



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

LANA SOFIA ALCÂNTARA DA SILVA AZEVEDO

DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA* SPP. EM DOADORES DE SANGUE

RECIFE

2024

LANA SOFIA ALCÂNTARA DA SILVA AZEVEDO

Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em doadores de sangue

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco em cumprimento a disciplina Estágio Curricular Obrigatório II, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Neide Kazue Sakugawa Shinohara

Supervisor: Prof, Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Jr

RECIFE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A994d

Azevedo, Lana

Deteção de DNA de Leishmania spp. em doadores de sangue / Lana Azevedo. - 2024.
28 f. : il.

Orientador: Neide Kazue Sakugawa Shinohara.
Coorientador: Manoel Sebastiao da Costa Lima Jr.
Inclui referências e apêndice(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2025.

1. Leishmania. 2. Leishmaniose visceral. 3. flebotomíneos. 4. transfusão sanguínea . 5. infecção assintomática. I. Shinohara, Neide Kazue Sakugawa, orient. II. Jr, Manoel Sebastiao da Costa Lima, coorient. III. Título

CDD 574

LANA SOFIA ALCÂNTARA DA SILVA AZEVEDO

DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA* SPP. EM DOADORES DE SANGUE

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, avaliada no dia

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Neide Kazue Sakugawa Shinohara (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Yone Vila Nova Cavalcanti (Membro Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Neyvan Renato Rodrigues da Silva (Membro Titular)
IFPE- Cabo de Santo Agostinho

Victor casimiro piscocoya (Suplente)
DTR/UFRPE

RECIFE – PE

2024

Dedico este trabalho a quem
sempre me incentivou a escrever,
meu avô (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Gratidão primeiramente aos meus pais e minha irmã pelo apoio e incentivo.

Gratidão à minha orientadora (Neide Shinohara) pelo auxílio na execução deste trabalho, e homenageando-a agradeço também ao meu coorientador (Manoel Lima) por dar início a esta pesquisa e por demais oportunidades no Instituto Aggeu Magalhães (IAM) FIOCRUZ-PE junto a isto, agradeço também à mestra Luiza Yeda que esteve comigo em toda a pesquisa me ensinando cada passo para minha evolução e então desenvolvimento da presente pesquisa. Agradeço assim a todos que contribuíram com algo para nossa pesquisa na Fundação Oswaldo Cruz.

Gratidão aos meus professores de curso que tenho um carinho imenso principalmente àqueles que tiveram toda a paciência do mundo para me ensinar com mais calma.

Gratidão também por todos os funcionários do prédio de biologia.

Gratidão por meus amigos e colegas de curso que permaneceram comigo nessa jornada e aos que passaram por ela também, como Priscila que foi minha parceira de aulas e de tudo nessa vida por um bom tempo. Agradeço também ao meu grupinho com Wyllyane, Daniel e Alex que me ajudaram diversas vezes com tudo pela universidade e também a muitos outros que fizeram meus dias serem mais alegres durante toda essa caminhada que não foi nada fácil.

Gratidão à quem me ajudou bastante na escrita e desenvolvimento deste presente estudo, agradeço a Marcello Mello, um grande professor que mesmo não sendo do curso pôde me ajudar em uma grande maioria para esta pesquisa ser desenvolvida e assim finalmente acontecer. Agradeço também à Fernanda por correções e envio de modelos para uma melhor ajuda na escrita e entendimento de regras.

Agradeço então principalmente a quem mais me apoiou e me fez tirar forças que já não existiam mais dentro de mim, quem não me deixou desistir, meu namorado Alberto e meu avô que mesmo não estando presente em corpo, posso sentir em alma toda a força e energia que sei que ele me manda todo dia de algum lugar.

“Nós nunca descobriremos o que vem depois da escolha, se não tomarmos uma decisão. Por isso, entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos.”

CARROLL, L., Alice no País das Maravilhas

RESUMO

Este artigo aborda as principais formas de transmissão das leishmanioses, uma antropozoonose transmitida por flebotomíneos do gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral (LV) está incluída na lista nacional de doenças e agravos de notificação compulsória, de acordo com o Ministério da Saúde. Após discutirmos a expansão da leishmaniose para áreas urbanas, exploramos também diferentes formas de transmissão, incluindo transfusão sanguínea e compartilhamento de seringas. A infecção assintomática também é abordada, especialmente em relação à doação de sangue, evidenciando sua relevância no contexto da saúde pública. Estratégias de controle, como tratamento de casos humanos e combate ao vetor, são evidências, ressaltando desafios e limitações. O artigo inclui um estudo de caso em Recife-PE, destacando a importância do rastreamento eficiente em doadores de sangue para prevenir a transmissão. A metodologia do estudo é detalhada, envolvendo coleta de dados, extração de DNA e análises moleculares. Os resultados indicam a necessidade de melhoria de métodos de diagnóstico para garantir a identificação eficaz da *Leishmania*. Por fim, o presente estudo conclui reforçando a importância de ações efetivas no controle da leishmaniose e destaca a necessidade de pesquisas futuras para superar os desafios existentes.

Palavras-chave: *Leishmania*. Leishmaniose visceral. flebotomínios. Transfusão sanguínea. Infecção assintomática.

ABSTRACT

This article addresses the main transmission routes of leishmaniasis, an anthroponosis transmitted by phlebotomine sandflies of the genus *Leishmania*. Visceral leishmaniasis (VL) is included in the national list of reportable diseases and health problems, according to the Ministry of Health. After discussing the expansion of leishmaniasis to urban areas, we also explore different transmission modes, including blood transfusion and needle sharing. Asymptomatic infection is also addressed, especially concerning blood donation, highlighting its relevance in the context of public health. Control strategies, such as treating human cases and combating the vector, are emphasized, highlighting challenges and limitations. The article includes a case study in Recife-PE, highlighting the importance of efficient screening of blood donors to prevent transmission. The study methodology is detailed, involving data collection, DNA extraction, and molecular analyses. The results indicate the need for improved diagnostic methods to ensure effective identification of *Leishmania*. Finally, this study concludes by reinforcing the importance of effective actions in leishmaniasis control and highlighting the need for future research to overcome existing challenges.

