

**Letícia Helena dos Santos Marques**

**Determinação da taxa de infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*  
utilizando técnicas sorológicas e diagnóstico molecular quantitativo em  
crianças residentes em área urbana de expansão da  
Leishmaniose Visceral**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
Dezembro/2010**

Letícia Helena dos Santos Marques

**Determinação da taxa de infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* utilizando técnicas sorológicas e diagnóstico molecular quantitativo em crianças residentes em área urbana de expansão da Leishmaniose Visceral**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra. Mariângela Carneiro – ICB/UFMG

Co-orientadora: Dra. Luciana Inácia Gomes - CPqRR/ FIOCRUZ

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG  
2010

**Equipe colaboradora:**

Dra. Luciana Inácia Gomes: Pesquisadora do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou

Dra. Ana Rabelo: Pesquisadora e Chefe do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou

Dr. Edward José de Oliveira: Pesquisador do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou

Maria Helena Franco Moraes: Aluna de doutorado do Programa de Pós Graduação em Parasitologia

Thaís Almeida Marques da Silva: Apoio técnico do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou e bolsista do Projeto.

**Apoio Financeiro:**

CNPq: concessão de bolsa de mestrado

CNPq / MS/ DECIT

FAPEMIG

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa do professor Dr. Marcos Horácio Pereira, Coordenador da Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelo apoio e incentivo.

Ao meu pai José Marques Neto, meu maior exemplo e incentivo.

## Agradecimentos

A Deus, que está sempre comigo e guia minha vida.

À minha mãe Maria Inês dos Santos Marques pelo amor, companheirismo e incentivo sempre.

Aos meus irmãos, que mesmo à distância sempre demonstraram a amizade e companheirismo.

Aos meus tios Aureliano e Márcia e aos primos-irmãos Rafael, Luciana e Gabriela pelo carinho e amizade.

Ao Evandro pela companhia, incentivo, compreensão e amor.

À minha querida orientadora, professora Dra. Mariângela Carneiro por ter orientado com tanta dedicação, amizade e confiança e pelos incentivos, fundamentais para conclusão deste trabalho.

À minha co-orientadora e amiga Dra. Luciana Gomes, cuja colaboração, ensinamentos e amizade foram de extrema importância para possibilitar esse trabalho.

Aos professores e funcionários da UFMG pela excelente formação, em especial ao Departamento de Pós Graduação em Parasitologia, sem os quais não seria possível essa realização.

À Dra. Ana Rabello por possibilitar o desenvolvimento desse trabalho no Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR e pelo apoio fornecido.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR pela excelente convivência e amizade, em especial à Thaís, Fabiana, Daniela, Bruna, Edward, Lucas e Eliane.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias do ICB- UFMG: Maria Helena, Valdelaine, Wendel, Francisca, Jailza, Nathália, Karina, Ana Paula, Débora, Steffane e Lara pela amizade e companheirismo durante todos os trabalhos desenvolvidos.

Aos amigos da turma de Mestrado, pela ótima companhia e agradável convivência em especial à Rafaela Paim, pelo incentivo e ajuda sincera, fundamentais desde o início até a conclusão deste trabalho.

Um agradecimento especial ao meu pai José Marques Neto pelo amor, apoio, incentivo, compreensão ao longo de todo o tempo que foi possível e por ser o meu maior exemplo de bondade, sabedoria e determinação.

## Sumário

Índice de tabelas .....	x
Índice de figuras .....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
Lista de Abreviaturas.....	xvi
1.0 Introdução.....	16
1.1 Leishmanioses.....	17
1.2 Agentes etiológicos e transmissão.....	18
1.3 Ciclo Biológico.....	19
1.4 Leishmaniose Visceral nas Américas e no Brasil.....	20
1.5 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral.....	22
1.5.1 Diagnóstico Parasitológico direto.....	22
1.5.2 Diagnóstico sorológico.....	23
1.5.3 Diagnóstico molecular.....	24
1.5.3.1 PCR em tempo real.....	26
1.6 Urbanização e controle.....	28
2.0 Justificativa.....	30
3.0 Hipótese.....	33
4.0 Objetivos.....	34
4.1 Objetivo geral.....	35

4.2	Objetivo específico.....	35
5.0	Metodologia.....	36
5.1	Área de estudo .....	37
5.2	Delineamento do estudo e seleção da população.....	37
5.3	Considerações Éticas.....	39
5.4	Coleta de dados e amostras.....	40
5.5	Diagnóstico.....	40
5.5.1	Ensaio Sorológicos.....	42
5.5.1a	)Elisa Ag-T e Elisa-rk39.....	43
5.5.2	Ensaio Molecular (PCR quantitativo em tempo real).....	42
5.5.2 a)	Extração de DNA.....	42
5.5.2 b)	Fragmento alvo e iniciadores.....	43
5.5.2 c)	Construção da curva padrão.....	43
5.5.2 d)	PCR quantitativa em tempo real.....	44
5.6	Avaliação de confiabilidade.....	45
5.7	Análise dos dados.....	45
6.0	Resultados.....	46
6.1	Dados de prevalência.....	47
6.1a)	Sorologia.....	47
6.1b)	Ensaio molecular quantitativo.....	47

6.1c) Associações de técnicas diagnósticas.....	49
6.2 Caracterização das crianças consideradas reativas aos testes .....	51
6.3 Georreferenciamento dos casos detectados .....	58
6.4 Quantificação das amostras diagnosticadas como positivas para LV por meio da qPCR.....	59
6.5 Avaliação de Confiabilidade .....	59
6.5a) Reprodutibilidade.....	59
6.5b) Confiabilidade dos ensaios quantitativos.....	59
7.0 Discussão .....	62
8.0 Conclusões .....	71
9.0 Referências.....	73
10. Anexos .....	89
Anexo 1 : Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado ao responsável pela criança.....	90
Anexo 2: Questionário individual aplicado ao responsável pela criança .....	94

## Índice de Tabelas

Tabela 1	Prevalência da infecção por <i>L. chagasi</i> segundo métodos sorológicos em crianças residentes na regional Noroeste de BH, 2010.....	47
Tabela 2	Prevalência infecção por <i>L. chagasi</i> segundo a qPCR em crianças residentes na regional Noroeste de BH (amostra n= 559), 2010.....	48
Tabela 3	Estimativa da prevalência de infecção por <i>L. chagasi</i> em crianças residentes na regional Noroeste de BH segundo a qPCR (amostra n =1875).....	49
Tabela 4	Associação entre as amostras positivas para infecção por <i>L. chagasi</i> pelos diferentes testes e o número de concordantes.....	50
Tabela 5	Prevalência da infecção por <i>L. chagasi</i> em crianças residentes na regional Noroeste de BH por meio da associação de técnicas sorológicas e qPCR .....	51
Tabela 6	Relação entre a média de idade das crianças e resultado dos testes realizados [média em meses, ( $\pm$ desvio padrão)].....	55
Tabela 7	Proporção de amostras positivas e negativas pelo Elisa-AgT de acordo com total de amostras avaliadas por idade.....	56
Tabela 8	Proporção de amostras positivas e negativas pelo Elisa-rk39 de acordo com total de amostras avaliadas por idade.....	56
Tabela 9	Proporção de amostras positivas e negativas pela qPCR de acordo com total de amostras avaliadas por idade.....	57

