBS/Tween 0.05% + 0.25% BSA. Todas as amostras foram testadas em duplicata. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora e em seguida lavadas. Foi adicionado o anti-IgG humano (Sigma), diluído em PBS/Tween 0.05% + 0.25% soro bovino fetal. As placas foram novamente incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. Após nova lavagem, foi adicionado o substrato p-NN (p-Nitrofenilfostato, Sigma: 1mg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (CaHCO<sub>3</sub>-Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). A revelação foi feita por 30 minutos e foi parada com NaOH 3M. A densidade óptica foi avaliada no comprimento de onda de 405 nm, utilizando-se o software *Softmax*® Pro (Version 5; *Molecular Devices*) e o aparelho Spectramax 190. As amostras previamente caracterizadas como verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, para determinar a sensibilidade e especificidade através da curva ROC, foram gentilmente cedidas pela Dra. Aldina Barral.

## V.VII. PCR EM TEMPO REAL

Para a reação de PCR em tempo real foram utilizados iniciadores baseados no gene *G6PD* (glicose-6-fosfato desidrogenase) (Código do Genebank: DQ212794.1), de cópia única (CASTILHO *et al.*, 2003). Os iniciadores (G6PD Fwd – 5'-CCCGAGGGCAGCACTTG-3' e G6PD Rev 3'-CCACCGGTCGTTGTTGATG-5') foram desenhados empregando-se o programa *Primer Express* 3.0 (Applied Biosystems, EUA), seguindo as recomendações do programa para quantidade de C+G, tamanho do amplicon e tamanho dos oligonucleotídeos. Os iniciadores foram submetidos à análise de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e as seqüências apresentaram 100% de identidade com *L. chagasi*. As reações de PCR seguiram o seguinte protocolo: 12.5 µl de *SYBR Green* (Invitrogen), 0.5µM de cada iniciador e 10µL de cada amostra (concentração de 50 ng de DNA). Para a quantificação dos parasitas, empregamos uma curva padrão variando de 10<sup>6</sup> até 100 parasitas. As amostras foram testadas em duplicata, em paralelo à curva padrão para quantificação. As corridas foram feitas em um

equipamento ABI 7500, utilizando o software SDS 2.0 (Applied Biosystems - EUA) e a termociclagem padrão do sistema ABI 7500: com uma desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, onde é feita a captação da fluorescência.

## V.VIII. CURVA PADRÃO

A curva padrão para a quantificação dos parasitas foi construída por meio do número de parasitas presentes em uma determinada concentração de DNA submetidas a diluição seriada a partir de um estoque de DNA extraído de uma solução estoque. O volume de 1 µL, a concentração de 10.9ng de DNA corresponde ao ponto de 10<sup>5</sup> parasitas, 10 µL desta mesma concentração equivale ao ponto de 10<sup>6</sup> parasitas (109.0ng de DNA). Os demais pontos da curva foram por diluição seriada do ponto de 10<sup>6</sup> parasitas até o ponto de 100 parasitas, com a utilização de 10 µL para de cada ponto da curva na placa.

Para avaliar a influência do DNA humano na quantificação dos parasitas, extraímos DNA de *L. chagasi*, sob diferentes condições: adicionando parasitas ao sangue humano realizando a extração (*spiking*) ou extraíndo o DNA dos parasitas e realizando as reações acrescidas de DNA humano.

## V.IX. PCR CONVENCIONAL

Para a reação de PCR convencional, utilizou-se iniciadores baseados na sequência conservada do minicírculo de DNA do cinetoplasto (kDNA) que está presente cerca de 10.000 vezes por parasita, como descrito por Oliveira e colaboradores (2005): 150 (5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA-3') e 152 (5'-(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3'). Estes iniciadores também foram submetidos ao BLAST e o amplicon gerado é específico para detecção do DNA de *Leishmania*. A amplificação com esses iniciadores gera o produto de PCR com 120 pares de bases (b.p.). As condições de termociclagem compreenderam uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, depois da ciclagem foi realizado a extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações foram feitas empregando-se PCR *supermix* (Invitrogen - EUA), DNA equivalente a 50ng e 0.2µM de cada iniciador em um volume final de 20 µL. O produto de amplificação foi analisado em gel de poliacrilamida a 12%, corado com nitrato de prata.

## **V.X. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as distribuições foram analisadas quanto a sua normalidade pelo Programa *Bioestat 5.0* (Manuel Ayres, 2007, Brasil) levando em conta sua curtose, média, mediana e histograma. Para a obtenção das curvas ROC utilizamos o software *Graphpad Prism* versão 5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA) para estipular o ponto de corte e os valores de especificidade e sensibilidade. O teste de hipótese não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação entre as frequências dos soropositivos que apresentaram a reação de PCR positiva e PCR negativa. O valor de p foi considerado significativo quando menor ou igual a 0,05.



## VI. RESULTADOS

### VI.I. Caracterização da população estudada

Inicialmente caracterizamos a população amostral dos 700 doadores que participaram do projeto separando-os em intervalos de frequências, recomendado pelo *Biostats*®, cuja predominância foi do sexo masculino (74.5%) e a idade média de 34 anos, cujo intervalo de frequência compreendeu jovens entre 19-43 anos (Tabela 1). O “n” total da amostragem foi de 695 devido à perda de alguns dados no termo de consentimento livre e esclarecido.

**Tabela 1.** Dados demográficos dos doadores de sangue da Fundação HEMOBA/SESAB, no período de 12/01/2010 a 31/07/2010, HEMOBA/SESAB/Salvador/BA.

<b>Sexo</b>		
	n (700)	Porcentagem (%)
Masculino	521	74,5%
Feminino	179	25,5%

<b>Idade</b>		
	Média	IC (95%)
	34	(34 – 35)

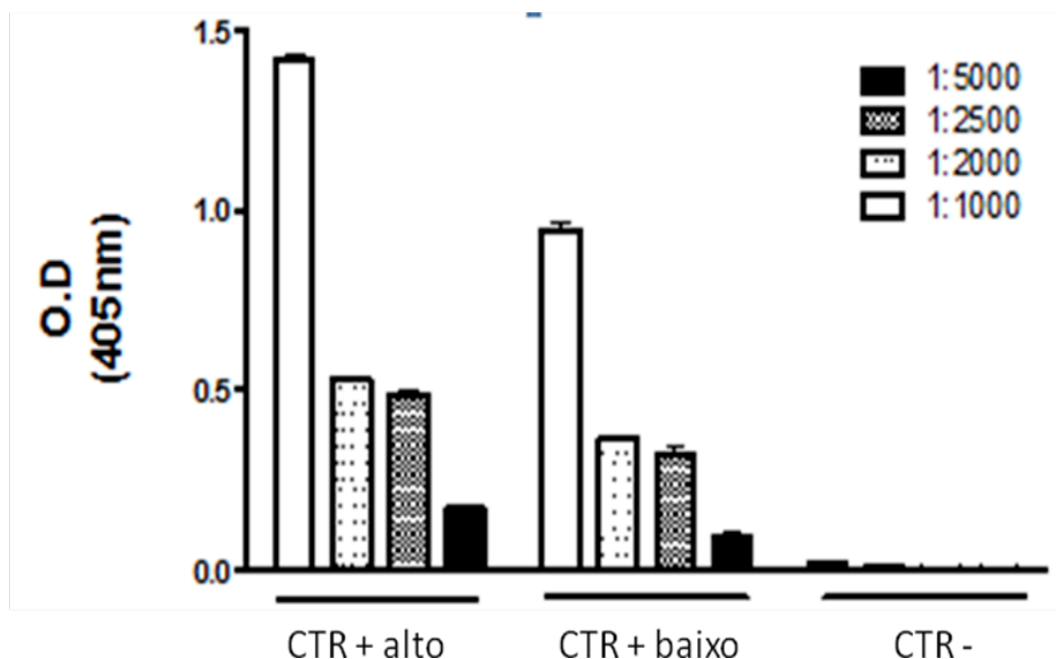
  

<b>Frequências das Idades</b>		
	n	Porcentagem
19  — 23	96	13,9 %
23  — 28	122	17,7%
28  — 33	111	16,5%
33  — 38	113	16,3%
38  — 43	93	13,4%
43  — 47	66	9,4%
47  — 52	52	7,4%
52  — 57	28	3,8%
57  — 62	12	1,4%
62  — 67	3	0,1%
<b>Total</b>	<b>695</b>	<b>100,0%</b>

## VI.II. Padronização do ELISA

O primeiro passo realizado para se avaliar a soropositividade para *Leishmania*, nos doadores de sangue, foi à padronização do ELISA. Para tanto, utilizaram-se 20 soros de pacientes com leishmaniose visceral, armazenados na soroteca do Laboratório de Imunoparasitologia (Fiocruz/BA), proveniente de outros trabalhos realizados no laboratório. Estes soros foram previamente caracterizados como alto e baixo respondedores por apresentarem ELISA positivo com D.O. alta (CTR+ alto; D.O. > 0.330) ou D.O. baixa (CTR+ baixo; D.O. < 0.260), para se estipular a quantidade correta do segundo anticorpo. Em paralelo, foram testados soros sabidamente negativos, isto é, residentes de área não endêmica, como controles negativos.

O primeiro teste para se estabelecer o ensaio de ELISA foi determinar a concentração do anticorpo de detecção. Para isso utilizamos diferentes concentrações do mesmo, como mostrado na Figura 5. A melhor diluição do segundo anticorpo foi de 1:2500, a qual nos permitiu distinguir os controles positivos alto e baixo e a qual não apresentou reação com soros controles negativos.

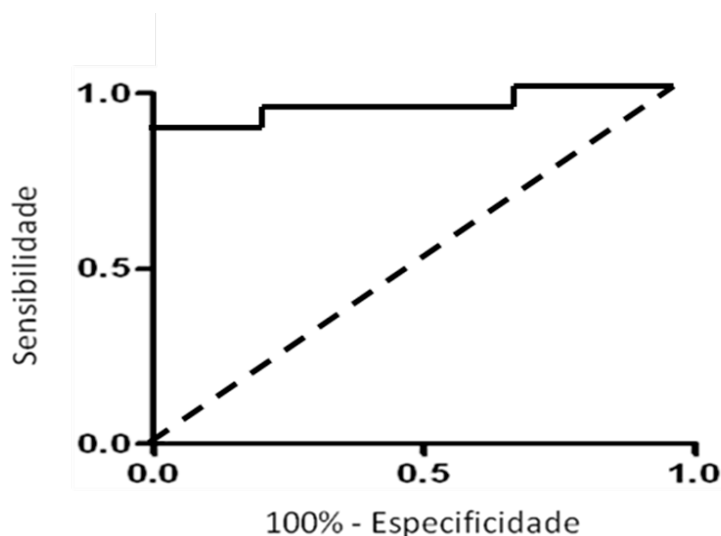


**Figura 5. Teste do SLA de *Leishmania chagasi* e padronização da concentração do anticorpo de detecção.** Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 10 µg/ml de SLA e incubadas com os soros controle diluídos 1:100 e, em seguida, com concentrações diferentes do anticorpo de detecção (1:5000, 1:2500, 1:2000 e 1:1000). Os resultados estão representados pela mediana e intervalo interquartil, com tamanho amostral de n=20.