Keywords: *Leishmania*. Visceral leishmaniasis. Sandflies. Blood transfusion. Asymptomatic infection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 COLETA DE MATERIAL	16
4.2 TESTE SOROLÓGICO (ELISA)	16
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA	17
4.4 PCR CONVENCIONAL (INTEGRIDADE)	17
4.5 PCR EM TEMPO REAL	17
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, cuja a família é *Trypanosomatidae*, causado pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitidos para os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, cujo qual também são insetos hematófagos que estão presentes principalmente na zona rural. As Leishmanioses já afetaram 12 milhões de pessoas em 98 países, com cerca de 1,3 milhões de novos casos e 20 a 40 mil mortes por ano (OMS, 2018; Galvis-Ovallos et al.). De acordo com a OMS (2019) São consideradas um grande problema de saúde pública, encontram-se entre as endemias consideradas prioritárias no mundo, e podem variar desde manifestações clínicas discretas até graves. Os principais reservatórios da doença em vertebrados estão inclusos os cães, raposas e outros mamíferos e pessoas infectadas pelo parasita (Costa, 2011).

De acordo com a OMS (2023) a doença afeta principalmente a população mais empobrecida e sua gravidade está associada às más condições de habitação e déficit de esgoto sanitário (falta de gestão de resíduos ou de esgotos a céu aberto) podendo aumentar os locais de reprodução e de repouso dos flebotomíneos, bem como o seu acesso aos seres humanos. A enfermidade pode ter três apresentações principais: *Leishmania cutânea* (LC), sendo a mais comum entre as Leishmanioses por ser uma doença de caráter infeccioso e não contagiosa que afeta tanto o homem como diversas espécies de animais silvestres e domésticos, produzindo principalmente lesões ulcerativas que deixam cicatrizes pelo resto da vida. (MURBACK et al., 2011). *L. MucoCutânea* (LMC) onde caso não tratada, pode levar à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz e da boca, podendo causar grave incapacidade.

Enquanto a *L. Visceral* (LV), também conhecida como Calazar é caracterizada quando o parasito se dissemina para órgãos como medula, baço e fígado, adquirindo um aspecto visceralizante, considerada de maior risco por desencadear as manifestações clínicas mais graves e/ou fatais. (FOGANHOLI; ZAPPA, 2011). A espécie endêmica que causa a maioria dos casos da Leishmaniose visceral no Brasil é a *Leishmania infantum*.

Em média de 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorrem em todo o mundo anualmente segundo a (WHO, 2022) com apenas 25-45% notificados à OMS. As fatalidades decorrentes da Leishmaniose Visceral (LV) resultam de diversos fatores, como, diagnóstico tardio, presença de comorbidades e também a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A coinfeção da leishmaniose e do HIV é um importante problema de saúde pública global por essa infecção aumentar o risco de desenvolvimento da LV de 100 a 2.320 vezes em áreas

endêmicas. Tornando uma maior dificuldade do combate à doença por atuarem como potentes disseminadores. Esses pacientes apresentam maiores chances de desenvolverem a LV, além de sintomas mais graves e cargas parasitárias. (Alvar, et al.,2008). A *Leishmania* e HIV acabam promovendo a ativação um do outro, causando deficiência imune do hospedeiro, o que causa uma falha no tratamento, alta recidiva e alta taxa de mortalidade (LINDOSO, 2016; ALEMAYEHU, 2017).

Embora a forma mais comum da transmissão da leishmaniose seja através da picada de flebotomíneos fêmeas; contudo foram relatadas outras formas de transmissões do parasita, como a transmissão congênita e parenteral (por meio do compartilhamento de agulhas por pessoas que usam drogas) caracterizado como um ciclo alternativo o qual a seringa substitui o vetor e ocorre a transmissão direta das formas amastigotas OPAS (2023). Apesar de se manifestar de diferentes formas, a leishmaniose pode se mostrar assintomática em alguns indivíduos infectados portadores de uma carga parasitária baixa com até oito parasitas por mL de sangue, os indivíduos assintomáticos são aqueles que não apresentam sinais e sintomas clínicos (SELVAPANDIYAN et al., 2008).

Ainda não há relatos científicos da transmissão direta de pessoa para pessoa. Segundo Dey e Singh (2006), o parasita tem a capacidade de sobreviver ao armazenamento do banco de sangue, o que confirma a possível transmissão por transfusão sanguínea. Entretanto, apesar desse cenário de possível contágio, a LV ainda não é considerada uma doença de risco nas agências de banco de sangue no Brasil (BRASIL, 2004).

Embora a *Leishmania* spp seja considerada parasita intracelular obrigatória, alguns estudos têm relatado a sua presença em livre circulação na corrente sanguínea (DS Kyriakou et al.;2003, T. Jiménez-Marco et al.; 2018), cultivando-se o sangue de candidatos à doação, demonstrando assim a viabilidade dos parasitos e a possibilidade de iniciar a infecção no receptor (C.RIERA et al.; 2004).