Tabela 10	Índices de concordância da reprodutibilidade das técnicas diagnósticas.....	59
Tabela 11	Média dos parâmetros de validação dos ensaios de qPCR relacionados à curva padrão.....	60
Tabela 12	Coeficientes de variação dos pontos da curva padrão.....	61

## Índice de Figuras

Figura 1	Belo Horizonte de acordo com as regiões administrativas e municípios limítrofes.....	37
Figura 2	Mapa das áreas de abrangência trabalhadas na regional Noroeste de Belo Horizonte. Em vermelho, encontram-se as crianças selecionadas e visitadas para coleta de amostras.....	39
Figura 3	Fluxograma de delineamento do estudo.....	41
Figura 4	Associação entre as amostras positivas para infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> de acordo com os métodos sorológicos (Elisa-AgT e Elisa-rk39) e a qPCR. ....	50
Figura 5	Amostras positivas e negativas pelo Elisa-rk39 de acordo com o sexo da criança.....	52
Figura 6	Amostras positivas e negativas pelo Elisa-AgT de acordo com o sexo da criança.....	52
Figura 7	Amostras positivas e negativas pela qPCR de acordo com o sexo da criança.....	53
Figura 8	Amostras positivas em pelo menos um teste (qPCR e/ou Elisa-AgT e/ou Elisa-rk39) e negativas em todos os testes para infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> relacionadas ao sexo da criança.....	53
Figura 9	Relação entre idade e positividade da criança para infecção por <i>L. (L.) chagasi</i> em pelo menos um dos testes realizados (qPCR, Elisa-AgT ou Elisa-rk39).....	54

Figura 10	Relação entre a média de idade das crianças (meses) e resultado dos testes realizados.....	55
Figura 11	Georreferenciamento dos casos diagnosticados como positivos em pelo menos uma das técnicas utilizadas.....	58
Figura 12	Exemplo de curva padrão apresentada pelo <i>software</i> StepOne v2.1 de um dos experimentos de qPCR realizados.....	60

## Resumo

A leishmaniose visceral (LV) no Brasil tem sido considerada atualmente um grave e emergente problema de Saúde Pública em áreas urbanas de grandes capitais. Nesse sentido, o diagnóstico da infecção assintomática por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em uma dada população pode ser considerado um indicador para o delineamento e a avaliação dos programas de controle. Entretanto, inquéritos epidemiológicos baseados apenas em sorologia têm mostrado limitações no diagnóstico de assintomáticos. Nesse estudo, procurou-se traçar um perfil mais verdadeiro da situação da LV humana na região Noroeste de Belo Horizonte – MG. Para isso, avaliou-se a taxa de infecção por *L. chagasi* em 1875 crianças com idade entre 3 meses e 7 anos por meio de inquérito sorológico e por exame molecular quantitativo. Após coleta das amostras de sangue em papel filtro foi realizado ensaio ELISA com antígeno bruto (ELISA-AgT) de *L. chagasi* e com antígeno recombinante rK39 (ELISA-rk39). As amostras com resultado positivo em pelo menos um desses testes (n=317) foram submetidas ao diagnóstico molecular por meio da PCR quantitativa em tempo real (qPCR), utilizando como alvo o gene SSU rRNA. Também foram selecionadas aleatoriamente 242 amostras negativas na triagem sorológica para avaliação por meio da qPCR. A taxa de infecção considerando as amostras positivas em pelo menos um dos ensaios sorológicos foi de 16,9%. Considerando o ELISA-AgT, a taxa de infecção foi de 2,8% e segundo o ELISA-rk39 essa taxa foi de 14,9%. A estimativa de prevalência da infecção baseada na qPCR foi de 13,9%. Ao associar todos os testes verificamos um aumento de sensibilidade e a taxa de infecção atingiu 30,8%. Foi possível estimar a carga parasitária das crianças diagnosticadas positivamente pela qPCR. A média dos níveis de parasitemia encontrados entre os indivíduos assintomáticos foi de 56,5 parasitos/mL de sangue (valor normalizado por nanograma de DNA extraído). Não foi observada diferença estatística para as variáveis sexo e idade das crianças, quando relacionadas aos resultados dos testes diagnósticos. Embora as técnicas utilizadas tenham apresentado baixa concordância, os resultados obtidos indicaram a presença de infecção assintomática por *L. chagasi* na regional noroeste de BH. Além disso, sugerem que a associação de mais de uma técnica diagnóstica pode ser considerada uma alternativa para realizar levantamento de indivíduos assintomáticos em área endêmica e permitir melhor avaliação e elaboração de medidas de controle mais efetivas.

**Palavras-chave:** *Leishmaniose Visceral, Prevalência de assintomáticos, Diagnóstico sorológico, PCR em tempo real.*

## Abstract

Nowadays, visceral leishmaniasis (VL) in Brazil has been regarded as a serious and emerging problem concerning Public Health for urban areas in major capitals. In that sense, asymptomatic infection diagnosis by *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a given population can be considered as an indicator for outlining and assessing control programmes. Nonetheless, epidemiologic inquiries based only on serology have shown limitations in asymptomatic diagnosis. In this study, tracing a profile which is more realistic about the situation of human VL in the Northwestern region of Belo Horizonte – Minas Gerais, was looked for. In this context, infection rate by *L. chagasi* in 1875 children between 3 months and 7 years old was assessed by means of serologic inquiry as well as molecular examinations. After blood sample swab in filter paper, ELISA experiment with *L. chagasi* raw antigen (ELISA-AgT) and recombinant antigen rK39 (ELISA-rk39) was carried out. Positive resulting samples in at least one of those experiments (n=317) underwent molecular diagnosis by means of quantitative real time PCR (qPCR), using its gene SSU rRNA as a goal. Randomly, 242 negative samples were also selected for serologic classification so as to be assessed by qPCR. Considering positive samples in at least one of the serologic experiments, the infection rate was 16.9%. Regarding ELISA-AgT, infection rate was 2.8%, and according to ELISA-rk39, this same rate was 14.9%. Infection estimated prevalence based on qPCR was 13.9%. When associating all these experiments, it can be verified a sensibility increase, and infection rate was up to 30.8%. It was possible to estimate parasitic burden in children diagnosed positively by qPCR. The average of parasitemia levels found between asymptomatic individuals was 56.5 parasites/blood mL (a normalised amount by extracted DNA nanogram). It was not observed any statistical difference for children sex and age variables when related to the results of diagnosis experiments. Results got showed the presence of asymptomatic infection by *L. chagasi* in the Northwestern region of Belo Horizonte. In addition, it is suggested that the association of more than one diagnosis technique can be considered as an alternative to carry out the surveying of asymptomatic individuals in endemic area and that it also makes possible a better assessment and development of control measures which are more effective.