### VI.III. Estabelecimento do ponto de corte empregando a curva ROC

Para se estabelecer a D.O. que diferencia os resultados positivos e os negativos, determinamos o ponto de corte da reação: para isso utilizamos o cálculo da média da D.O. Dos controles negativos acrescido de 3 desvios padrões, sendo este valor o ponto de corte. Ao total foram utilizados 20 soros negativos e o ponto de corte estipulado foi uma D.O. de 0.0217. No entanto, a fim de determinarmos a sensibilidade e a especificidade do teste de ELISA, empregamos a análise da curva ROC. Esta curva permite selecionar o ponto de corte de acordo com a especificidade e a sensibilidade, diminuindo a possibilidade dos resultados falso-positivos (amostras negativas detectáveis como positivas no teste) e falso negativo (amostras positivas detectáveis como negativas no teste).

Para isso, foi realizado um novo ensaio de ELISA com 20 soros provenientes de pacientes com leishmaniose visceral e 20 soros identificados como verdadeiros negativos, provenientes de voluntários de uma área não endêmica. As D.Os. resultantes foram utilizadas para construir a curva ROC. Observamos que a melhor especificidade encontrada foi de 90% junto com uma sensibilidade de 95%, e o ponto de corte foi de 0.01685 (Figura 6).

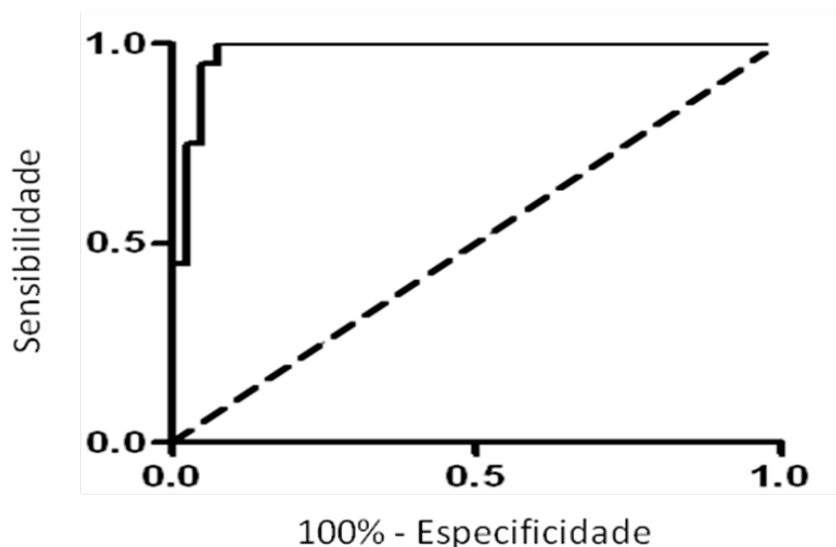


**Figura 6. Estabelecimento do ponto de corte da curva ROC, utilizando o SLA de *Leishmania chagasi*.** Foram utilizados 20 soros verdadeiramente positivos e 20 soros verdadeiramente negativos, totalizando 40 soros, testados em duplicata. As D.Os. obtidas por meio do ELISA foram utilizadas para a construção da curva ROC que apresentou área sob a curva de 0.99 e ( $p < 0.0001$ ).

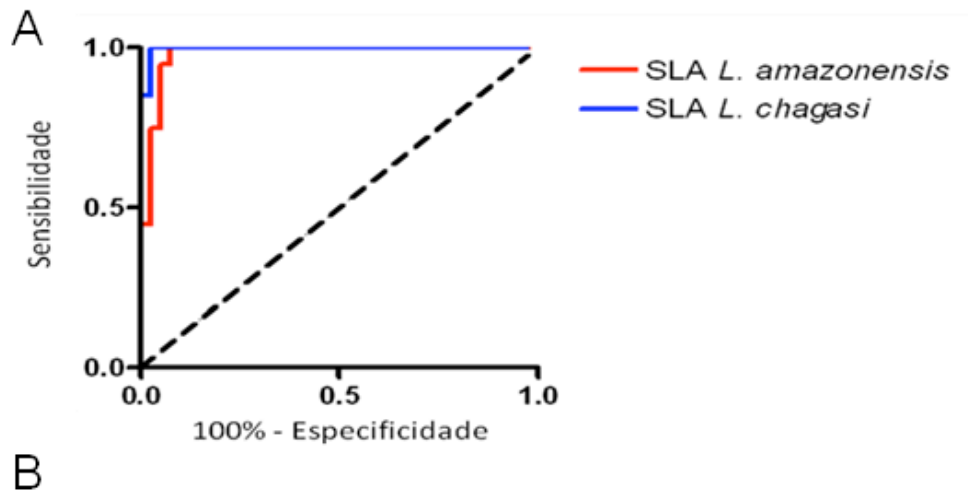
#### VI.IV. Comparação entre o SLA de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*

Em paralelo realizamos ensaios de ELISA com SLA obtido de *L. amazonensis* (agente etiológico da leishmaniose tegumentar). Estudos demonstram a existência de diferenças na reação do ELISA, em termos de detecção de anticorpos, conforme a cepa de *Leishmania* utilizada na preparação do SLA (GOMES-SILVA *et al.*, 2008). Assim, o ensaio realizado com o SLA da espécie de *Leishmania* causadora da doença (*L. chagasi* - LV) pode gerar resultados mais específicos e sensíveis. A partir das D.Os. obtidas com o SLA de *L. amazonensis* também construímos uma curva ROC. O SLA de *L. amazonensis* apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 80% (Figura 7), o que permitiu identificar as amostras positivas, porém apresentando menor exatidão quanto às amostras negativas, quando comparado ao SLA de *L. chagasi* (Figura 6).

De fato, a sobreposição dos dois resultados (Figura 8) demonstra que a utilização do SLA proveniente de *L. chagasi* fornece resultados mais sensíveis e específicos quando comparado ao SLA de *L. amazonensis*.

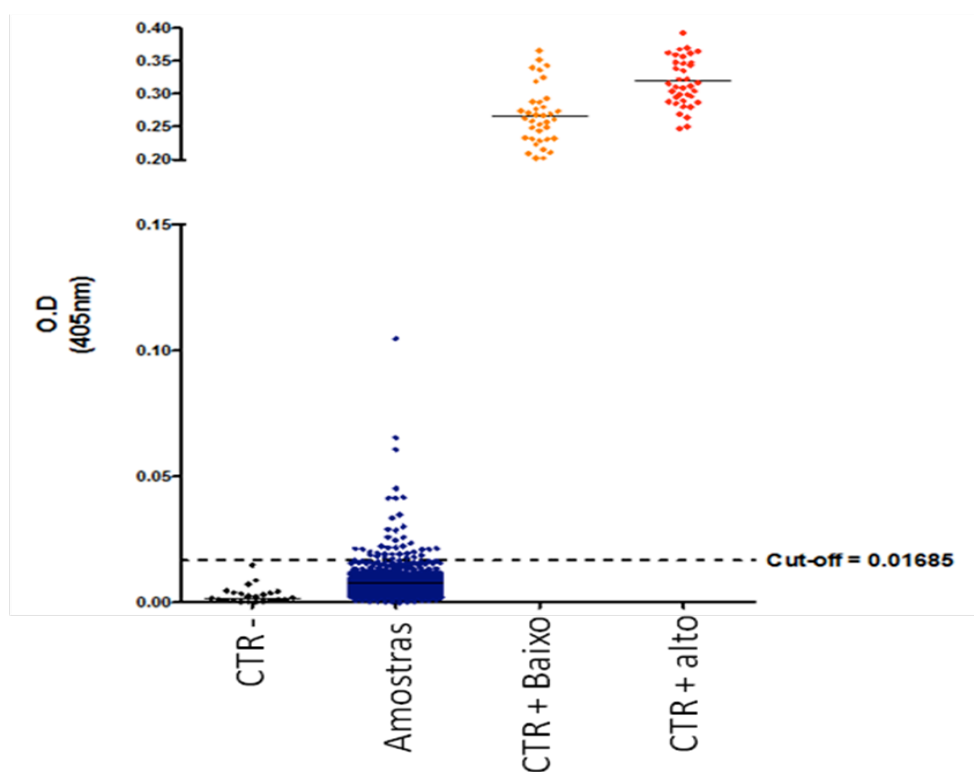


**Figura 7. Estabelecimento do ponto de corte pela curva ROC, utilizando o SLA de *Leishmania amazonensis*.** Foram utilizados 20 soros verdadeiramente positivos e 20 soros verdadeiramente negativos, totalizando 40 soros, testados em duplicata. As D.Os. obtidas por meio do ELISA foram utilizadas para a construção da curva ROC que apresentou a área sob a curva de 0.97 e  $p < 0.0001$ .



**Figura 8. Sobreposição da curva ROC obtida com o SLA de *L. chagasi* e com o SLA de *L. amazonensis*.** (A) As curvas foram geradas empregando o SLA derivado de cada espécie em ensaios de ELISA, realizados com 20 soros verdadeiramente positivo e 20 soros verdadeiramente negativos. A área preenchida representa o incremento na área sob a curva dos resultados obtidos com SLA de *L. chagasi*. As amostras foram testadas em duplicata. (B) Informação detalhada obtida com cada curva ROC.

Com o estabelecimento do ponto de corte, iniciamos a avaliação sorologia das 700 amostras dos doadores de sangue, empregando o SLA de *L. chagasi*. Como resultado (Figura 9), detectamos 38 indivíduos soropositivos, o que equivaleu a 5,4% de soro positividade na amostra.