O objetivo desta pesquisa foi investigar a possibilidade da transmissão transfusional da Leishmaniose, uma vez que uma parcela de doadores de sangue são portadores assintomáticos por *Leishmania* spp. (FERREIRA-SILVA, M. M.; TEIXEIRA, L. A. S.; 2018). Diante do risco da presença do parasita da *Leishmania* spp. nos doadores dos bancos de sangue, torna-se necessário a investigação e a identificação dos portadores assintomáticos, com o intuito de diminuir o risco de transmissão transfusional da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No mundo, a leishmaniose é descrita como uma doença negligenciada, com uma vasta expansão e distribuição mundial, reivindicando olhares como um grande problema de saúde pública e da vigilância epidemiológica. O processo de reconfiguração dos espaços urbanos, a devastação ambiental, os movimentos migratórios, aliados às condições precárias de vida da população, incluindo casos de desnutrição, o surgimento de áreas de habitação precária e a carência de infraestrutura de saneamento básico, têm contribuído para a disseminação da leishmaniose visceral (LV) dos ambientes de risco para as áreas urbanas e outras regiões do Brasil. (GONTIJO & MELO, 2004; OMS, 2010).

A leishmaniose visceral (LV) era primariamente uma zoonose predominantemente considerada uma enfermidade associada a ambientes silvestres ou rurais. Contudo, ao longo das últimas décadas, observou-se uma marcante transição para áreas urbanas. Ademais, a ausência de políticas concertadas com os países limítrofes do Brasil também figura como um fator relevante na propagação da *Leishmania infantum*. Nesse contexto, as rotas de transmissão delineiam os múltiplos fatores de risco envolvidos na dispersão da doença (SINAN 2019).

Em 1948 na China o estudo de Chung e colaboradores, relatou que uma mãe assintomática pouco depois de doar 20 mL do seu sangue para suas duas crianças, como profilaxia para a prevenção de sarampo, apresentou sintomas como: distensão do abdômen, palidez e febre, após 1 mês recebeu o diagnóstico de leishmaniose visceral. Nove meses depois da transfusão foi visto que as crianças desenvolveram a doença. Esse foi o primeiro trabalho relatando uma transmissão via transfusão sanguínea sendo diagnosticadas pelo método parasitológico.

O primeiro relato de infecção assintomática por leishmaniose visceral no mundo ocorreu em 1974, quando foram descritos casos na região Emilia-Romagna (Itália) após um surto da doença (PAMPIGLIONE *et al.*, 1974).

Em 2000, surgiu o primeiro caso humano de LV em Assunção, no Paraguai, ameaçando o sul do Brasil e o norte da Argentina. Até 2006, foram registrados 126 casos em humanos, diversos casos em cães e a presença do vetor, *Lutzomyia longipalpis*, foi confirmado no Paraguai. Apesar dos registros anteriores de casos autóctones de LV em algumas províncias argentinas, a doença não era reconhecida como endêmica no país e não havia relatos de casos humanos no sul do Brasil. Entretanto, em maio de 2006, ocorreu um surto de LV na Argentina, com o primeiro registro sendo de um menino de oito anos, tornando assim o primeiro caso autóctone na cidade de Posadas, em Misiones (SALOMÓN *et al.*, 2008).

No Brasil, o primeiro relato de ocorrência de doadores com *Leishmania* foi descrito em Natal, capital do estado do Rio Grande do Norte - NE. O estudo foi feito com 1.194 doadores de sangue, com uma soro prevalência de 9,0% identificados a partir do teste de ELISA (Enzima Imuno Ensaio) (LUZ et al., 1997). Vários outros estudos foram feitos no Brasil para determinar a prevalência de infecção assintomática por *Leishmania* em doadores de sangue (FRANÇA et al., 2013; MONTEIRO, 2013; PEDROSA, 2016; SILVA, 2018).

Na região Nordeste do Brasil, exclusivamente entre os anos de 2010 e 2019, o total de ocorrências de LV (19.913) ultrapassou o registrado em todas as outras regiões (16.448). Desde 2010, o Nordeste responde por 54,76% dos casos humanos de LV no Brasil, com uma média de 1.991,3 casos entre 2010 e 2019 (BRASIL 2020).

No período de 2001-2021, houve 69.665 casos novos de leishmaniose visceral na Região das Américas, com uma média anual de 2.488 casos. Entre os anos de 2001 e 2010, observou-se uma tendência crescente de casos de LV em toda a Região Americana, exceto na Colômbia. Entre 2011 e 2021, a tendência foi decrescente, sendo registrados 1.799 casos de LV em 2021, o que representa o menor número de casos nesses 21 anos (OPAS 2022). Após a OPAS, 2023 comparar 2017 com 2022, foi possível verificar uma queda de 35% no número total de unidades do segundo nível administrativo subnacional com transmissão de LV, porém foi observado uma expansão geográfica, onde, dos 655 municípios com transmissão notificada em 2022, 411 são municípios anteriormente sem casos em 2017.

Segundo os dados do SINAN (SINAN, 2018; BRASIL 2019), Pernambuco é o quinto estado em prevalência de LV na Região Nordeste ficando atrás apenas do Maranhão, Ceará, Bahia e Piauí, nesta ordem, enquanto na região norte detém o maior número de casos da LC (CAVALCANTE, VALE, 2014; BRASIL, 2019).

Apesar da disseminação dos flebotomíneos por quase todas as regiões do Brasil, a falta do vetor em áreas onde ocorrem casos de leishmaniose visceral indica a possibilidade da existência de outros meios de transmissão da doença, como a transmissão via transfusão sanguínea (DANTAS-TORRES, 2009). Embora a transmissão de LV por transfusão já tenha sido confirmada, a doença não está incluída na lista de doenças investigadas para doação de sangue nos hemocentros brasileiros, mesmo após diversos estudos terem demonstrado que ela pode ocorrer principalmente se o doador apresentar infecção ativa. Entretanto, até mesmo doadores assintomáticos têm a capacidade de propagar a doença, mesmo em regiões onde ela não é comum (MORENO *et al.*, 2002). Além disso, a constatação de transmissão por essa via indica que os procedimentos de processamento e conservação usuais dos hemocomponentes

nos hemocentros não são suficientes para eliminar esse patógeno (DAS *et al.*, 2020; HIRATA *et al.* 2019).