**Keywords:** *Visceral leishmaniasis, Prevalence of asymptomatics, Serologic diagnosis, Real time PCR.*

## Lista de Abreviaturas

- μL – microlitro**
- AA – Área de abrangência**
- Ag – Antígeno**
- AgT- Antígeno total de *Leishmania chagasi***
- BH – Belo Horizonte**
- CEP – Comitê de ética em pesquisa**
- CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou**
- ct – *Ciclo Threshold***
- CV – Coeficiente de variação**
- DNA – Ácido desoxirribonucleico**
- Eff – Eficiência da reação de qPCR em tempo real**
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay***
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz**
- GECOZ – Gerência de Controle de Zoonoses**
- GEEPI – Gerência de Epidemiologia e Informação**
- ITS – Internal transcribed spacer**
- kDNA – Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto**
- LC – Leishmaniose Cutânea**
- LMC – Leishmaniose muco-cutânea**
- LV – Leishmaniose Visceral**
- LVA – Leishmaniose Visceral Americana**
- OMS – Organização Mundial de Saúde**
- PBH – Prefeitura de Belo Horizonte**
- PCR - Reação em cadeia da polimerase**
- PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral**
- qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa**
- rk39 - Antígeno recombinante k39**
- RNA – Ácido ribonucléico**
- rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal**
- SMSA - Secretaria Municipal de Saúde**
- TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido**

## **1.0 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Leishmanioses**

As leishmanioses encontram-se, atualmente, entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (OMS, 2010). Elas são consideradas zoonoses e podem acometer o homem, quando este se insere no ciclo de transmissão do parasito.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as formas clínicas particularmente variadas das leishmanioses podem ser agrupadas da seguinte maneira: leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave, que pode ser letal quando não tratada; leishmaniose muco-cutânea (LMC), caracterizada como uma doença mutiladora causando deformidades irreversíveis principalmente na face dos pacientes e leishmaniose cutânea (LC), que provoca o aparecimento de ulcerações na pele dos pacientes (OMS, 2010). As leishmanioses são consideradas pela OMS doenças emergentes ou não-controladas, cujo foco de pesquisa está na aquisição de novos conhecimentos sobre métodos de diagnóstico e drogas terapêuticas e no planejamento de estratégias para o seu controle.

Estima-se que em todo mundo, as leishmanioses acometam cerca de 12 milhões de indivíduos, sendo que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco (OMS, 2006). A incidência global anual varia de 1-1,5 milhão de casos da forma cutânea e de 500.000 casos da forma visceral (Desjeux, 2004; OMS, 2010).

As leishmanioses acometem populações de 88 países, sendo que mais de 90% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru, e aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem predominantemente nos países em desenvolvimento como Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (OMS, 2006). Na América Latina, a LV já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo o Brasil, o país onde há registro de maior número de casos (Ministério da Saúde, 2006).

Pelo fato de as características clínicas, etiológicas, geográficas e epidemiológicas serem muito diversificadas, as leishmanioses resultam em um espectro de doenças do sistema fagocítico mononuclear da pele, medula óssea, fígado, baço, linfonodos entre outros órgãos e estão associadas à resposta imunológica expressa pelo hospedeiro (Lainson & Shaw, 1987).

A importância das leishmanioses nos contextos social, econômico e sanitário do Brasil está baseada na ampla distribuição geográfica das mesmas e na gravidade de suas manifestações clínicas. O crescimento dessa importância nos últimos anos está relacionado ao aumento da incidência e da disseminação de algumas formas de leishmanioses para novas áreas geográficas, assim como, a sua tendência à urbanização. É importante considerar também as dificuldades referentes ao diagnóstico, tratamento e controle, decorrentes, entre outros fatores, da complexidade de seus quadros epidemiológicos (Gomes, 1992 e Gomes et al.1996; Marzochi & Marzochi, 1994).

## 1.2 Agentes etiológicos e transmissão

As leishmanioses são infecções parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários, todos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903) e transmitidas pela picada das fêmeas de insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, encontrados nos mais diferentes nichos ecológicos da natureza (Shaw, 2003). Os flebotomíneos estão classificados taxonomicamente em diferentes gêneros e inúmeras espécies de insetos, sendo que os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* compreendem aproximadamente trinta vetores que estão envolvidos no ciclo de transmissão das leishmanioses no Velho e no Novo Mundo, respectivamente. São exemplos de vetores nas Américas as espécies *Lutzomyia migonei*, *L. intermedia*, *L. whitmani* e *L. longipalpis* (Lainson & Shaw, 1987). A atividade dos flebotomíneos é crepuscular noturna (Killick-Kendrick & Rioux, 2002).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos flagelados de células do sistema fagocítico mononuclear de diversos hospedeiros vertebrados, que adquirem a infecção, com maior frequência, por meio do contato com o vetor flebotomíneo (Killick-Kendrick & Rioux, 2002)

As espécies de *Leishmania* podem ocorrer em canídeos, roedores, edentados, marsupiais, ungulados, procionídeos e primatas, incluindo o homem (Bañuls et al. 2007).

Apesar de a transmissão vetorial ser a mais comum, atualmente, tem-se atentado para os casos de transmissão dos parasitos causadores da LV por meio de transplantes de órgãos (Oliveira et al. 2006, Basset et al 2005), transfusão sanguínea (Dey & Singh, 2006) e pelo compartilhamento de seringas entre usuários de drogas (Alvar et al. 1997).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* de acordo com o seu desenvolvimento no intestino do inseto vetor (Marfurt et al, 2003). A classificação em espécies, por outro lado, é dependente de fatores como a distribuição geográfica do parasito isolado, dados moleculares e a apresentação clínica da doença e a epidemiologia do vetor e do reservatório.

Atualmente, cerca de 30 diferentes espécies de *Leishmania* são conhecidas como parasitas e/ou agentes etiológicos de alguma manifestação clínica considerada como leishmaniose. Dessas, aproximadamente 20 podem causar infecção e doença no hospedeiro humano e as restantes foram encontradas, até o momento, infectando apenas hospedeiros não humanos (Gállego, 2004).

No subgênero *Leishmania*, encontra-se a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (*L. chagasi*) considerada similar à *Leishmania (Leishmania) infantum* e agente causador da Leishmaniose Visceral Americana (LVA). A *L. chagasi* ao infectar o hospedeiro vertebrado pode se disseminar para vários órgãos por meio da circulação sanguínea ou linfática, e pode ocasionar, de maneira progressiva, depressão da resposta imune celular desse hospedeiro. Essa espécie encontra-se em pleno processo de dispersão e disseminação para diferentes regiões do país, tanto em áreas rurais quanto em áreas urbanas (Berns & Rager, 2000; Patz et al. 2004, Volpini et al. 2004; Tolezano et al. 2005).

### 1.3 Ciclo Biológico

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxênico, visto que inclui uma fase no tubo digestivo do vetor flebotomíneo, e outra em diferentes hospedeiros vertebrados como canídeos silvestres (*Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus*), canídeos domésticos (*Canis familiaris*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e

roedores, principalmente dos gêneros *Rattus*, *Mus*, *Bolomys*, *Oryzomys*, *Akodon* (Ministério da Saúde, 2006).

As formas amastigotas presentes nos macrófagos da derme de um hospedeiro vertebrado infectado são ingeridas pela fêmea do vetor durante o repasto sanguíneo. Em seguida, transformam-se em promastigotas e reproduzem-se intensamente por divisão binária no tubo digestivo do inseto. O ciclo do parasito no inseto se completa no período em torno de 72 horas. Em um novo repasto, as formas promastigotas metacíclicas são liberadas na pele de novos hospedeiros, podendo assim, reiniciar um outro ciclo de desenvolvimento quando fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear. No interior dessas células, diferenciam-se em formas amastigotas, multiplicam-se até o rompimento das mesmas e são fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, podendo haver em alguns casos, disseminação para vísceras, linfonodos e medula óssea (WHO, 2010).

#### **1.4 Leishmaniose Visceral nas Américas e no Brasil**

Na América do Sul e Central, a LV ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos registrados ocorridos no continente americano (Ministério da Saúde, 2006).