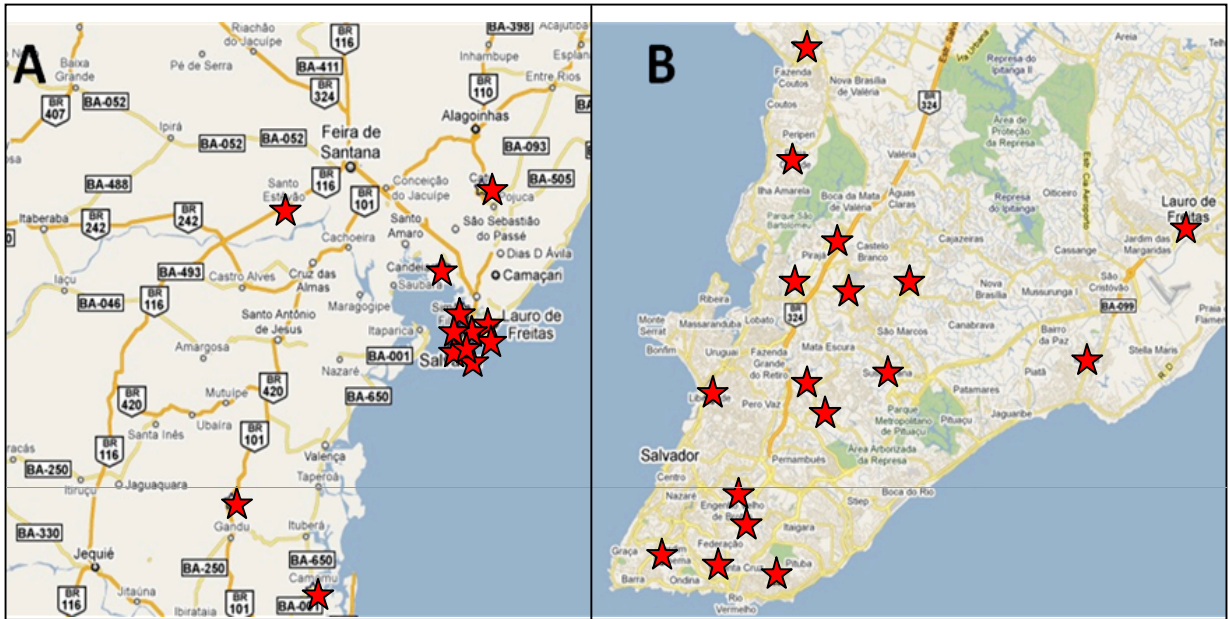


**Figura 9. Detecção de anticorpos anti\_Leishmania em doadores de sangue de Salvador.**

As amostras (n=700) foram obtidas no HEMBOA e foram testadas para reatividade contra SLA de *L. chagasi*. Como controle, foram utilizados soros positivos com baixa reatividade ao SLA (CTR+ baixo) e com alta positividade ao SLA (CTR+ alto). Os controles negativos consistiram de amostras de voluntários de uma área não endêmica. Todas as amostras foram testadas em duplicata e o ponto de corte (*cut-off*) equivale a 0.01685.

#### **VI.V. Distribuição dos soros positivos para leishmaniose**

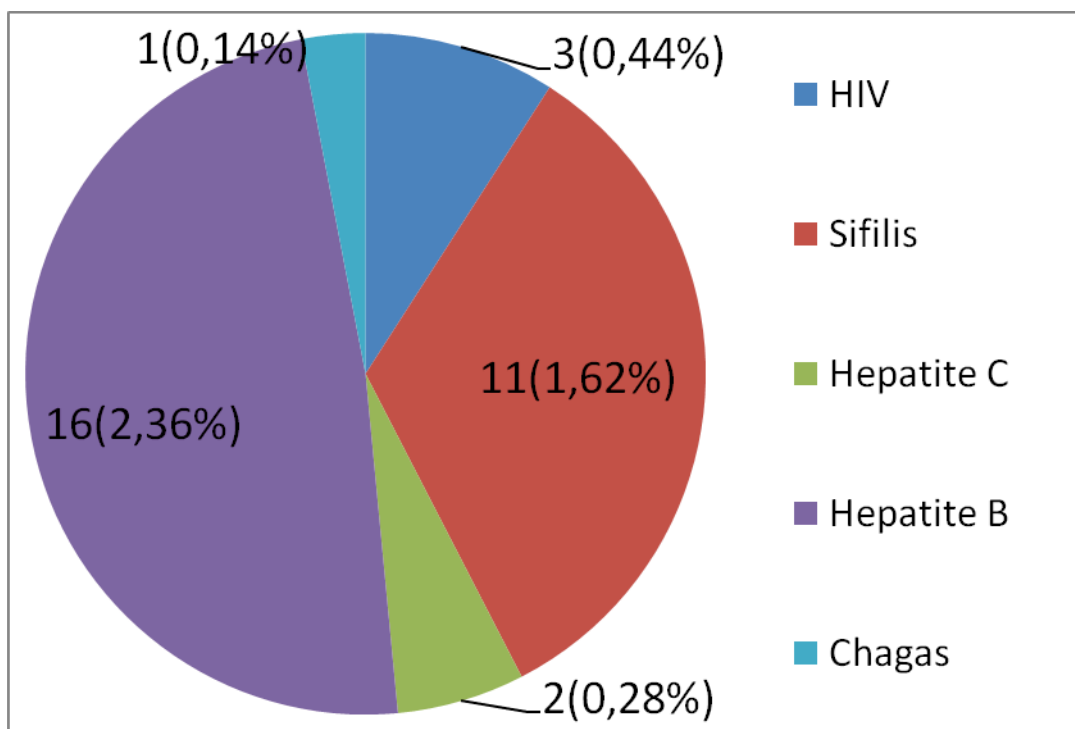
Por meio dos dados obtidos no TCLE, localizamos a residência dos indivíduos soropositivos. Como mostrado na Figura 10, há uma grande dispersão dos doadores por diferentes bairros de Salvador e também por diferentes municípios do estado sem se concentrar em um único local.



**Figura 10.** Mapa com a localização dos doadores soro positivo para *Leishmania*. **A.** Mapa com menor aumento mostrando todos os doadores, inclusive os não residentes na região metropolitana de Salvador. **B.** Mapa que permite a visualização dos soropositivos da cidade de Salvador. Estrelas representam o local de residência dos doadores

#### VI.VI. Soro positividade anti-*Leishmania* e reatividade cruzada com doença de Chagas

Como descrito na literatura, existe a possibilidade do SLA de *Leishmania* apresentar reação cruzada com antígenos de outros patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2008; VEXENAT *et al.*, 1996). Para investigar esta possibilidade, obtivemos os resultados da sorologia do HEMOBA/SESAB de todos os doadores aqui avaliados. Como mostrado na Figura 11, verificamos que 3 doadores (0.44%) da população estudada é reagente para HIV, 11 doadores (1.62%) são reagentes para sífilis, 2 doadores (0.29%) apresentaram reação reagente para hepatite C, 16 doadores (2.36%) reagiram para hepatite B e 1 doador (0.14%) é reagente para doença de Chagas.



**Figura 11. Sorologia do HEMOBA/SESAB.** Resultado dos exames sorológicos de todos os doadores incluídos no trabalho, coletados durante o período de 12/01/2010 a 31/07/2010, n= 700.

Cruzando os dados da sorologia da HEMOBA/SESAB com a sorologia para Leishmania, dois doadores apresentaram positividade para doença de Chagas ou sífilis (Tabela 2).

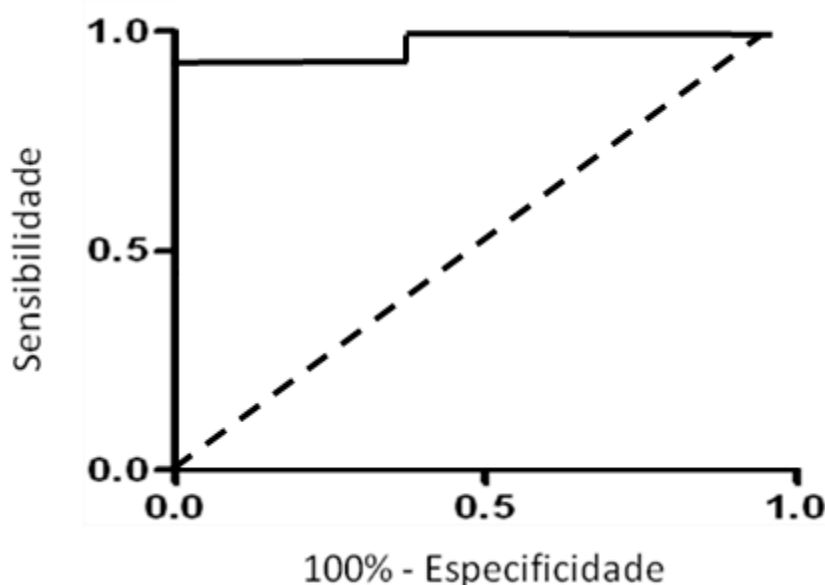


**Tabela 2.** Comparação dos resultados da sorologia dos 38 doadores soros positivos para *Leishmania* com a sorologia para outros patógenos, realizada na HEMOBA/SESAB.

Número do Doador	Data	Sexo	ELISA Anti-LSH	Exame sorológico (HEMOBA/SESAB)
14	1/12/2010	M	P	-
29	13/1/2010	M	P	-
32	15/1/2010	M	P	-
33	15/1/2010	M	P	-
49	19/1/2010	M	P	-
65	25/1/2010	M	P	-
74	25/1/2010	M	P	-
93	27/1/2010	M	P	-
101	28/1/2010	M	P	-
123	2/2/2010	M	P	-
172	19/2/2010	F	P	-
204	3/2/2010	M	P	-
208	3/2/2010	M	P	-
242	3/8/2010	M	P	-
256	3/9/2010	M	P	-
278	22/3/2010	M	P	-
292	24/3/2010	M	P	-
331	20/4/2010	M	P	-
365	26/4/2010	F	P	-
367	26/4/2010	M	P	-
370	26/4/2010	M	P	-
372	28/4/2010	M	P	-
405	5/5/2010	M	P	Chagas
413	5/7/2010	M	P	-
422	5/12/2010	M	P	-
432	5/12/2010	M	P	-
439	14/5/2010	M	P	-
446	17/5/2010	M	P	-
464	19/5/2010	F	P	-
483	6/1/2010	M	P	-
503	6/2/2010	F	P	Sífilis
505	6/2/2010	F	P	-
513	6/8/2010	M	P	-
524	14/6/2010	M	P	-
559	18/6/2010	F	P	-
632	20/7/2010	M	P	-
669	27/7/2010	M	P	-
687	29/7/2010	F	P	-

-, resultado negativo na sorologia proveniente da HEMOBA/SESAB.