Um estudo realizado na cidade de Campo Grande-MS (Centro-Oeste do Brasil) com uma população de 430 doadores de sangue, apresentou 15,6% de soroprevalência da LV, e ficou evidente a necessidade de implantação de métodos de diagnóstico nos bancos de sangue com o objetivo de excluir doadores soropositivos para *Leishmania* spp, que garantiria a segurança dos receptores (FRANÇA *et al.*, 2013). Em Monte Claros-MG verificou-se, por meio da sorologia, a prevalência de *Leishmania infantum* em 5,5% doadores de sangue assintomáticos sobre uma população de 421 indivíduos, demonstrando a necessidade de estabelecer melhores diagnósticos, de modo a assegurar uma triagem mais eficiente (URIAS *et al.*, 2009).

De acordo com um estudo realizado em Recife, Pernambuco, Silva (2018) foi observado uma prevalência de 6,2% da infecção assintomática por *Leishmania infantum* em doadores de sangue utilizando os métodos moleculares. Portanto, novos estudos são necessários para avaliar a sensibilidade e especificidade dessas técnicas, a fim de garantir um diagnóstico preciso e confiável da leishmaniose em doadores de sangue.

Relacionadas às estratégias de controle, existem três medidas que são amplamente utilizadas: o tratamento dos casos humanos; combate ao vetor; e a identificação e eliminação dos reservatórios domésticos de água parada que viabilizam o desenvolvimento do vetor. Todavia, estas medidas ainda são pouco efetivas e, conseqüentemente, causam dificuldades no desenvolvimento de ações para promoção da saúde e prevenção a esse tipo de doença (CARMO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

Para a identificação e investigação de doenças negligenciadas, como a Leishmaniose Visceral (LV), estão sendo empregadas abordagens moleculares que não apenas visam detectar o parasita, mas também compreender a diversidade das espécies de *Leishmania* e sua distribuição. Isso proporciona uma compreensão mais abrangente da ecoepidemiologia e das variações populacionais desses parasitas (GUERBOUJ *et al.*, 2014). Os métodos moleculares predominantes nesse contexto baseiam-se no uso de ácidos nucleicos do parasita. Ensaio como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou PCR quantitativo em tempo real (qPCR) têm sido validados para o diagnóstico da LV (Sundar; Rai, 2002; Sundar; Singh, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença de DNA de *Leishmania spp.* em amostras de sangue periférico de doadores de sangue aptos do HEMOPE de Caruaru.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair DNA de sangue periférico de doadores aptos;
- Identificar por meio da PCR em tempo real (qPCR) e ácido desoxirribonucleico (DNA) de *Leishmania* em sangue periférico de doadores de sangue do HEMOPE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho é um estudo observacional, transversal e descritivo, a partir de um projeto aprovado pelo comitê de ética do instituto Aggeu Magalhães. CAEE: (65770317.9.0000.5190).

As amostras foram fornecidas pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco HEMOPE, unidade Caruaru, e as análises moleculares foram realizadas na FIOCRUZ Instituto Aggeu Magalhães.

Por meio deste estudo foram alcançados dados referentes à presença/ausência da *Leishmania spp.*, analisando 100 amostras de sangue de doadores aptos para doação de sangue, segundo os critérios do HEMOPE/CARUARU, com pacientes maiores de 18 anos, excluindo os doadores que apresentaram teste sorológico positivo para alguma doença transmissível encontrada no banco de triagem do HEMOPE (HIV, IST, Hepatites B E C, Doença de Chagas, HTLV I e II).

Todos os doadores aptos para doação assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aceitando participar da pesquisa. Foi passado um breve questionário para os doadores com questões sobre: nome, cidade e se possuíam ou se já possuíram cachorro com a doença.

4.1 COLETA DE MATERIAL

As amostras foram coletadas durante os meses de novembro e dezembro de 2022 e janeiro e fevereiro de 2023, cada uma com cerca de 6ml de sangue, condicionados em tubos com ácido etileno diamina tetra acético (EDTA), previamente identificadas com o código de barra do doador. Após triagem laboratorial do banco de sangue, foram transferidos para um eppendorf, onde foram separadas em alíquotas de plasma e massa leucocitária ficando sobre refrigeração -80°C até serem analisadas.

4.2 TESTE SOROLÓGICO (ELISA)

O teste de Elisa foi realizado com plasma dos pacientes usando o kit BIOLISA-BIOCLIN[®], a metodologia seguiu de acordo com as recomendações do fabricante. Onde as amostras foram diluídas na proporção de 1:101 com a adição de 1000µl diluente da amostra e posteriormente incubadas por 45 minutos a 37°C. Posteriormente, os poços da placa de Elisa foram lavados em um total de 5 ciclos de lavagens e depois de secados foi adicionado 100µl de

Conjugado em cada poço. Uma nova incubação a 37°C por 30 min acontece e por fim coloca o substrato que também foi incubado a temperatura ambiente, sob proteção de luz. A leitura da placa foi realizada no aparelho com comprimento de onda de 450nm / 630nm em até 15 minutos (no máximo).

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico das amostras foi feita a partir de 300µl de sangue total periférico, contendo EDTA, realizada com a utilização do protocolo *in house* denominado “Protocolo Embrapa Gado de Corte” modificado, onde os reagentes para a extração são preparados e padronizados no laboratório.