A LV atinge as cinco regiões brasileiras. Em 2009, a região Nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). No Brasil, registra-se em média cerca de 3.500 casos de LV/ano e a incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes. Em algumas localidades de estados nordestinos como Piauí, Maranhão e Bahia, a incidência atinge 20,4 casos/100.000 habitantes. A letalidade pode alcançar 10% nesses locais quando não se institui o tratamento adequado (Gontijo & Melo, 2004; Ministério da Saúde, 2006, SINAN, 2009).

Em sua distribuição geográfica inicial, a LV era mais frequente no meio rural. Atualmente, verifica-se uma tendência à urbanização da endemia, que vem aumentando gradativamente de frequência e intensidade, passando a atingir áreas urbanas e suburbanas das grandes capitais. A partir da década de 1980, tornou-se notória a alteração do padrão de transmissão rural, quando uma epidemia de LV ocorreu em Teresina e, posteriormente, com o diagnóstico

de casos autóctones em São Luís, Fortaleza, Natal, Aracaju, Belo Horizonte, Santarém e Corumbá (OMS, 1990).

Nas Américas, os reservatórios mais importantes e significativos da doença são os canídeos domésticos e silvestres. A presença da *L. chagasi* já foi relatada no Brasil em diversos hospedeiros como cão (*Canis familiaris*), gato (*Felis catus*), canídeos silvestres (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*), marsupiais (*Didelphis marsupiali* e *D. albiventris*) e roedores (*Proechymis oris*) (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Sherlock et al. 1984; Sherlock, 1996). Na área urbana, a principal fonte de infecção é o cão doméstico (*Canis familiaris*) e tem-se verificado que a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos, sendo a infecção em cães mais prevalente do que no homem (Ministério da Saúde, 2006).

A proximidade do cão com os humanos tem sido referenciada como um importante fator de risco para a doença. Na região nordeste brasileira, a presença de cães no interior das casas ou no peridomicílio é frequentemente associada ao aumento da incidência da Leishmaniose Visceral humana (Cunha et al. 1995; Desjeux, 2001). Esse fato direciona e ao mesmo tempo constitui a razão das maiores dificuldades encontradas pelos programas de controle da doença.

As características clínicas da LV são semelhantes tanto em cães quanto em humanos. O espaço de tempo em que o parasito se dissemina pelo corpo, chamado período de incubação, pode variar de meses a anos (Oliva et al. 2006). A forma clássica caracteriza-se por sinais e sintomas de doença crônica persistente como febre ondulante, fadiga e perda de peso. A invasão das células sanguíneas e do sistema retículoendotelial implica em hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Manna et al. 2006; Chappuis et al. 2007). No entanto, o surgimento da doença e sua evolução são consequências de um conjunto de interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (Manna et al. 2006). Quando não tratada, a doença evolui podendo levar à morte de grande número de doentes (Ministério da Saúde, 2006).

Apesar de a LV no Brasil apresentar aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados devido a sua vasta distribuição geográfica, a mesma se encontra em fase de expansão, e desde a década de 1990 tem havido um aumento significativo do número de casos registrados (Gontijo & Melo, 2004).

## 1.5 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral

Nas diversas formas das leishmanioses as características clínicas e epidemiológicas não são sempre específicas, podendo se confundir com outras patologias. Assim, o diagnóstico laboratorial é necessário para confirmar a suspeita clínica, e fatores como a agilidade e a confiabilidade dos resultados são essenciais para o tratamento e controle epidemiológico da LV. Entretanto, as técnicas de diagnóstico de maior sensibilidade necessitam de pessoal com experiência e/ou equipamentos complexos, cuja disponibilidade em áreas endêmicas, onde são mais necessários, é limitada.

Nesse contexto, o diagnóstico da LV ainda pode ser considerado um problema importante e de difícil solução. Guerin et al. (2002) realizaram um estudo na Índia que exemplificou a dificuldade da confirmação diagnóstica ao estimar aproximadamente em 7,7 meses o tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo da doença.

### 1.5.1 Diagnóstico Parasitológico Direto

O padrão “ouro” no diagnóstico da leishmaniose visceral ainda são as técnicas baseadas na detecção direta e isolamento em cultivo *in vitro* do parasito com a demonstração do mesmo em microscópio. Apesar da vantagem de apresentarem metodologia simples, para realização dessas técnicas há a necessidade da coleta de aspirados de medula óssea, baço, linfonodo ou de fígado, o que torna esses procedimentos invasivos e bastante arriscados. Além disso, embora a especificidade desses ensaios atinja aproximadamente 100%, a sensibilidade é bastante variável com níveis relatados em torno de 55-97% em material de medula óssea, 95% em aspirados esplênicos e 60% em linfonodos (Murray et al. 2005; Singh, 2006).

A coleta do aspirado de baço, fígado ou medula óssea requer do profissional que a realiza experiência; o procedimento é difícil de ser realizado fora de um hospital de referência ou de um centro especializado; e também apresenta algumas contra-indicações, como em casos de anemia grave, de tendência à hemorragia ou em casos de gravidez (Desjeux, 2004). Durante a

punção do baço ou fígado pode haver complicações, causando sangramentos, o que torna esse procedimento arriscado e potencialmente fatal (Siddig et al. 1988; Zijlstra et al. 1992). Assim, o exame de microscopia de aspirado de medula óssea é o método diagnóstico mais seguro para pacientes pediátricos (Kafetzis & Maltezou, 2002). No entanto, punções repetidas podem ser necessárias para o aumento da sensibilidade da técnica.

O cultivo dos parasitos do material aspirado pode ser usado como alternativa para aumentar a sensibilidade. Entretanto, a cultura de tecidos, geralmente realizada em meios enriquecidos apropriados (meio líquido de LIT-“liver infusion tryptose” ou de Schneider, e meio de NNN – “Novy MacNeal-Nicolle”) é demorada, com crescimento de parasitos demandando dias ou semanas, não sendo adequada para casos que requeiram decisões imediatas (Ministério da Saúde, 2006, Murray, 2000). A inoculação de amostras de tecidos em hamsters (*Mesocricetus auratus*) necessita longo tempo para a positividade (um a três meses) (Ministério da Saúde, 2006). Em relação aos índices de positividade da cultura de aspirado medular, há variação em torno de 40-50%, enquanto que a de aspirado esplênico situa-se em torno de 70-98% (Singh & Sibakumar, 2003).

### **1.5.2 Diagnóstico Sorológico**

Uma resposta do tipo humoral com elevados níveis de anticorpos é observada entre os pacientes com LV antes da resposta de células T (Burns et al. 1993). Sendo assim, a utilização da sorologia tem sido explorada para o diagnóstico da doença em pacientes imunologicamente competentes.

Atualmente, o Ministério da Saúde recomenda a utilização de duas técnicas sorológicas: o Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

O teste de ELISA é uma técnica sensível e a especificidade depende do antígeno utilizado. Vários antígenos têm sido testados (Soto et al. 1996; Sundar & Rai, 2002; Singh & Sibakumar, 2003), embora o antígeno total, derivado do lisado de promastigotas de *Leishmania spp*, seja o mais comumente utilizado. Sua sensibilidade varia entre 80% e 100%, porém apresenta frequentes

reações cruzadas em pacientes com malária, tuberculose e toxoplasmose (Sundar & Rai, 2002; Sundar, 2003).