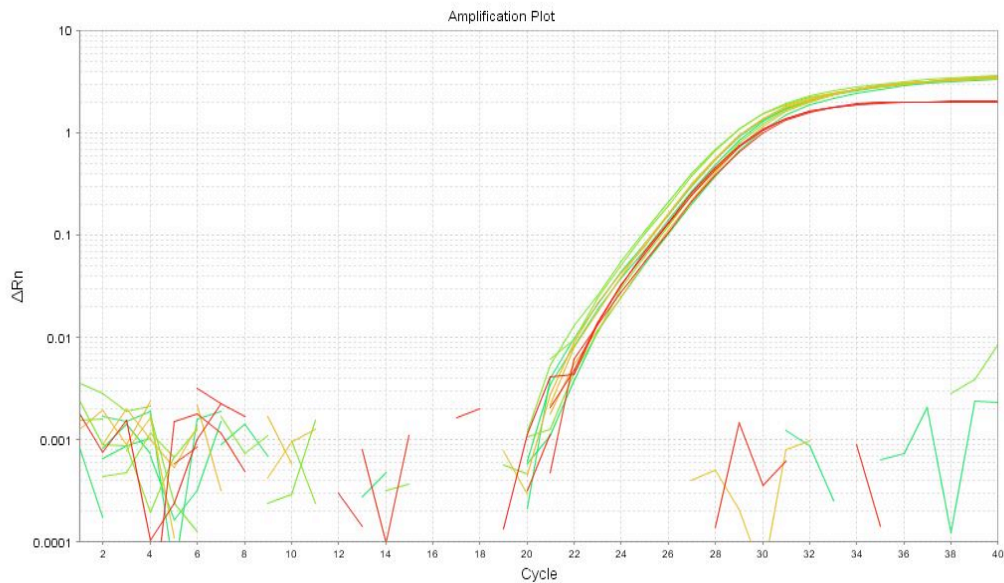
No mesmo período que esperávamos o resultado da sorologia da Fundação HEMOBA/SESAB, para os demais patógenos, decidimos testar as nossas amostras soropositivas para Leishmania em um novo ensaio de ELISA, empregando antígeno bruto de *T. cruzi*, obtido no laboratório. Antes, porém, determinamos o ponto de corte para este ensaio. Para isso, construímos uma nova curva ROC com 20 soros verdadeiramente positivos e 20 soros verdadeiros negativos, obtidos do banco de soros do Laboratório de Imunoparasitologia da Fiocruz/BA (Figura 12). Neste ensaio, o ponto de corte estabelecido foi a D.O. de 0.07175 (Figura 13), apresentando 95% de sensibilidade e 95% de especificidade (AUC = 0.98,  $p < 0.0001$ ).



**Figura 12. Estabelecimento do ponto de corte pela curva ROC, utilizando o antígeno bruto de *T. cruzi*.** Foram utilizados 20 soros verdadeiramente positivos e 20 soros verdadeiramente negativos para leishmania, totalizando 40 soros, testados em duplicata. As D.Os. obtidas por meio do ELISA foram utilizadas para a construção da curva ROC. A linha pontilhada representa a linha de identidade e a área sob a curva contínua é equivalente 0.98 (AUC) ( $< 0.0001$ ).

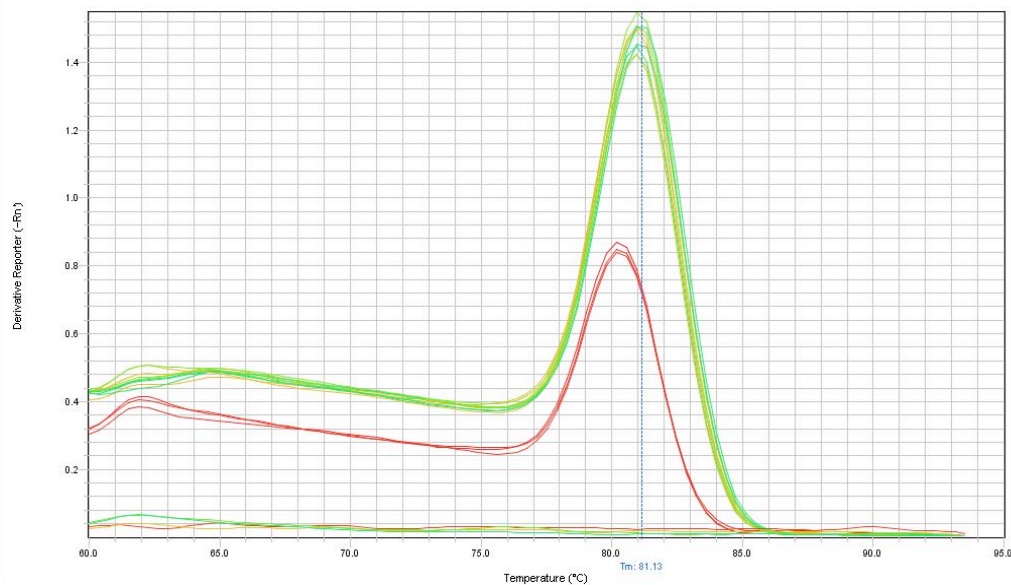
A partir do ponto de corte estabelecido, as amostras (38/700) cuja sorologia foi positiva para Leishmania foram testadas no ELISA anti-Chagas. Como mostrado na Figura 13, somente um doador apresentou positividade para doença de Chagas, corroborando o resultado inicial fornecido pela HEMOBA/SESAB, que utiliza o Kit ELISA cruzi (Biomérieux – Brasil).





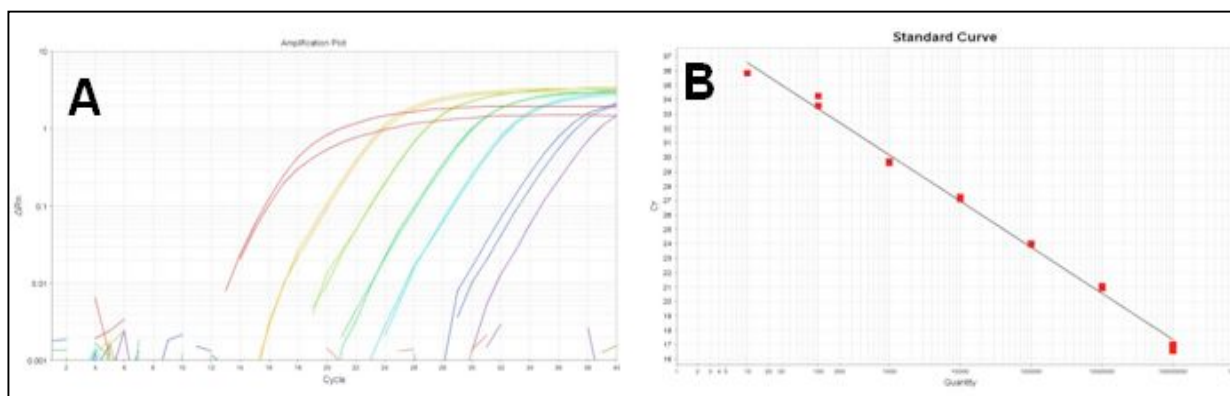
**Figura 14. Determinação da concentração de iniciadores a ser utilizada na amplificação por PCR em tempo real.** A reação de PCR foi realizada com diferentes concentrações de iniciadores (0.1 μM a 0.6 μM, representadas pelas linhas coloridas) e com DNA de *Leishmania chagasi* equivalente a  $10^4$  parasitas. As amostras foram testadas em duplicata.

Independente da concentração de iniciadores empregada (de 0.1 uM a 0.6 uM), foi possível gerar um pico de amplificação específico (Figura 15), decorrente do aumento da incorporação de *SYBR Green* na amostra amplificada. A concentração de iniciadores escolhida foi a de 0.2 uM, por não ser um fator limitante da reação, por gerar uma amplificação específica e por ser mais econômica na quantidade utilizada.



**Figura 15. Curva de dissociação utilizando diferentes concentrações de iniciadores.** Os produtos de amplificação gerados pela reação de PCR com diferentes quantidades de iniciadores foram analisados quanto à sua especificidade. As linhas coloridas mostram o produto único gerado, decorrente da dissipação da fluorescência incorporada após o aumento gradual da temperatura.

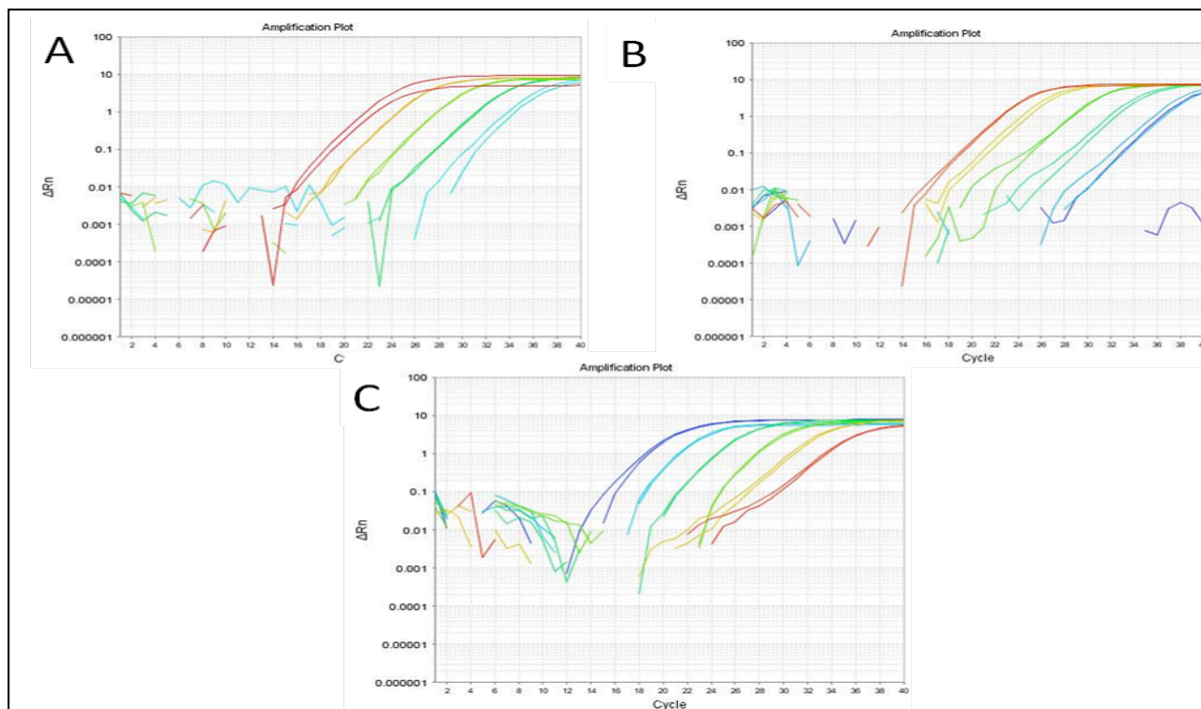
A partir do estabelecimento da concentração de iniciadores, foi feita uma curva padrão para possibilitar a quantificação de parasitas nas amostras dos doadores. A curva padrão foi construída com DNA de *L. chagasi*, como descrito nos materiais e métodos. O primeiro ponto da curva equivale a  $10^6$  parasitas (109.0 ng de DNA) e os demais pontos foram obtidos a partir da diluição seriada (1:10) do ponto mais concentrado (Figura 16A). O *slope* da curva resultante foi de -3.204,  $r^2 = 0.993$ , apresentando 105% de eficiência (Figura 16B).