4.4 PCR CONVENCIONAL (INTEGRIDADE)

As amostras foram submetidas a PCR de integridade (primers de β -actina – 10 pmol), o volume final da reação foi de 25 µL, sendo composta de tampão 1X, DnTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5mM, Taq Polimerase 0,2 u/µL, água 13,75 µL. No termociclador os ciclos foram de 95°C - 3 minutos, 35 ciclos de: 95°C - 40 segundos, 53°C - 1 min, 72°C - 1 min e extensão final de 72°C - 6 minutos, posteriormente foi realizado a eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X pH 8,0 a 150V e 400mA por 40 minutos, os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizado em luz ultravioleta, após a amplificação, as amostras são visualizadas usando a eletroforese em gel. Sendo assim, para fazermos a eletroforese em gel é utilizado brometo de etídeo e Blue/Orange Loading Dye que é usado junto as amostras de DNA nos poços de eletroforese em gel e rastrear a migração durante a eletroforese e visualização sob luz UV, onde observamos a corrida do gel.

Após esta etapa foi feita uma quantificação para garantir que a amostra atendessem aos critérios de quantidade e pureza adequados para evitar resultados imprecisos ou inviáveis. Essa quantificação de DNA, realizada no equipamento chamado NanoDrop (Thermofisher), utilizou espectrofotometria UV, medindo a quantidade de DNA em ng/uL e a relação 260/280 para avaliar a pureza. Uma amostra de qualidade possui pelo menos 500 ng/uL de DNA e uma relação 260/280 entre 1.7 e 1.9, assegurando uma boa quantidade de DNA e poucas impurezas de proteínas.

4.5 PCR EM TEMPO REAL

Para a realização da qPCR foi utilizado um ensaio descrito por Dantas-Torres e colaboradores (2016) com pequenas modificações. No presente trabalho de pesquisa foi

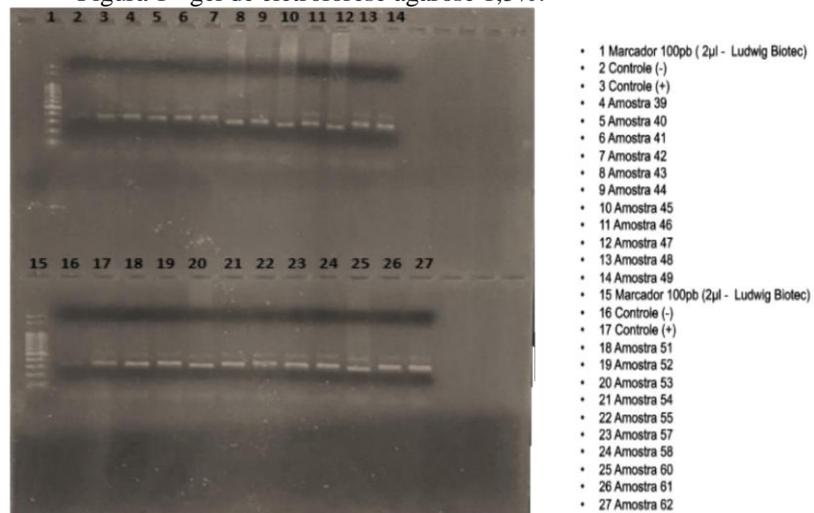
utilizado a TaqMan® Genotyping master mix (Applied Biosystems). Foram utilizados os iniciadores específicos para *Leishmania* LEISH-1 (5'-14 AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG30) e LEISH-2 (50-ACCCCCAGTTCCCCGCC-30) (FRANCISCO et. al., 2006) e sonda TaqMan® FAM-50- AAAAATGGGTGCAGAAAT-3 não fluorescente. Para quantificação de DNA (carga parasitária), foi utilizado uma curva de diluição de DNA padrão obtido de cultura celular de promastigotas de *L. infantum* (10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg), realizada em duplicata.

5. RESULTADOS

De acordo com o presente estudo e o recrutamento de 100 doadores de sangue aptos do hemocentro de Caruaru-PE, foram encontrados 18 (18%) portadores assintomáticos entre os doadores de sangue. Entretanto, quando avaliamos esses achados, no teste de ELISA (Enzima Imuno Ensaio) os resultados se mostraram negativos. Sugerindo que o teste de detecção de anticorpo pelo ELISA ~~não foi sensível~~ o suficiente para identificar anticorpos IgG para anti-*Leishmania infantum* em pacientes assintomáticos, o que pode ser devido à limitação de sensibilidade e especificidade do teste de ELISA empregado nesse estudo.

No teste de PCR para avaliar a integridade do DNA podemos visualizar a corrida eletroforese tratadas com brometo de etídio e Blue/Orange Loading Dye, onde mostra todos os resultados positivos representado na Figura 1. Sendo a amostra 1 - Marcador 100pb (2µl - Ludwig Biotec); 2 - Controle (-); 3 - Controle (+) e de 4 até 16 as amostras teste. A eletroforese em gel é usada para separar fragmentos de DNA com base no tamanho e carga, estes fragmentos de DNA estão carregados negativamente, então movem-se na direção do eletrodo positivo onde vai envolver a passagem de uma corrente através de um gel contendo as moléculas de interesse. De acordo com o tamanho e a carga, as moléculas irão se mover através do gel em diferentes direções ou em diferentes velocidades, o que permite que sejam separadas umas das outras.

Figura 1 - gel de eletroforese agarose 1,5%.