Outro antígeno também utilizado nos ensaios ELISA é o antígeno recombinante K39, uma molécula de 39 aminoácidos pertencente à superfamília das cinesinas, que são proteínas motoras da *Leishmania* spp. Ele foi identificado originalmente em culturas de *Leishmania chagasi* e tem apresentado bons resultados quando utilizado em ensaios sorológicos. Além disso, possui vantagens de apresentar um número menor de reações cruzadas nos casos de tuberculose, malária, doença de Chagas, hanseníase e leishmaniose cutânea (Carvalho et al. 2003).

No Brasil, os casos de LV são confirmados quando os pacientes apresentam exame parasitológico ou RIFI (título igual ou superior a 1:80) positivos (Ministério da Saúde, 2006). Sendo assim, a RIFI é atualmente a técnica sorológica mais utilizada para o diagnóstico da LV por estar disponível na rede de atenção à saúde do Sistema Único de Saúde (SUS).

### 1.5.3 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico precoce é importante para evitar danos graves que podem levar o paciente à morte (Schalling & Oskam, 2002). Nesse contexto, os métodos convencionais apresentam limitações. A cultura e o exame direto com a busca em microscópio são pouco sensíveis, além da metodologia envolvida no cultivo de células ser passível de contaminações e necessitar maior tempo para a definição do diagnóstico. Os ensaios baseados em sorologia podem ser úteis, porém, possuem desvantagens ao apresentarem reações cruzadas e resultado diferenciado de acordo com o tempo de infecção, não sendo, portanto, indicados para diagnóstico em pacientes imunossuprimidos e assintomáticos (Gontijo & Melo, 2004; Moreno et al. 2009).

Considerando essas limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais, verifica-se a necessidade de aprimoramento de técnicas que sejam capazes de promover um diagnóstico seguro. Dessa forma, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* spp. em amostras clínicas diversas, isolados de cultura, bem como de flebotomíneos (Michalsky et al. 2002; Rolão et al. 2004;

Talmi-Frank et al. 2010; Verma et al. 2010). São várias as técnicas inovadoras que se encontram em desenvolvimento e aprimoramento, podendo-se destacar entre elas a amplificação de alvos gênicos, conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (PCR multiplex, nested-PCR, RT-PCR, PCR quantitativo) (Britto et al. 2005; Cupolillo, 2005). Essas reações são extremamente úteis, devido à possibilidade de detecção do DNA ou RNA alvo, mesmo quando estão presentes em quantidades mínimas nas amostras clínicas.

Iniciadores desenhados para amplificar sequências alvo multicópias, como a região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto, têm aprimorado o diagnóstico de infecções por *Leishmania* (Reale et al. 1999). Outras sequências alvo também podem ser utilizadas na PCR, como o DNA e o RNA ribossomais, além da região espaçadora entre os transcritos internos ou “internal transcribed spacer” (ITS-1), dentre outros (Wortmann et al. 2001; Nasereddin et al. 2006).

A habilidade de detectar e identificar o parasito envolvido com alta sensibilidade e especificidade aliada ao fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas (por exemplo: sangue, soro e urina) coletadas de maneira menos invasiva, produzindo um resultado confiável em um curto intervalo de tempo, são vantagens importantes da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais tanto em cães quanto em humanos (Ikonomopoulos et al. 2003; Silva et al. 2003).

Nos últimos anos, vários grupos têm mostrado que a reação em cadeia da polimerase é um método específico e sensível para a detecção do DNA da *Leishmania* em diversos tipos de amostras de humanos, cães e até mesmo em raposas. Já foi demonstrado que a PCR pode aprimorar a detecção de leishmaniose visceral canina e humana (Ashford et al. 1995; Berrahal et al. 1996; Reithinger et al. 2000; Martin-Sanchez et al. 2004; Rolão et al. 2004; Castilho et al. 2008; Aoun et al. 2009; Quaresma et al. 2009; Verma et al. 2010; Talmi-Frank et al. 2010).

#### **1.5.3.1 PCR em tempo real**

As enfermidades causadas pelas várias espécies de *Leishmania* são caracterizadas por alterações no número de parasitos durante o curso da infecção (Leclercq et al. 1996; Mattner et al. 1997; Melby et al. 1998). Sendo assim, a quantificação da carga parasitária pode significar, além de um método de diagnóstico preciso, uma maneira alternativa de se acompanhar a evolução da infecção e avaliar os resultados de um determinado esquema terapêutico. Nos casos de LV, já é sabido que a carga parasitária pode variar após a infecção com o decorrer do tempo, podendo ocorrer no mesmo tecido e também entre diferentes tecidos num mesmo momento (Melby et al. 1998; Rica-Capela et al. 2003).

Uma das formas de se conseguir determinar a densidade de parasitos em diferentes amostras biológicas é através da microscopia, pela contagem de amastigotas em relação aos núcleos das células do hospedeiro em esfregaços do tecido (Stauber et al. 1958; Reis et al. 2006). No entanto, essa técnica é pouco acurada, considerando que os parasitos não estão distribuídos igualmente nos tecidos e órgãos, além de demandar tempo. A quantificação através dos ensaios de microdiluição limitante em cultura também pode ser utilizada, porém requer o cultivo do parasito, o que dificulta a sua execução devido a todas as dificuldades associadas à manutenção da cultura, além de ser demorada e trabalhosa (Bretagne et al. 2001). Devido às dificuldades que essas técnicas de quantificação apresentam, métodos baseados na PCR em tempo real têm sido desenvolvidos para aperfeiçoar a detecção e promover a quantificação dos parasitos em amostras clínicas.

A reação de amplificação quantitativa em tempo real (qPCR) permite a quantificação e o monitoramento simultâneo do produto amplificado. Diversos autores já estão utilizando essa técnica em estudos relacionados à carga parasitária, à interação entre parasito e hospedeiro e monitoramento de esquemas terapêuticos a partir de amostras provenientes tanto de cães quanto de humanos (Roura et al. 1999; Nicolas et al. 2002a; Mary et al. 2004; Mortarino et al. 2004; Rolão et al. 2004; Vitale et al. 2004; Wortmann et al. 2004; Francino et al. 2006; Castilho et al. 2008; Quaresma et al. 2009; Aoun et al. 2009; Verma et al. 2010; Talmi-Frank et al. 2010). Pelo fato de não apresentar os vários passos de manipulação pós-amplificação utilizados na técnica de PCR convencional, a qPCR minimiza os riscos de contaminação do

material, além de permitir de forma simultânea a detecção, medida e comparação do número de parasitos em diferentes amostras (Nicolas et al. 2002b; Vitale et al. 2004).

O sistema de PCR em tempo real é baseado no uso de fluorocromos ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Em uma PCR em tempo real, a análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (Kubista et al. 2006). O ciclo em que o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (*Threshold*) é denominado *Ct* e, o momento em que o *Ct* é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (Mortarino et al. 2004). Sendo assim, denomina-se *Ciclo Threshold* ou *Ct* o ponto em que a emissão de fluorescência da amostra em teste supera a referência passiva do aparelho (*background*).