**Figura 16. Curva padrão para a quantificação de Leishmania por PCR em tempo real.**

**A.** A reação de PCR foi realizada com iniciadores na concentração de  $0.2\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{l}$  de DNA, equivalendo a diferentes concentrações de parasita (linhas coloridas). **B.** A curva apresentou o *slope* de  $-3.204$ ,  $r^2=0.993$  e 105% de eficiência. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

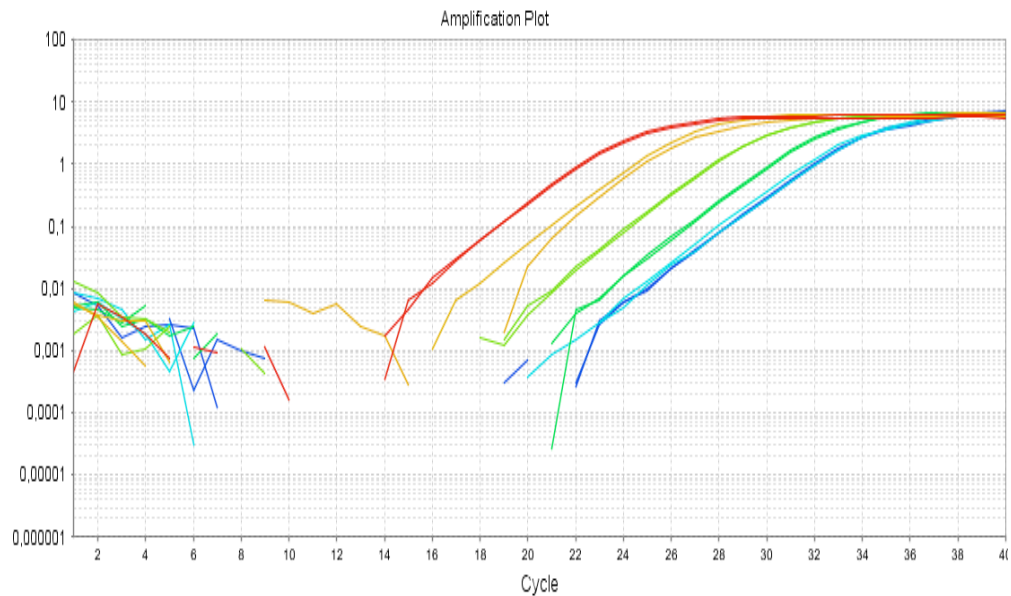
A fim de se analisar a interferência do DNA humano na quantificação da carga parasitária na reação de PCR em tempo real, foram feitos ensaios de amplificação em diferentes condições, empregando DNA extraído da cultura de parasitas somente, empregando DNA extraído de sangue humano acrescido de *L. chagasi* em diferentes concentrações ( $10^6$  a  $10^2$ ) e empregando DNA de cultura de parasitas suplementado com DNA humano (*spiking*). Como mostrado na Figura 17, obtivemos o mesmo padrão de amplificação, independente das condições de amplificação empregadas. Assim optamos por utilizar a curva padrão empregando DNA extraído da cultura de Leishmania.



**Figura 17. Curva padrão para a quantificação de *Leishmania*, empregando diferentes combinações de amostra de DNA.** **A.** A reação de PCR foi realizada com iniciadores na concentração de 0.2 $\mu$ M e 10 $\mu$ l de DNA, equivalendo a diferentes concentrações de parasita (linhas coloridas). **A.** Curva obtida a partir da extração de DNA da cultura de *Leishmania*, apresentou *slope* de -3.024,  $R^2$  de 0.99 e eficiência de 114%. **B.** Curva obtida a partir da extração conjunta de DNA de sangue humano e de *Leishmania*, apresentou *slope* de -3.206,  $R^2$  de 0.97 e eficiência de 105%. **C.** Curva de DNA de parasita acrescentada de DNA humano (*spiking*), *slope* de -2.800,  $R^2$  de 0.98 e eficiência de 120%. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

#### **VI.VIII. Detecção de *Leishmania chagasi* em amostras de doadores por PCR em tempo real.**

Empregando a curva padrão padronizada como descrito acima, realizamos o PCR em tempo real nas 700 amostras dos doadores do HEMOBA/SESAB. Observamos que somente três doadores apresentaram amplificação da reação de PCR Realtime com o número de parasitas inferior a 100. No entanto, a curva padrão para a quantificação de parasitas partindo do ponto de  $10^6$  parasitas até o ponto de 10 parasitas apresentou baixa eficiência: o ponto de 10 parasitas apresentou amplificação próxima ao ponto de 100 parasitas (Figura 18). Assim, a eficiência alcançada foi de 200% (*slope* de -2.000,  $R^2$  de 0.92), o que poderia nos levar a superestimar o número de parasitas presente nas amostras.

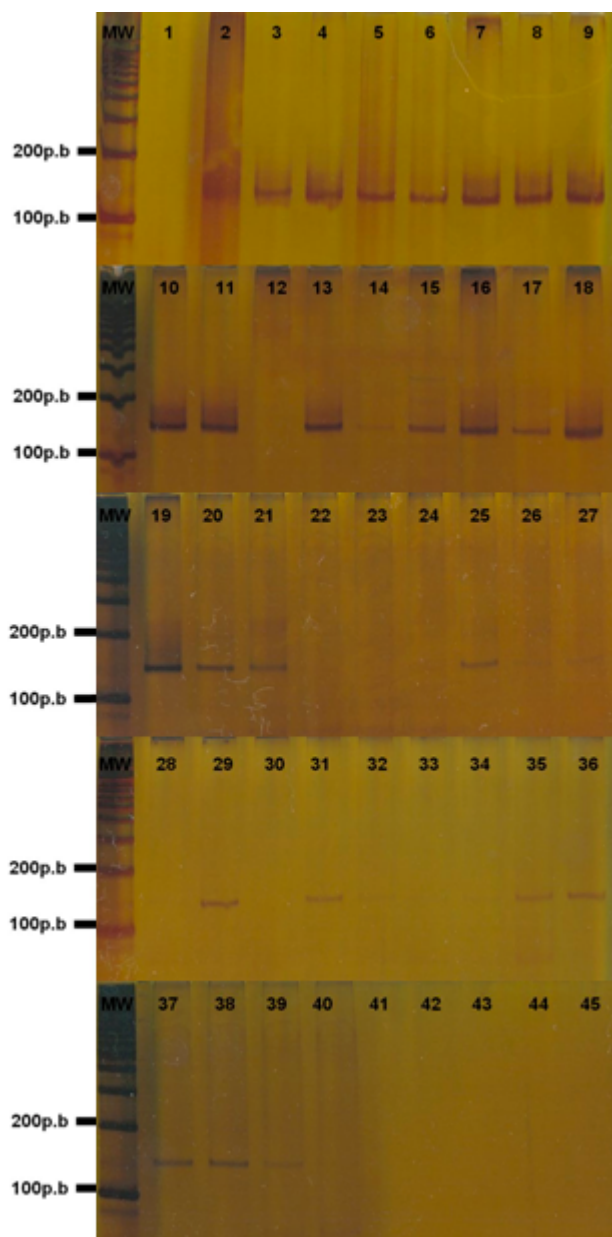


**Figura 18. Curva padrão para a quantificação de Leishmania, empregando concentrações diferentes de parasita ( $10^6$  -  $10$ )** A reação de PCR foi realizada com iniciadores na concentração de  $0.2\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{l}$  de DNA, equivalendo a diferentes concentrações de parasita:  $10^6$  (vermelha),  $10^5$  (laranja),  $10^4$  (verde claro),  $10^3$  (verde escuro),  $10^2$  (azul claro),  $10^1$  (azul escuro). Todas as amostras foram testadas em duplicata.

#### **VI.IX. PCR convencional utilizando *kDNA*, gene de cópia múltipla**

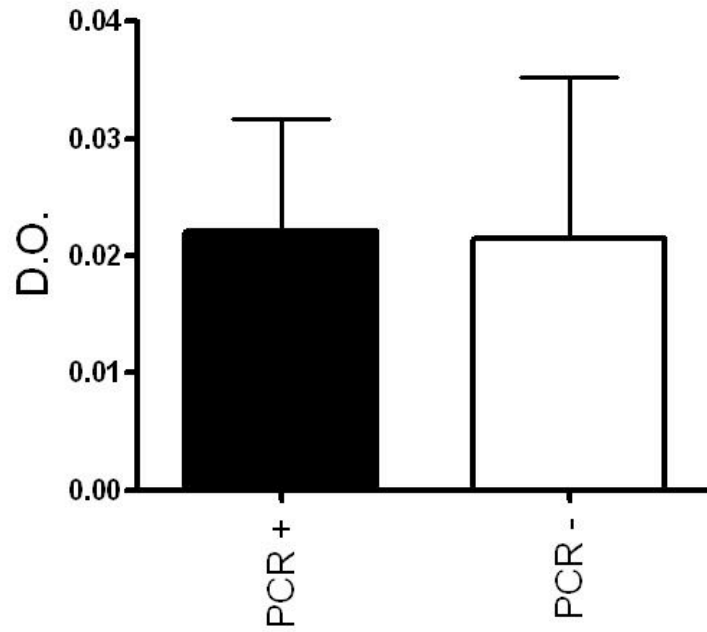
Em paralelo ao PCR quantitativo, resolvemos também testar as amostras soro positivas (38/700) por PCR qualitativo, cujo alvo de amplificação é uma região do genoma repetitiva, isto é, presente em múltiplas cópias. Surpreendentemente, dos 38 indivíduos soropositivos, conseguimos produtos de amplificação por PCR convencional em 28, o que representa 73% dos doadores possuem o DNA do parasito circulando no sangue (Figura 19).





**Figura 19. Amplificação por PCR convencional para detecção de parasita em doadores de sangue com sorologia positiva para Leishmania. MW, 100pb, 1, Controle negativo e 2, controle positivo com o DNA de *leishmania chagasi*, 3-40, amostras soropositivas.**

A fim de avaliar uma possível associação entre a sorologia anti-Leishmania e a amplificação de DNA do parasita pelo PCR convencional, comparamos as D.Os das amostras cujo PCR foi positivo e a D.Os das amostras cujo PCR foi negativo: como mostrado na Figura 20, não há diferença significativa entre as D.Os.



**Figura 20. Comparação entre as D.Os. dos doadores de sangue cujo PCR foi positivo ou negativo para Leishmania.** Os resultados das D.Os. obtidas no ELISA foram comparados com o resultado do PCR convencional, positivo ou negativo (n=38). Os resultados estão mostrados pela mediana e os intervalos interquartil.