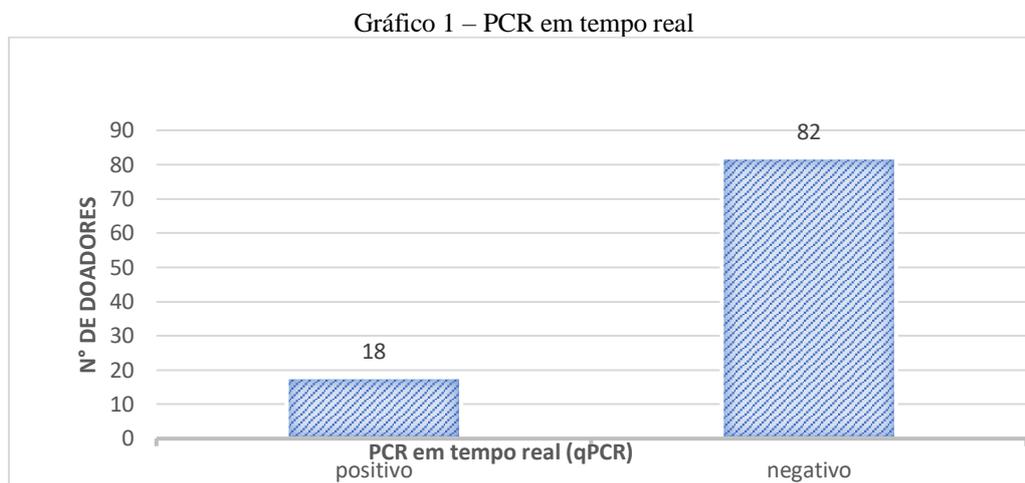


Legenda: Resultados da eletroforese em gel .

Amostras positivadas: Poço 8 amostra 43, Poço 11 amostra 46, Poço 24 amostra 58 e Poço 25 amostra 60.

Fonte: Autores (2023).

Como já foi informado, do total de amostras de sangue periférico junto a 100 doadores de sangue, somente 18 pacientes positivaram para o teste de qPCR (Gráfico 1), demonstrando que sendo 50% (9) do sexo feminino e 50% (9) do sexo masculino.



Fonte: Autores (2023).

Legenda: Resultado da PCR em tempo real

Ao analisar os participantes deste grupo positivo assintomático para Leishmania Visceral, foi detectado que 61,11% (11 casos) pertenciam a cidade de Caruaru; 5,56% (1) da cidade de bonito; 5,56% (1) da cidade de Belo jardim; 5,56% (1) da cidade de Sanharó; 5,56% (1) da cidade de São Caetano; 5,56% (1) da cidade de Altinho e 11,11% (2) da cidade de São Joaquim do Monte. Ao final observamos que no total foram 18 casos comprovados para L.Visceral.

Destes doadores que positivaram 77,78% (14) não tinham nenhum animal em casa; 11,11% (2) tinham apenas gato e 11,11% (2) tinham apenas cachorro. Dentre os doadores que não tinham nenhum animal em casa, 1 pessoa respondeu que já teve 1 cachorro que apresentava sintomatologia da Leishmaniose e que veio a falecer.

6. DISCUSSÃO

Após a coleta do material, separado, etiquetado e guardado em -80°C , foi feita a extração do sangue periférico, separando o plasma. Para a análise da presença de *Leishmania* spp nas amostras foi empregada a técnica de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), para detectar o DNA da *Leishmania* spp nas amostras.

Técnicas sorológicas clássicas, como a reação de imunofluorescência indireta e o imunoenensaio enzimático, possuem baixa sensibilidade e grande proporção de falso-positivos. (FERREIRA, 2021). Ao analisar a sensibilidade do teste de ELISA (Enzima Imuno Ensaio), observamos uma limitação significativa na detecção de anticorpos em pacientes assintomáticos, onde foi revelado resultados negativos em todos os casos. Esta constatação enfatiza que ele apresenta uma baixa sensibilidade e não é o indicado para fazer esse tipo de estudo, essa foi a primeira vez que esse teste foi utilizado para a detecção de infecção assintomática.

Ao identificar 18% dos doadores como positivos no teste de qPCR, destaca-se a presença significativa de infecção assintomática na população de doadores de sangue. Esses resultados são preocupantes quanto as políticas de prevenção da saúde pública, haja visto que portadores assintomáticos de Leishmaniose podem contaminar outros doadores através da transfusão. Em síntese, os resultados deste estudo ressaltam a existência da infecção por *Leishmania* em uma população aparentemente saudável, enfatizando a importância da vigilância, pesquisas continuadas e estratégias de controle eficazes para mitigar os riscos à saúde pública, associados a essa infecção assintomática.

A distribuição equitativa por gênero sugere que a infecção por *Leishmania* pode afetar ambos os gêneros de maneira semelhante (50/50). Observamos nesse estudo que o gênero não foi um fator limitador ou de estímulo para detecção da Leishmaniose visceral assintomática. Contrariamente na pesquisa de Buarque e colaboradores (2021), de 2010 à 2021 foram registrados 1179 casos de LV no estado de Pernambuco e sua prevalência foi maior nos indivíduos do sexo masculino representada por 62,35% de 704 casos identificados.

A análise demográfica dos doadores que testaram positivo revela uma distribuição geográfica abrangente, incluindo doadores de cidades vizinhas do HEMOPE de Caruaru. Esses achados ressaltam a importância de uma abordagem regionalizada no controle da leishmaniose, considerando a disseminação geográfica da infecção no agreste pernambucano.

Surpreendentemente, a maioria dos doadores positivos não tinham animais de companhia, indicando que a infecção não está diretamente relacionada à presença de cães ou gatos nos domicílios, contrariando as publicações científicas que colocam que o principal

reservatório da doença são os cães domésticos. A incidência de 1 caso relatado de Leishmaniose canina no grupo estudado, alerta para a possibilidade da transfusão sanguínea entre portadores assintomáticos da doença ou outra via de transmissão.