Uma das formas de gerar a fluorescência é o uso de uma sonda de hidrólise, dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar. Um exemplo deste sistema é a sonda TaqMan®. À medida que ocorre a amplificação, a Taq DNA polimerase por meio da sua atividade exonucleásica desloca a extremidade 5' da sonda TaqMan® (contendo o fluorocromo ou *reporter*) e realiza a sua clivagem. Pelo fato de o fluorocromo ser liberado, há emissão de fluorescência, que é proporcional à síntese de DNA ou cDNA da amostra (Mortarino et al. 2004; Yang & Rothman, 2004).

Outro sistema de detecção também utilizado na PCR em tempo real é o SYBR Green®. Esse sistema está relacionado a uma cianina assimétrica que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA ou cDNA formadas durante a amplificação. Nesse sistema, quando o fluorocromo está livre em solução não emite fluorescência, porém, quando se liga a moléculas de DNA emite um sinal luminoso forte (Nygren et al. 1998; Wortmann et al. 2001).

Os dois sistemas fazem uso conjunto de um fluorímetro e de um termociclador, permitindo o monitoramento contínuo do acúmulo de produto amplificado gerado.

A PCR em tempo real é considerada uma ferramenta muito promissora para a detecção e quantificação de agentes causadores de doenças. Essa

técnica já é empregada para vários parasitos, dentre eles: *Toxoplasma gondii* (Jauregui et al. 2001), *Borrelia burgdorferi* (Piesman et al. 2001), *Plasmodium falciparum* (Hermsen et al. 2001; Bruña-Romero et al. 2001), *Neospora caninum* (Collantes-Fernanandez et al. 2002) e *Leishmania sp.* (Bretagne et al. 2001; Nicolas et al. 2002a e 2002b; Rolão et al. 2004, Castilho et al. 2008; Quaresma et al. 2009; Talmi-Frank et al. 2010; Aoun et al. 2009; Verma et al. 2010).

## 1.6 Urbanização e Controle

A LV no Brasil por muito tempo foi conhecida como uma zoonose tipicamente rural, porém, nos últimos anos passou para condição de um grave e emergente problema de Saúde Pública em plena expansão em áreas urbanas de cidades com padrões distintos de desenvolvimento econômico e social (Ministério da Saúde, 2006). Após o registro da primeira epidemia urbana em Teresina, no Piauí (Costa et al. 1990), o processo de urbanização se intensificou com a ocorrência de importantes epidemias em várias cidades da região Nordeste (São Luís, Natal e Aracaju), Norte (Boa Vista e Santarém), Sudeste (Belo Horizonte e Montes Claros) e Centro Oeste (Cuiabá e Campo Grande) (Gontijo & Melo, 2004). A doença foi identificada como autóctone em mais de 1600 municípios brasileiros, caracterizando-a como uma doença negligenciada no país (SINAN 2009).

Um conjunto de fatores contribuiu para a emergência da LV nos centros urbanos. Destacam-se entre eles: as mudanças ocorridas nos últimos anos na estrutura agrária brasileira, resultando no aumento das migrações em direção aos grandes centros urbanos; a adaptação do vetor às modificações ambientais provocadas pelo homem; as alterações climáticas; investimentos precários e as ações de controle pouco eficientes (Gontijo & Melo, 2004). Tudo isso levou ao estabelecimento de novas fronteiras da doença a partir de sua expansão e urbanização, comprovada pela ocorrência de inúmeros casos em cidades de grande e médio porte (Costa et al. 1990; Tesh, 1995).

As medidas de controle preconizadas até então não foram suficientes para contenção da doença no contexto urbano. Na situação atual, a alta densidade populacional dos municípios acometidos associada às condições

inadequadas de vida contribuem para aumento do número de casos em ambientes urbanos e representam um grande desafio para adoção de novas maneiras de enfrentar esse problema.

Em Minas Gerais, a incidência da LV humana foi de 2,4 e 2,3 por 100.000 habitantes em 2008 e 2010, respectivamente. Na cidade de Belo Horizonte, o número de casos de LV humana tem se elevado a cada ano desde 1994 (Luz et al. 2001). Inicialmente identificada na Regional Leste, teve sua ocorrência registrada em regionais limítrofes como Nordeste, Norte, Venda Nova e mais posteriormente Noroeste e Pampulha. No período de 1994 a 2008, foram confirmados 1.015 casos da doença, sendo que 79% destes concentraram-se nas cinco primeiras regionais citadas. Atualmente, a LV humana ocorre em todo o município de Belo Horizonte de maneira desigual entre as regionais (Genaro et al. 1990; Profeta da Luz et al. 2001; PBH, 2008).

**2.0 Justificativa**

## 2.0 Justificativa

Além dos casos clínicos registrados, é importante considerar que a infecção assintomática em seres humanos tem sido frequentemente relatada em áreas urbanas (Badaró et al. 1986; Caldas et al. 2002; Moreno et al. 2005; Moreno et al. 2009). Em estudo transversal de base populacional realizado em Sabará, na região metropolitana de Belo Horizonte, encontraram-se taxas de prevalência da infecção humana assintomática por *L. chagasi* entre 2,4% a 10,7%, dependendo do teste sorológico utilizado (Moreno et al. 2005, Moreno et al. 2006). Dessa forma, acredita-se que pessoas com infecção assintomática por *L. chagasi* devem ser investigadas para que seja possível estimar a real prevalência da infecção. Esse dado pode servir como base para delineamento e monitoramento de programas de controle.

O mesmo pode ser verificado em casos de LV canina. Estudos apontam que as taxas de prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em áreas endêmicas são mais altas que aquelas confirmadas por estudos sorológicos (Zaffaroni et al. 1999; Solano-Gallego et al. 2001) e a positividade na população canina, apesar de elevada, variando entre 4,3 a 9,3% no período de 1996-2007, pode estar subestimada em Belo Horizonte.

No Brasil, o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do Ministério da Saúde, objetiva a redução das taxas de letalidade, do grau de morbidade e dos níveis de transmissão da doença (Ministério da Saúde, 2006). Esse Programa tem como estratégias o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, identificação e eliminação de reservatórios domésticos, controle vetorial, além da educação em saúde. Os levantamentos epidemiológicos deveriam ser utilizados como uma ferramenta importante para auxiliar as estratégias de controle. Entretanto, inquéritos epidemiológicos baseados em sorologia nem sempre refletem exatamente a real situação da área de estudo. Esses métodos não necessariamente alcançam sensibilidades e especificidades satisfatórias, tendo em vista que muitos indivíduos infectados assintomáticos apresentam resultados de testes sorológicos negativos (Moreno et al. 2009).

Nesse contexto, acredita-se que a associação de técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico da LV permite uma representação mais

verdadeira da situação da infecção humana na área em estudo. Dessa maneira, o diagnóstico mais sensível da LV humana com a estimativa da parasitemia permite não somente o tratamento precoce daqueles que desenvolverem a doença, assim como o monitoramento dos resultados da terapêutica proposta e a avaliação das ações dos programas de controle.

Sendo assim, o uso de técnicas diagnósticas com princípios moleculares e sorológicos combinadas poderia ser considerado uma alternativa para identificação da prevalência da LV. Ao traçar um perfil mais verdadeiro da taxa de infecção da população em estudo, essas técnicas permitiriam a avaliação e o monitoramento do PCLV, assim como iriam promover o acompanhamento clínico, sobretudo, proporcionar tratamento adequado e imediato nos casos em que isso se fizer necessário.

### **3.0 Hipótese**

A determinação da taxa de prevalência da infecção de LV por meio da associação da sorologia e do método molecular é mais verdadeira e pode ser utilizada como ferramenta para elaboração e avaliação de programas de controle da LV.