## VII. DISCUSSÃO

O relato de transmissão de Leishmaniose por meio da doação de sangue de indivíduos assintomáticos já foi descrito na literatura. Um dos primeiros trabalhos a descrever esta possibilidade no Brasil foi o de Luz e colaboradores (1997), na região do Rio Grande do Norte. Neste trabalho, os autores observaram a presença de anticorpo anti-Leishmania nos doadores de sangue da cidade de Natal, concluindo que seria necessária a implementação de medidas de monitoramento nos bancos de sangue das áreas endêmicas para leishmaniose no Brasil. Na Bahia este tipo de transmissão ainda é indefinido, apesar de a região nordeste constituir uma importante área endêmica para leishmaniose (COSTA, 2005). Desta maneira, no presente trabalho nosso objetivo foi estipular a prevalência de anticorpos anti-Leishmania na população de doadores de sangue da região metropolitana de Salvador. Para isso, coletamos amostras de sangue de doadores voluntários no HEMOBA/SESAB, realizamos a sorologia utilizando o SLA de *L. chagasi* e, em paralelo, quantificamos a presença de parasitas nas amostras por PCR em tempo real.

Inicialmente, avaliamos a presença de anticorpos anti-Leishmania em uma amostra de doadores de sangue da população de Salvador. A soroprevalência foi estipulada em 5,4% (38/700). O perfil do doador de sangue é predominante do gênero masculino e mais de 50% desta população amostral pertence à faixa etária entre 19 a 43 anos. O sexo masculino é mais presente por apresentar valores mais constantes de hemoglobina, enquanto que as mulheres por passar pela fase fértil esses valores de hemoglobina se alteram no decorrer do mês, impossibilitando a doação de sangue durante este período, enquanto que a idade economicamente ativa 19-43 anos é mais presente no ato da doação.

Na literatura, existem trabalhos que relatam valores maiores de soroprevalência para leishmania, tais como o trabalho de Luz e colaboradores (1997) e o de Otero e colaboradores (2000). Em ambos os trabalhos os autores avaliaram a soroprevalência na população doadora de sangue em Natal. Utilizando a metodologia do FML-ELISA, que emprega o antígeno Fucose Manose Ligante, proveniente da *L. donovani*. Este antígeno é uma glicoproteína de membrana presente nas formas amastigota e promastigota e quando utilizado no ensaio de ELISA, apresenta 100% de sensibilidade e 96% de especificidade, podendo reagir com portadores da doença de Chagas, encontraram a soroprevalência de 9%. O nosso resultado foi de 5,4% que pode ser explicado pelo fato de termos avaliado doadores do banco de sangue de Salvador que poderiam ser provenientes de áreas onde ocorre a leishmaniose ou não, e a migração dessas pessoas entre áreas urbanas e não urbanas, pode refletir no encontro do

anticorpo anti-leishmania. Vale ressaltar que ambos os autores encontraram 9% de soropositividade na população doadora de sangue assintomática e quando ampliada a amostragem para a inclusão da população peri urbana, este número aumentou para 25%. A cidade de Natal é uma área endêmica para leishmaniose, diferente da cidade de Salvador.

No Brasil não é feita a triagem sorológica para *Leishmania* e como rotina se faz a triagem para HIV1, HIV2, sífilis, doença de Chagas, hepatite B, hepatite C, HTLV1 e HTLV2 (ANDRADE *et al.*, 1989). Outro dado interessante surgiu a partir da comparação do resultado sorológico para *Leishmania* versus os demais patógenos, testados na rotina sorológica do HEMOBA/SESAB. A soropositividade contra leishmaniose que encontramos foi de 5.4%, superior à encontrada para as demais doenças que possuem uma transmissão por via parenteral (0.44% HIV, 1.62% sífilis, 0.29% hepatite C, 2.36% para hepatite B e 0.14% doença de Chagas). Provavelmente, a alta soroprevalência para leishmaniose, encontrada em nosso estudo, é devida à centralização da HEMOBA/SESAB, que recebe doadores de todo o estado da Bahia que possui áreas endêmicas para diferentes tipos de doenças, inclusive para a Leishmaniose. Assim podemos sugerir que os anticorpos anti-*Leishmania* estão mais prevalentes do que os demais anticorpos, demonstrando a importância da inclusão de um teste sorológico anti-*Leishmania* nos bancos de sangue.

Camargo & Rebonato (1969) demonstraram no seu trabalho que existe associação cruzada no ensaio de anticorpo fluorescente em soros humanos de portadores de leishmaniose e de doença de Chagas. Quando estes soros apresentam positividade somente para *Leishmania*, o resultado pode ser confirmado ao excluir a reatividade para doença de Chagas, sendo assim fidedignos para o anticorpo anti-*Leishmania*. Urias e colaboradores (2009) em uma população 400 amostras de doadores proveniente de Minas Gerais, encontraram a mesma proporção de soropositividade de nossa amostragem, com cerca de 5,5% e também encontrou dois doadores com resultado positivo para doença de Chagas, estes autores atribuíram os resultados da reação cruzada à necessidade de se otimizar os *kits* de detecção quando aplicados aos pacientes assintomáticos. Oliveira e colaboradores (2008) estudaram a sorologia de cães provenientes de área endêmica em Minas Gerais e encontraram a possibilidade de uma co-infecção entre *Leishmania*, *Ehrlichia* e *Babesia*. Neste mesmo trabalho, o ELISA apresentou reação cruzada, e ao longo de 6 meses de acompanhamento, esses animais manifestaram a doença, indicando que se tratava, de fato, de uma infecção por *Leishmania*.

A fim de se avaliar a possibilidade de reação cruzada do teste de ELISA para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, analisamos, em paralelo ao resultado fornecido pelo HEMOBA/SESAB à sorologia anti-Chagas e encontramos apenas um doador positivo. A

possibilidade de ocorrer uma reação cruzada entre *L. chagasi* e *T. cruzi* existe já que ambos pertencem à mesma família de parasitas e dividem o mesmo clado da árvore filogenético (GONTIJO & MELO, 2004; VEXENAT *et al.*, 1996). Em ambos os testes sorológicos padronizados (*L.chagasi* e *T.cruzi*), os pontos de cortes estipulados apresentaram valores maiores que 90% de sensibilidade e especificidade, com razão de verossimilhança positiva “Likelywood” de 18 e Razão de verossimilhança negativa próximo a zero (0.001). Assim, podemos concluir que, em situações reais, o teste tem baixa possibilidade de encontrar falsos positivos, falsos negativos e exatidão para acertar o diagnóstico, sugerindo uma co-infecção *Leishmania/T. cruzi*.

Brígida (2004) em sua dissertação de mestrado testou diferentes antígenos de *Leishmania* para a identificação de soropositividade na leishmaniose visceral e concluiu que, na forma de extrato protéico solúvel, o antígeno de *L.amazonensis* e o de *L.chagasi* são equivalentes, com uma maior reatividade quando o antígeno de *L.chagasi* é empregado. No nosso trabalho, observamos um melhor reconhecimento no ELISA quando testamos o antígeno protéico solúvel de *L.chagasi*, em comparação com o antígeno protéico solúvel de *L.amazonensis*, confirmando, portanto os dados de Brígida.

O ELISA é um método complementar para o diagnóstico humano da leishmaniose e junto com a cultura de parasitas pode ser um excelente parâmetro de confirmação da doença, sendo muito utilizado em inquéritos populacionais de doenças (GONTIJO & MELO, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; VEXENAT *et al.*, 1996). A ELISA é uma técnica indireta que mede a presença do anticorpo anti-*Leishmania* e, portanto, esta técnica não consegue quantificar a presença do parasita no indivíduo. Sendo assim, a sorologia não permite saber se a infecção ocorreu recentemente ou há algum tempo (GRIMALDI & TESH, 1993; SCHULZ *et al.*, 2003). A técnica de PCR, por sua vez, amplifica um fragmento de DNA do parasita, identificando sua presença e é considerada um dos métodos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico das Leishmanioses (REITHINGER & DUJARDIN, 2007). A sensibilidade da técnica de PCR depende diretamente do alvo a ser amplificado (TUPPERWAR *et al.*, 2008), como também da qualidade da extração do DNA (MARY *et al.*, 2004).

Sendo assim, optamos por avaliar os doadores de sangue quanto à presença de parasitas. O nosso alvo de amplificação por PCR em tempo real foi um gene de cópia única, a *glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)*, um enzima metabólica responsável pela fosforilação da glicose durante a glicólise (CASTILHO *et al.*, 2003). Este ensaio nos permitiu quantificar os parasitas em três indivíduos soropositivos. Em todos eles, o número de parasitas obtido foi inferior a 10 cópias. Mary e colaboradores (2004), no trabalho realizado com um gene de

cópias múltiplas discutem a grande dispersão de dados durante a quantificação de DNA de *Leishmania* por PCR em tempo real: quando a carga parasitária foi igual ou menor a 100 parasitas, houve uma dispersão de 60,8% na quantificação do DNA do parasita. Os autores argumentam que apesar de ser uma técnica sensível, a mesma ainda precisa de ajustes na exatidão dos seus resultados. Provavelmente por causa da relação entre DNA de *Leishmania*:DNA de hospedeiro que é muito baixa. Ainda segundo Mary e colaboradores (2004), o PCR em tempo real funciona muito bem na detecção de cargas parasitárias elevadas, não sendo o melhor método para estudos da população assintomática.

Selvapandiyan e colaboradores (2008) padronizaram um método de identificação da espécie de *Leishmania* presente em amostras de sangue dos militares que serviram no oriente médio. Os autores conseguiram detectar a carga parasitária em assintomáticos, utilizando o kDNA e o PCR em tempo real. Tupperwar e colaboradores (2008), descreveram um método para quantificar o DNA de *Leishmania* por PCR em tempo real ao mesmo tempo em que se identifica a espécie de *Leishmania*. Os autores dos dois trabalhos discutem qual é a melhor metodologia para se detectar DNA de *leishmania* por PCR e qual o melhor gene (cópia única ou cópia múltipla): a utilização de um alvo de cópia única possibilita a quantificação precisa do número de parasitas, porém sua detecção em concentrações baixas de parasita torna esta possibilidade mais difícil. Por outro lado, a utilização de genes presentes em cópias múltiplas torna a técnica mais sensível. Selvapandiyan e colaboradores (2008) ainda ressaltam a importância de selecionar o gene adequado de acordo com o objetivo do trabalho, quantificar o parasita ou detectar a presença do seu DNA. Já que a carga parasitária em pacientes assintomáticos é descrita como baixa, cerca de 8 *leishmanias*/mL. O PCR em tempo real com um gene de poucas cópias tende a falhar na hora de detectar cargas parasitárias baixas, por apresentar uma dispersão randômica e gerando um sinal que é detectado junto ao “background” das amostras (SCHULZ *et al.*, 2003).