As implicações para a saúde pública devem ser discutidas entre órgãos da saúde, mesmo em uma população de doadores de sangue aparentemente saudável, destacamos a necessidade contínua de vigilância epidemiológica para garantir que novos casos assintomáticos possam surgir e representar um risco potencial para a saúde pública, justificando medidas de controle e intervenções preventivas junto aos bancos de sangue no país.

É crucial reconhecer as limitações deste estudo, como o tamanho da amostra e a representatividade geográfica da população estudada, uma vez que condições edafoclimáticas e sociais podem propiciar o surgimento de surtos epidemiológicos. Portanto, futuras pesquisas podem considerar ampliar a amostra e incluir diferentes grupos populacionais para uma compreensão mais abrangente da epidemiologia de Leishmaniose local e nacional.

De acordo com alguns estudos nos Estados Unidos, a legislação americana define que os indivíduos que tenham viajado para áreas endêmicas que possuem a *Leishmania* spp. adiem a doação de sangue por pelo menos 1 ano, enquanto na Europa os doadores que possuem leishmaniose visceral são impedidos de doar o sangue permanentemente (T. Jiménez-Marco et al.; 2012). Essas ações são tentativas sanitárias do governo americano para evitar uma propagação dos viajantes para zonas de alto risco de infecção por Leishmaniose.

7. CONCLUSÃO

Os achados sugerem uma distribuição equitativa por gênero, com 50% dos doadores positivos sendo do sexo feminino e 50% do sexo masculino. Doadores de cidades vizinhas também foram positivos, sugerindo disseminação geográfica. A maioria não tinha animais de companhia em casa, poucos relataram que tinham cão ou gato. A identificação de um doador sem animais na residência, mas que já teve um cachorro com a doença, relata a necessidade de investigação mais acurada sobre a possibilidade de contaminação dessa zoonose, através dos cães ou de transfusão sanguínea como uma via de transmissão possível.

Em resumo, a detecção de infecção assintomática destaca a importância da vigilância epidemiológica e do controle da leishmaniose na região do agreste pernambucano, principalmente nos casos de portadores assintomáticos, pois representam um risco potencial de adoecimento da população, sobrecarregando assim a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ALEMAYEHU, M.; WUBSHET, M.; MESFIN, N.; TAMIRU, A.; GEBAYEHU A. Health-related quality of life of HIV infected adults with and without Visceral Leishmaniasis in Northwest Ethiopia. **Health and Quality of Life Outcomes**. v. 15, n. 1, ago. 2017. doi:10.1186/s12955-017-0636-6.
- ALVAR, J., APARICIO, P., ASEFFA, A., DEN BOER, M., CANAVATE, C., DEDET, J. P. ... & MORENO, J. A relação entre leishmaniose e AIDS: os segundos 10 anos. **Clinical microbiology reviews**, (2008). 21(2), 334-359. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07>.
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003- 1111, 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue**. Brasília, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 110p.
- BRASIL, Ministério da Saúde (2020). **Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) - Informações de Saúde (TABNET)**. Epidemiologia e Enfermidades. Leishmaniose Visceral (online). Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892192> &VObj=<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishv> Acesso em: 15 de março de 2024.
- BUARQUE, Sarah et al. Prevalence of visceral leishmanioses in Pernambuco: Retrospective study of 11 years. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 6, p. 28537-28550, 2021.
- CAVALCANTE IJM, VALE MR. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. **Revista Brasileira Epidemiologia**. 2014 out-dez; 17 (4): 911- 924.
- COSTA, C. H. N. Quanto é efetivo o abate de cães para o controle do calazar zoonótico? Uma avaliação crítica da ciência, política e ética por trás desta política de saúde pública. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(2), 232–242, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000014>.
- DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, v. 2, n. 1, 2009. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S1>>. Acesso em: 19 mar. 2024
- DANTAS-TORRES, Filipe; MIRÓ, Guadalupe; BANETH, Gad; BOURDEAU, Patrick; BREITSCHWERDT, Edward; CAPELLI, Gioia; CARDOSO, Luís; DAY, Michael J.; DOBLER, Gerhard; FERRER, Luis. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 1-4, dez. 2019. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2512.190164>
- Das VNR, Siddiqui NA, Verma RB, Topno RK, Singh D, Das S, et al. **Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a**

challenge to kalaazar elimination programmes. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2011;105:661–666.

DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. 1, v. 24, n.3, p. 165-170. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n.3, p. 165-170, 2006.

FERREIRA-SILVA, M. M.; TEIXEIRA, L. A. S.; TIBURCIO, M. S.; PEREIRA, G. A.; RODRIGUES, V.; PALIS, M.; AFONSO, P.; ALVES, M.; FEITOSA, J. M.; URIAS, E.. Socio-epidemiological characterisation of blood donors with asymptomatic *Leishmania infantum* infection from three Brazilian endemic regions and analysis of the transfusional transmission risk of visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 433-439, 24 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tme.12553>.

FRANÇA, A. O.; DE CASTRO, V. L.; JUNIOR, M. S. C. L.; PONTES, E. R. J. C.; DORVAL, M. E.; SCIENCE, A. Anti-*Leishmania* antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 49, n. 3, p. 627-630, 2013.

FUKUTANI, K. F.; FIGUEIREDO, V.; CELES, F. S.; CRISTAL, J. R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; DE OLIVEIRA, C. I. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2014.

GALVIS OVALLOS, Fredy et al. **Leishmanioses no Brasil: Aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas.** Atualidades em medicina tropical no Brasil: protozoários. Tradução. Rio Branco: Stricto Sensu, 2020. Disponível em: [link]. Acesso em: 17 jan. 2024.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol.** , São Paulo, v. 7, n. 3, setembro de 2004.