**4.0 Objetivos**

#### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar a taxa de infecção por *L. chagasi* em crianças de 3 meses a 7 anos de idade residentes em área urbana de expansão da leishmaniose visceral por meio de testes sorológicos e ensaio molecular quantitativo

#### 4.2 Objetivos Específicos

- Realizar avaliação sorológica por meio de ensaio ELISA utilizando antígeno total e antígeno recombinante (rk39);
- Estimar prevalência da infecção por *L. chagasi* por meio da técnica molecular quantitativa (PCR em tempo real) de crianças previamente diagnosticadas como positivas em inquérito sorológico e de parte da população sorologicamente negativa em estudo da região Noroeste de Belo Horizonte, MG.
- Correlacionar os resultados encontrados entre diferentes métodos para diagnóstico e avaliar as variações encontradas entre as taxas de infecção por *L. chagasi*

## **5.0 METODOLOGIA**

### 5.1 Área de estudo

A área de estudo selecionada é a regional Noroeste do município de Belo Horizonte (BH), Minas Gerais (figura 1). Essa área foi escolhida por estar inserida em um projeto mais amplo de estudo epidemiológico quase-experimental, realizado para avaliar as estratégias do PCLV em diferentes áreas de abrangências (AA) dos Centros de Saúde dessa regional. As amostras foram coletadas em três AA onde o PCVL foi iniciado em diferentes momentos para análise da transmissão da infecção por *L. chagasi*. As áreas de abrangência selecionadas foram Serrano, Pindorama e Glória.



**Figura 1:** Belo Horizonte de acordo com as regiões administrativas e municípios limítrofes. Fonte: PBH

### 5.2 Delineamento do Estudo e Seleção da População

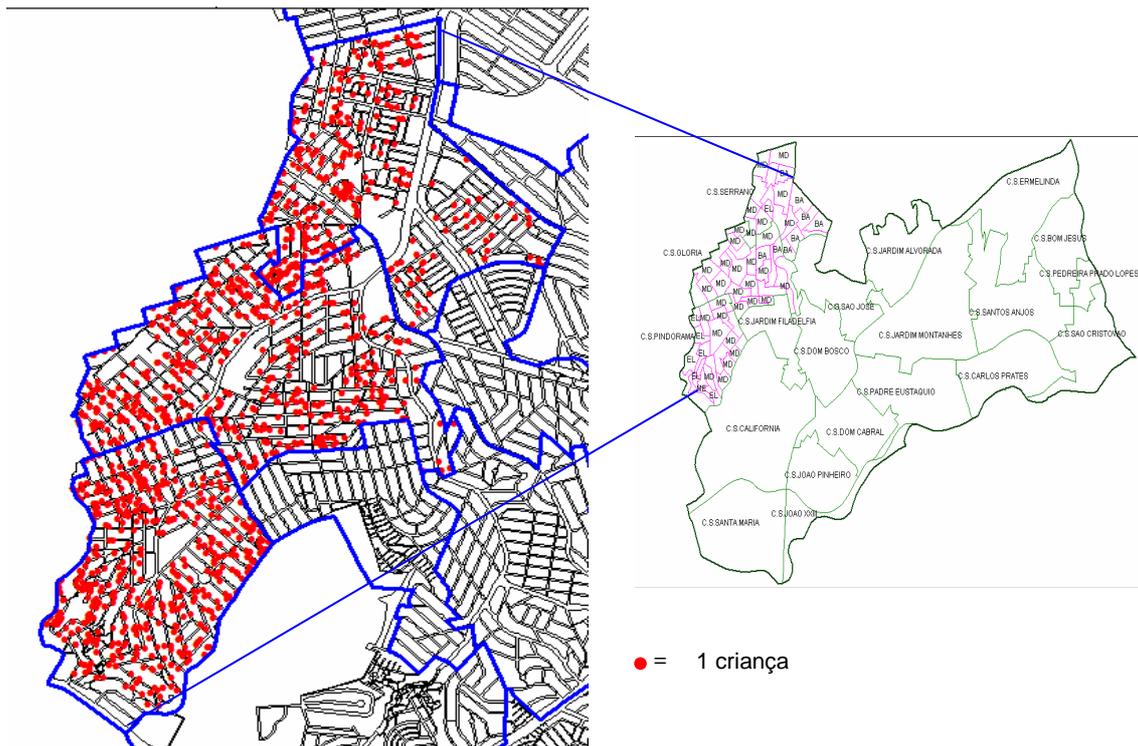
Realizou-se um estudo transversal para avaliação da infecção por *L. chagasi* em crianças na faixa etária de 3 meses a 7 anos, no período de outubro de 2009 e março de 2010. As populações de crianças por setor censitário da regional Noroeste de Belo Horizonte foram fornecidas pela

Gerência de Epidemiologia e Informação (GEEPI) e de Controle de Zoonoses (GECOZ) da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte (SMSA-BH).

O presente estudo baseou-se na análise de sangue coletado das crianças. A amostra selecionada para o estudo transversal foi de aproximadamente 620 moradoras de cada uma das três áreas de abrangência avaliadas, localizadas na regional Noroeste, totalizando 1875 crianças, sendo suficiente para um estudo transversal. O tamanho da amostra foi estimado com base nos seguintes parâmetros: (1) incidência da infecção humana de 2,7/100 em crianças menores de 12 anos obtido em um estudo realizado no município de Feira de Santana, Bahia; (2) erro  $\alpha = 0,05$ ; (3) poder do teste  $(1-\beta) = 0,90$ ; (4) diferença mínima detectada entre as áreas de 15% (Souza et al. 2008).

Para seleção das crianças foram utilizados os dados existentes no Programa de Saúde da Família das áreas de abrangência. As informações sobre as crianças consideradas para sorteio foram obtidas nas planilhas de acompanhamento das famílias, periodicamente atualizadas pelos agentes comunitários de saúde. Os domicílios contendo crianças foram selecionados aleatoriamente.

Foi realizado também o georreferenciamento dos endereços das crianças selecionadas a fim de apresentar a distribuição da amostra selecionada. A figura 2 apresenta o mapa das crianças avaliadas georreferenciadas. Cada ponto vermelho representa uma criança selecionada e visitada.



**Figura 2:** Mapa das áreas de abrangência trabalhadas na regional Noroeste de Belo Horizonte. Em vermelho, encontram-se as crianças selecionadas e visitadas para coleta de amostras.

Todas as amostras foram submetidas ao ensaio sorológico e aquelas diagnosticadas positivamente por esse método, assim como parte das negativas foram selecionadas para análise molecular.

### 5.3 Considerações Éticas

O projeto contendo o Termo de Consentimento Livre Esclarecido foi submetido aos comitês de ética em pesquisa da UFMG, da Prefeitura de Belo Horizonte e do Centro de Pesquisas René Rachou, sendo aprovado nas três instituições (COEP- UFMG – Parecer: ETIC 253/09; CEP- CPqRR – Carta de aprovação: 01/2010; CEP- SMSA/PBH – Parecer: 080.2008).