Oliveira e colaboradores (2005) utilizaram como alvo o kDNA (que apresenta 10.000 cópias por parasitas) em PCR convencional e conseguiram amplificar o DNA de *Leishmania* em amostras de pacientes com *leishmaniose mucosa*. De fato, o kDNA foi empregado como alvo de amplificação em diferentes estudos de diagnóstico de *Leishmania* (MARY *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SCHALLIG & OSKAM, 2002; TUPPERWAR *et al.*, 2008). Então resolvemos testar a positividade das amostras soropositivas no PCR convencional, empregando-se o kDNA. No nosso resultado de PCR convencional demonstrou que entre os doadores soro positivos, 73% amplificaram o kDNA do parasita. Moreno e colaboradores (2006), estudando a população assintomática de Minas Gerais detectaram uma

soropositividade de 6.4% para o ELISA junto com RIFI. Os autores também avaliaram a amplificação do kDNA por PCR convencional e consideraram falso positivo todos os resultados cuja sorologia positiva foi acompanhada de PCR negativo. Considerando-se o PCR baseado na amplificação de kDNA um método mais sensível na detecção dos assintomáticos, teríamos, no presente estudo, 10 doadores falso positivos, ou seja, cujo resultado de ELISA foi positivo mas o resultado do PCR convencional.

A D.O do teste sorológico comparado com o resultado do PCR demonstra que não existe uma correlação entre o nível de anticorpo anti-Leishmania produzido e a presença do DNA do parasito. Mary e colaboradores (2004) estabeleceram a correlação entre “*score* clínico” e carga parasitária, cujos pacientes assintomáticos apresentavam carga parasitária baixa e o DNA de Leishmania muitas vezes não foi identificado pelo *Westernblot*, podendo estas pessoas estarem entrando em contato com parasito desenvolvendo uma resposta imune e não apresentar o parasito circulante, uma vez que o DNA de parasitas mortos também pode ser amplificado por PCR. Isto torna necessário um estudo maior sobre a sorologia e a pesquisa do DNA do parasito na população assintomático.

Scarlat e colaboradores (2008a), em estudo com doadores de sangue assintomáticos na Sicilia recomendaram que, independente do resultado do PCR, as amostras de doadores soro positivas sejam filtrados por leucodepleção antes de serem transfusionadas, para evitar possíveis riscos de infecção. Cardo e colaboradores (2006b), sugeriram inativação das bolsas de sangue por radiação ultravioleta. Urias e colaboradores (2009) recomendaram o descarte de amostras soro positivas ou a utilização das bolsas de forma autóloga, pois o risco de infecção ainda não é conhecido. Mendes-Takao e colaboradores (2010), em seu estudo da legislação (ANVISA RES-153 de 2004) sobre a utilização de sangue do cordão umbilical mencionou que o Estado tem como uma de suas missões essenciais a proteção e a preservação da saúde publica, sendo a utilização de sangue não comprovado como sadio não recomendado. No entanto, o sistema de triagem não inclui Leishmania, o que impossibilita a classificação dos doadores e possível descarte das bolsas sob este aspecto.

Costa e colaboradores (2000) estudaram a possibilidade de existir reservatórios humanos assintomáticos no nordeste do Brasil: dos 151 indivíduos positivos para o teste de Montenegro, 28 apresentaram PCR positivo. Outro dado importante deste trabalho é que entre indivíduos positivos para a reação de PCR, nenhum apresentou xenodiagnóstico positivo, ou seja, não foi possível infectar flebótomos. Segundo o autor, os indivíduos não possuíam carga parasitária elevada e capaz de infectar o inseto vetor. No entanto, uma possível imunossupressão poderia elevar a carga parasitária desses indivíduos e os mesmos atuariam

então como reservatório da doença.

A transmissão por transfusão de sangue já foi estudada experimentalmente por: Grogl e colaboradores (1993) repassaram o sangue de hamsters infectados para animais sadios e, assim, transmitiram a doença. Por Palatnik e colaboradores (1996) também conseguiram confirmar este método de infecção em hamster. Owens e colaboradores (2001) estabeleceram a infecção transfundindo sangue de cães soro positivo para cães anêmicos. Todos os autores demonstraram que é possível estabelecer uma infecção em modelos experimentais. Este tipo de transmissão por transfusão de sangue já foi relatada em humanos por DEY & SINGH (2006), na Índia durante a transfusão de sangue de uma mãe para o seu filho. Depois de 2 meses a mãe foi a óbito por calazar e o filho apresentou parasitas na medula óssea. No Brasil, LUZ e colaboradores (1997), acompanharam os soros positivos para Leishmaniose por 5 meses em seu trabalho, viram que 4 doadores que apresentavam o anticorpo anti-Leishmania contraíram leishmaniose visceral.

Almeida e colaboradores (1996) descrevem em modelos experimentais murinos, que para o organismo desenvolver uma resposta celular contra a Leishmania é necessário um inóculo mínimo de pelo menos 100 parasitas. Corroborando a estas idéias Aebischer e colaboradores (1993) comprovaram que o desenvolvimento de sinais clínicos na leishmaniose cutânea depende de uma quantidade mínima de parasitas, podendo os animais experimentais viverem assintomáticos por um longo período de tempo, caso sejam inoculados com baixo número de parasitas.

Apesar de termos quantificado o DNA de Leishmania por PCR Realtime em três doadores, cuja carga parasitária foi muito baixa e, portanto, não é possível determinar com exatidão se seria capaz de estabelecer a doença em um doador. Segundo Grogl e colaboradores (1993), seriam necessários pelo menos 12 parasitas ou 4 monócitos infectados para contaminar uma bolsa de sangue resistindo por até 30 dias, em sangue conservado a 4°C. Além disso, não temos como determinar se os parasitas estão vivos dentro das bolsas de sangue.

A população de doadores do presente estudo apresenta um perfil epidemiológico diferente das demais áreas endêmicas do mundo, pois os doadores assintomáticos apresentaram uma carga parasitária pequena e, em paralelo, anticorpos específicos contra Leishmania e positividade para a reação de PCR utilizando o kDNA. Assim, os riscos de contaminação por transfusão de sangue ainda precisam ser investigados, existindo a necessidade de se discutir a triagem sorológica contra leishmania nos bancos de sangue pelo menos nas áreas endêmicas do Brasil.



## VIII. CONCLUSÕES

- A soro prevalência do anticorpo anti-*Leishmania* na população doadora de sangue da HEMOBA/SESAB é de 5,4%;
- O SLA de *Leishmania chagasi* é mais específico e sensível que o SLA de *Leishmania amazonensis*, na detecção do anticorpo anti-*Leishmania* pelo ELISA indireto;
- A aplicação do gene de cópia múltipla é mais sensível na detecção de cargas parasitárias baixas, sendo possível a amplificação do DNA de *Leishmania* em doadores assintomáticos.
- Devido ao risco de contaminação dos bancos de sangue, a prevalência de 5,4% do anticorpo anti-leishmania na população doadora de sangue e a presença do DNA do parasito em nosso meio, torna se necessário o estabelecimento de medidas preventivas, informativas e estudos, para elucidar a possibilidade de transmissão de leishmania nas áreas endêmicas do Brasil.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBISCHER, T.; MOODY, S. F.; HANDMAN, E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun*, v. 61, n. 1, p. 220-226. 1993.

ALMEIDA, M. C.; CUBA-CUBA, C. A.; MORAES, M. A.; MILES, M. A. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol*, v. 115, n. 3, p. 311-316. 1996.

ANDRADE, A. L. S. S.; MARTELLI, C. M. T. M.; PINHEIRO, E. D.; SANTANA, C. L.; BORGES, F. P.; ZICKER, F. RASTREAMENTO SOROLÓGICO PARA DOENÇAS INFECCIOSAS EM BANCO DE SANGUE COMO INDICADOR DE MORBIDADE POPULACIONAL. *Rev. Saúde Públ*, v. 23, n. 1, p. 20-25. 1989.

BASSET, D.; FARAUT, F.; MARTY, P.; DEREURE, J.; ROSENTHAL, E.; MARY, C.; PRATLONG, F.; LACHAUD, L.; BASTIEN, P.; DEDET, J. P. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect*, v. 7, n. 13, p. 1370-1375. 2005.

BOAVENTURA, V. S.; CAFE, V.; COSTA, J.; OLIVEIRA, F.; BAFICA, A.; ROSATO, A.; DE FREITAS, L. A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v. 75, n. 2, p. 267-269. 2006.

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J. F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 8, n. 4, p. 828-831. 2001.

BRIGIDA, R. Estudo comparativo de diferentes substratos antigênicos de *Leishmania* spp (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) utilizando teste imunoenzimático Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), no diagnóstico laboratorial sorológico das leishmanioses. *Dissertação de Mestrado Universidade do Estado do Amazonas*, v., n., p. 2004.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg*, v. 18, n. 4, p. 500-505. 1969.

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

CARDO, L. J. Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy). *Transfus Apher Sci*, v. 34, n. 2, p. 233-234. 2006b.

CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDON, A. J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol*, v. 27, n. 2, p. 176-186. 1983.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using

glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of Leishmania species. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 2, p. 540-546. 2003.

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

COSTA, C. H.; GOMES, R. B.; SILVA, M. R.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K.; SANTOS, R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Competence of the human host as a reservoir for Leishmania chagasi. *J Infect Dis*, v. 182, n. 3, p. 997-1000. 2000.

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.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Asymptomatic human carriers of Leishmania chagasi. *Am J Trop Med Hyg*, v. 66, n. 4, p. 334-337. 2002.

COSTA, J. M.; VALE, K. C.; FRANCA, F.; SALDANHA, A. C.; DA SILVA, J. O.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D.; MAGALHAES, A. V.; E SILVA, C. M.; SERRA NETO, A.; ET AL. [Spontaneous healing of leishmaniasis caused by Leishmania viannia braziliensis in cutaneous lesions]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 23, n. 4, p. 205-208. 1990.

COSTA, J. M. L. Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 75, n. 1, p. 3-17. 2005.

CRUZ, I.; MORALES, M. A.; NOGUER, I.; RODRIGUEZ, A.; ALVAR, J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, v. 359, n. 9312, p. 1124-1125. 2002.

CUBA CUBA, C. A.; MARSDEN, P. D.; BARRETO, A. C.; ROCHA, R.; SAMPAIO, R. R.; PATZLAFF, L. [Parasitologic and immunologic diagnosis of American cutaneous leishmaniasis]. *Bol Oficina Sanit Panam*, v. 89, n. 3, p. 195-208. 1980.