Disponível a partir de

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415790X2004000300011&lng=en&nrm=iso Acesso em 10/03/2024. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>.

GUERBOUJ, SOUHEILA et al. Molecular Tools for Understanding Eco-Epidemiology, Diversity and Pathogenesis of *Leishmania* Parasites. In: **LEISHMANIASIS - TRENDS IN EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND TREATMENT**. [S. l.]: IntechOpen, 2014. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/46299>. Acesso em: 30 jan. 2024.

Hirata KY, Oliveira EB, Rigon L, Utsunomiya YT, Tomokane TY, Laurenti MD, Marcondes M. (2020). **Exposição a *Leishmania* spp. infecção e *Lutzomyia* spp. em indivíduos residentes em área endêmica para leishmaniose visceral no Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical , 53 , e20190320. Epub 20 de dezembro de 2019.

HUEI-LAN, CHUNG; HUA-K'ANG, C. H. O. W.; JUI-PING, L. U. The first two cases of transfusion kala-azar. **Chinese medical journal**, v. 66, n. 06, p. 325-326, 1948.

JIMENEZ-MARCO T, RIERA C, GIRONA-LLOBERA E, GUILLEN C, INIESTA L, ALCOVER M, BERENGUER D, PUJOL A, TOMÁS-PÉREZ M, CANCINO-FAURE B, SERRA T, MASCARÓ M, GASCÓ J, FISA R. Strategies for reducing the risk of transfusion-transmitted leishmaniasis in an area endemic for *Leishmania infantum*: a patient- and donor-

targeted approach. **Blood Transfus.** 2018 Feb;16(2):130-136. doi: 10.2450/2017.0201-16. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28488962; PMCID: PMC5839609.

JIMENEZ-MARCO, T.; RIERA, C.; FISA, R.; GIRONA-LLOBERA, E.; SEDENO, M.; GOODRICH, R. P.; PUJOL, A.; GUILLEN, C.; MUNCUNILL, J. The utility of pathogen inactivation technology: a real-life example of *Leishmania infantum* inactivation in platelets from a donor with an asymptomatic infection. **Blood Transfus**, v. 10, n. 4, p. 536-541, 2012.

KYRIAKOU DS, ALEXANDRAKIS MG, PASSAM FH, KOURELIS T V., FOUNDOULI P, MATALLIOTAKIS E, et al. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? **Transfus Med.** 2003;13(2):59–62.

LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **Hiv/aids - Research And Palliative Care**, [s.l.], v. 8, p.147-156, out. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/hiv.s93789>.

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.; PALATNIKDE-SOUSA, C. B. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 2, p. 168-171, 1997.

SINANWEB - **Leishmaniose Visceral**. Disponível em:

<<http://www.portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 16 mar 2024

Moreno E, Melo MN, Antunes CMF, Lambertucci JR, Serufo JC, AndradeRibeiro AS et al. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana assintomática em área urbana, Sabará, Minas Gerais**, 1998-1999. Informe Epidemiológico do SUS 2002;11:37-9.

MONTEIRO, D. C. S. **Prevalência de leishmaniose visceral assintomática em doadores de sangue, em área endêmica do Ceará**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MURBACK, N. D.N. et al. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 55-63, 2011.

OPAS/OMS. Leishmanioses: **Informe Epidemiológico das Américas**. Washington, D.C., Nº 11, dezembro de 2022. Disponível em <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56832>.

OPAS/OMS. Leishmanioses: **Informe epidemiológico das Américas**. Núm. 12 (dezembro de 2023). iris.paho.org, 2023. Acesso em: 18 jan 2024.

OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde – **Leishmaniose**. <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 18 jan 2024.

OMS/WHO. Technical report Series. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva, v. 949, p. 22-26. 2010.

Disponível em http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em: 10 mar 2024

PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR, P. E.; GIUNGI, F.; GIUNTI, G.; PARENTI, A.; CANESTRI TROTTI, G. Studies on Mediterranean leishmaniasis. 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 6, p. 447-53, 1974.

OMS/WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em:

<<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 14 jan 2024

PEDROSA, K. F. S. **Investigação da Infecção por Leishmania em Doadores de sangue**. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Sociedade, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2016.

RIERA, C.; FISA, R.; UDINA, M.; GÁLLEGO, M.; PORTUS, M. Detection of *Leishmania infantum* crytic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Island, Spain) by different diagnostic methods. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2004;98(2):102–10.

SALOMON, O. D.; SINAGRA, A.; NEVOTI, M. C.; BARBERIAN, G.; PAULIN, P.; ESTEVEZ, J. O.; RIARTE, A.; ESTEVEZ, J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 109-111, 2008

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.

SILVA, A. P. DA et al. Estudo epidemiológico de Leishmaniose Tegumentar Americana em Alagoas, no período de 2010 à 2018. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 2, p. 2351–2364, 1 jun. 2021.

SILVA, L. P. **Prevalência da infecção assintomática por *Leishmania infantum* em doadores de sangue do hemocentro da cidade do Recife-PE**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN). Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus). **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v.4, n.6, p. 28537-28550 nov./dec. 2021 maio de 2018. Disponível em <http://portalsinan.saude.gov.br/dadosep>.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002

SUNDAR, Shyam; SINGH, Om Prakash. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 443–457, 2018.

URIAS, E. et al. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. v. 31, p. 348-354. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2009.

VILELA, M. L. et al. Fauna Flebotomínica (Diptera: Psychodidae) e Supostos Vetores de Leishmanioses em Área de Impacto de Usina Hidrelétrica, Estado do Tocantins, Brasil. v. 6, n. **PLoS ONE**, 2011.