CUMMINS, D.; AMIN, S.; HALIL, O.; CHIODINI, P. L.; HEWITT, P. E.; RADLEY-SMITH, R. Visceral leishmaniasis after cardiac surgery. *Arch Dis Child*, v. 72, n. 3, p. 235-236. 1995.

DE OLIVEIRA CAMERA, P.; JUNGER, J.; DO ESPIRITO SANTO SILVA PIRES, F.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Haematogenous dissemination of Leishmania (Viannia) braziliensis in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 100, n. 12, p. 1112-1117. 2006.

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.

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.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; ANDRADE, L. R.; DIETZE, R.; LEMOS, E.; BELLI, A.; FAVORETO JUNIOR, S.; FERREIRA, M. S. Serological reactivity of different antigenic preparations of Leishmania (Leishmania) amazonensis and the Leishmania braziliensis complex. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, n. 2, p. 135-141. 2008.

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.

GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, v. 6, n. 3, p. 230-250. 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 blood products maintained under blood bank conditions. *Am J Trop Med Hyg*, v. 49, n. 3, p. 308-315. 1993.

GUEVARA, P.; RAMIREZ, J. L.; ROJAS, E.; SCORZA, J. V.; GONZALEZ, N.; ANEZ, N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. *Lancet*, v. 341, n. 8856, p. 1341. 1993.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, v. 10, n. 4, p. 413-417. 1992.

IBORRA, S., M. SOTO, ET AL. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. v. 22, n.29-30, p. 3865-76. 2004.

LE FICHOUX, Y.; QUARANTA, J. F.; AUFEUVRE, J. P.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 6, p. 1953-1957. 1999.

LUZ, K. G.; DA SILVA, V. O.; GOMES, E. M.; MACHADO, F. C.; ARAUJO, M. A.; FONSECA, H. E.; FREIRE, T. C.; D'ALMEIDA, J. B.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE SOUSA, C. B. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. *Am J Trop Med Hyg*, v. 57, n. 2, p. 168-171. 1997.

MARSDEN, P. D.; TADA, M. S.; BARRETO, A. C.; CUBA, C. C. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 78, n. 4, p. 561-562. 1984.

MARY, C.; FARAUT, F.; DROGOUL, M. P.; XERIDAT, B.; SCHLEINITZ, N.; CUISENIER, B.; DUMON, H. 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, n. 5, 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, n. 11, p. 5249-5255. 2004.

MENDES-TAKAO, M. R.; XIMENA, M. R.; DIAZ-BERMÚDEZ, X. P.; DEFFUNE, E.; SANTIS, G. C. Private umbilical cord blood banks for family use, in Brazil - technical, legal and ethical issues for an implementation analysis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 32, n. 4, p. 317-328. 2010.

MORENO, E. C.; MELO, M. N.; LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, A. S.; ANTUNES, C. M.; GENARO, O.; CARNEIRO, M. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 39, n. 5, p. 421-427. 2006.

MPAKA, M. A.; DANIL, Z.; KYRIAKOU, D. S.; ZAKYNTHINOS, E. Septic shock due to visceral leishmaniasis, probably transmitted from blood transfusion. *J Infect Dev Ctries*, v. 3, n. 6, p. 479-483. 2009.

OLIVEIRA, J. G.; NOVAIS, F. O.; DE OLIVEIRA, C. I.; DA CRUZ JUNIOR, A. C.; CAMPOS, L. F.; DA ROCHA, A. V.; BOAVENTURA, V.; NORONHA, A.; COSTA, J. M.; BARRAL, A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop*, v. 94, n. 1, p. 55-59. 2005.

OLIVEIRA, T. M.; FURUTA, P. I.; DE CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 17, n. 1, p. 7-11. 2008.

OMS. Leishmaniasis. 2010 2010.

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 *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. *Am J Trop Med Hyg*, v. 62, n. 1, p. 128-131. 2000.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T. J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, v. 219, n. 8, p. 1076-1083. 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; PARAGUAI-DE-SOUSA, E.; GOMES, E. M.; SOARES-MACHADO, F. C.; LUZ, K. G.; BOROJEVIC, R. Transmission of visceral leishmaniasis by blood transfusion in hamsters. *Braz J Med Biol Res*, v. 29, n. 10, p. 1311-1315. 1996.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v. 22, n. 1, p. 1-13. 1996.

QUISPE-TINTAYA, K. W.; LAURENT, T.; DECUYPERE, S.; HIDE, M.; BANULS, A. L.; DE DONCKER, S.; RIJAL, S.; CANAVATE, C.; CAMPINO, L.; DUJARDIN, J. C. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis*, v. 192, n. 4, p. 685-692. 2005.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 1, p. 21-25. 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, v. 7, n. 9, p. 581-596. 2007.

RIERA, C.; FISA, R.; LOPEZ-CHEJADE, P.; SERRA, T.; GIRONA, E.; JIMENEZ, M.; MUNCUNILL, J.; SEDENO, M.; MASCARO, M.; UDINA, M.; GALLEGO, 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, n., p. 115-130. 2005.

SARAVIA, N. G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M.; HOLGUIN, A. F.; NAVAS, C.; PALMA, G.; WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 159, n. 4, p. 725-735. 1989.

SCARLATA, F.; LI VECCHI, V.; ABBADESSA, V.; GIORDANO, S.; INFURNARI, L.; SAPORITO, L.; MANCUSO, S.; OCCHIPINTI, F.; VITALE, F.; REALE, S.; TITONE, L. [Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors and HIV+ patients living in an endemic area]. *Infez Med*, v. 16, n. 1, p. 21-27. 2008a.

SCARLATA, F.; VITALE, F.; SAPORITO, L.; REALE, S.; VECCHI, V. L.; GIORDANO, S.; INFURNARI, L.; OCCHIPINTI, F.; TITONE, L. Asymptomatic *Leishmania infantum*/chagasi infection in blood donors of western Sicily. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 102, n. 4, p. 394-396. 2008b.

SCHALLIG, H. D.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health*, v. 7, n. 8, p. 641-651. 2002.

SCHULZ, A.; MELLENTHIN, K.; SCHONIAN, G.; FLEISCHER, B.; DROSTEN, C. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 4, p. 1529-1535. 2003.

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.

SHULMAN, I. A. Parasitic infections and their impact on blood donor selection and testing. *Arch Pathol Lab Med*, v. 118, n. 4, p. 366-370. 1994.

SINGH, S.; CHAUDHRY, V. P.; WALI, J. P. Transfusion-transmitted kala-azar in India. *Transfusion*, v. 36, n. 9, p. 848-849. 1996.

SOUZA, R. M.; DE OLIVEIRA, I. B.; PAIVA, V. C.; LIMA, K. C.; DOS SANTOS, R. P.; DE ALMEIDA, J. B.; LUZ, K. G. Presence of antibodies against *Leishmania chagasi* in haemodialysed patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 103, n. 7, p. 749-751. 2009.

TUPPERWAR, N.; VINEETH, V.; RATH, S.; VAIDYA, T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 61, n. 1, p.

23-30. 2008.

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., n. 2009, p. 1-7. 2009.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. K. Cross-reactivity of antibodies in human infection by kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viania) braziliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*, v. 38, n. 3, p. 177-185. 1996.

VIEIRA, M. L.; JACOBINA, R. R.; SOARES, N. M. Cases of Leishmaniasis in Patients Treated in Health Centers and hospitals in Jacobina, Bahia, Brazil, From 2000 to 2004. *Revista Bahiana de Saude publica*, v. 31, n. 1, p. 2007.

WORTMANN, G.; SWEENEY, C.; HOUNG, H. S.; ARONSON, N.; STITELER, J.; JACKSON, J.; OCKENHOUSE, C. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, v. 65, n. 5, p. 583-587. 2001.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*, v. 132, n. 1, p. 1-16. 2003.

## **X. APENDICES**

### **X.I. Apendice 01.**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar do estudo chamado: **Avaliação do risco de transmissão de *Leishmania* por doadores de sangue com infecção assintomática, em áreas endêmicas para leishmaniose na Bahia**”, que será realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA.

A leishmaniose visceral é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania*. A infecção pode ocorrer sem manifestações clínicas e tem sido descrita transmissão por transfusão. Nosso trabalho tem como objetivo detectar a presença de *Leishmania* em doadores de sangue, na Bahia. Nesta pesquisa vamos fazer dois exames laboratoriais para detectar portadores de leishmaniose assintomáticos.

A sua participação é totalmente voluntária. Os registros da sua participação serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais do teste, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução CNS 340/2004, item V.1.e.

A sua anuência sobre a participação no estudo implica na permissão para a retirada de 5 ml de sangue, quantidade igual a uma colher de sopa cheia, para que possamos realizar as dosagens e o estudo do DNA. Também queremos que você concorde ou não que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, além de contribuir para conhecimentos novos relacionados à doença.

A sua participação no estudo poderá trazer benefícios futuros tais como a implantação medidas de proteção para os hemocentros. Caso consinta com a participação no estudo e



diante da sua concordância, você deverá assinar uma cópia do presente termo. Você teve todas as explicações sobre o projeto e receberá uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Esse estudo será desenvolvido na FIOCRUZ e HEMOBA/SESAB, Instituições públicas brasileiras

Assinatura do responsável \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Nome do responsável (letra de forma) \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Testemunha 1 \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Testemunha 2 \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Dr<sup>a</sup> Camila Indiani de Oliveira - Coordenadora do projeto - Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2211.

Kiyoshi Ferreira Fukutani - Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2286.

Marcelo Ramos- Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos- Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz- FIOCRUZ-BA. Fone (71) 3176-2285.

## X.II. Apêndice 02.



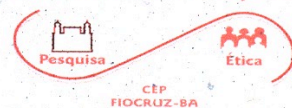
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Comitê de Ética em Pesquisas



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

### PARECER Nº 215/2010

**Protocolo: 322**

**Projeto de Pesquisa: “Pesquisa de prevalência de leishmaniose em doadores de sangue assintomáticos na cidade de Salvador”.**

**Pesquisador(a) Responsável: Drª Camila Indiani Oliveira**

**Instituição ou Departamento: LIP/CPqGM-FIOCRUZ**

#### **Considerações:**

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado.

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios semestral e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

**Vigência: 28/01/2010 a 28/01/2012**

**Envio de Relatório Anual em: 28/01/2011**

**Relatório Final: 28/02/2012**

*The present study, entitled “Pesquisa de prevalência de leishmaniose em doadores de sangue assintomáticos na cidade de Salvador” (protocol number 322) has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (IORG00002090 / IRB000026120) in January 28<sup>th</sup> 2010 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2008. In the present version, this project is licensed and valid until January 28<sup>th</sup> 2012.*

Salvador, 28 de janeiro de 2010.

**Drª Maria Fernanda Rios Grassi**

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

CPqGM/FIOCRUZ

IORG-0002090 / IRB-00002612