#### 5.4 Coleta de Dados e das Amostras

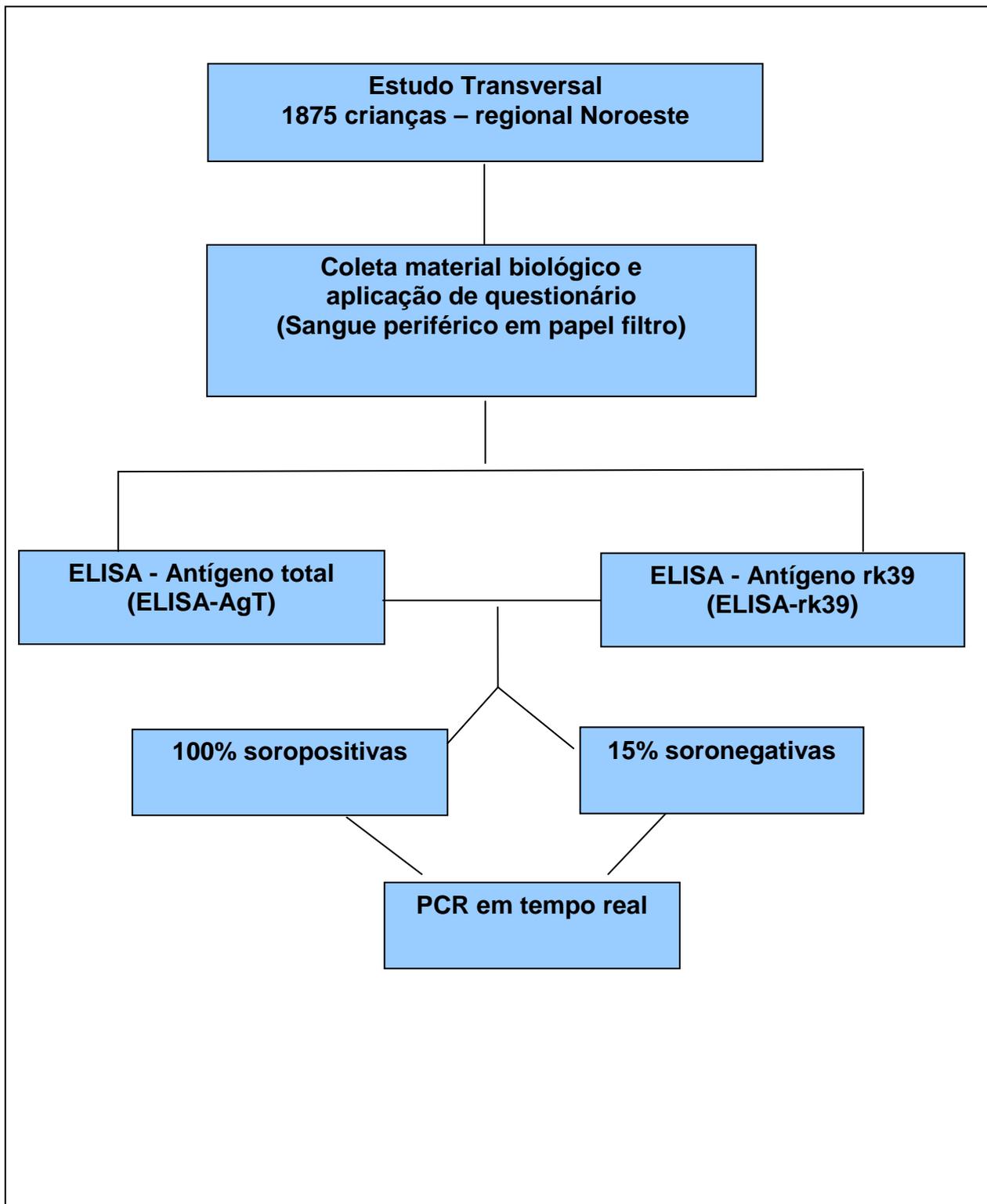
A coleta de dados e do material biológico foi realizada por agentes de saúde e técnicos de enfermagem contratados, comprovadamente habilitados para exercer a atividade. Ao chegarem aos domicílios sorteados, os agentes de saúde apresentavam os objetivos da pesquisa, liam e explicavam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 1), que foi devidamente assinado por um dos pais ou responsáveis pela criança. Ao ler o TCLE o morador foi informado de sua condição de responsável legal voluntário e teve assegurado seu direito de desistir da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo para a criança em estudo ou para a sua família. O voluntário teve suas dúvidas esclarecidas e recebeu uma cópia do TCLE contendo nome, endereço, telefone dos pesquisadores e do Comitê de Ética da SMSA/PBH, para eventuais esclarecimentos. As crianças foram submetidas a coletas de sangue em papel filtro (Whatman, número 4) por meio de punção digital.

Um dos responsáveis pelas crianças foi entrevistado com auxílio de questionário pré-codificado (anexo 2) no momento da coleta, solicitando informações demográficas; status socioeconômico; características da residência, entre outras. Os entrevistadores foram treinados e utilizaram um manual de instrução para garantir confiabilidade na coleta de dados.

#### 5.5 Diagnóstico

A partir das amostras de sangue coletadas foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA), com antígeno total de *L. chagasi* (ELISA -AgT) e com antígeno recombinante K39 (ELISA-rk39). As amostras com resultado positivo em qualquer um desses testes foram submetidas ao diagnóstico molecular por meio da PCR quantitativa em tempo real.

Uma subamostra de 15% das amostras negativas na triagem sorológica também foi avaliadas pelo ensaio de PCR em tempo real. O fluxograma a seguir ilustra as etapas do estudo (figura 3).



**Figura 3:** Fluxograma de delineamento do estudo.

### **5.5.1 Ensaios Sorológicos**

#### **5.5.1 a) ELISA-AgT e ELISA-rk39**

O Antígeno total de *L. (L.) chagasi* utilizado foi produzido no laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR – FIOCRUZ, a partir de promastigotas de *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) de acordo com Ho et al. (1983) e Pedras et al. (2008). Em contrapartida, o antígeno rK39 utilizado foi produzido e fornecido pelo Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, EUA.

O procedimento para realização dos ensaios imunoenzimáticos envolveu as seguintes etapas: sensibilização da placa com o respectivo antígeno, eluição da amostra em papel de filtro (Whatman nº4 com 5 mm de diâmetro), incubação das amostras, revelação com Tetrametilbenzidina e leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm.

O resultado de cada paciente era correspondente à média dos valores encontrados na duplicata em relação ao valor calculado para o ponto de corte diário de cada ensaio. Em todas as placas foram adicionadas sete amostras negativas para a determinação do ponto de corte e uma amostra positiva para controle do ensaio.

#### **5.5.2 Ensaio Molecular (PCR quantitativo em tempo real)**

Avaliou-se por meio da qPCR as amostras que foram diagnosticadas como positivas em qualquer um dos testes. O mesmo foi feito com 15% das amostras negativas, selecionadas aleatoriamente.

#### **5.5.2 a) Extração de DNA**

O DNA das amostras de sangue coletadas em papel filtro foi extraído por meio de Kit para extração de DNA: QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) seguindo protocolo do fabricante. Os devidos cuidados foram considerados para não haver contaminação entre as amostras. O protocolo de desinfecção dos picotadores proposto por Bone et al. (2008) foi seguido com essa finalidade.

### 5.5.2 b) Fragmento alvo e iniciadores

O gene da pequena subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA), conservado em todas as espécies de *Leishmania* foi escolhido como alvo (van Eys et al., 1992). Ele apresenta 160 cópias no genoma do parasito, o que confere sensibilidade e estabilidade quantitativa em potencial para o ensaio.

Os iniciadores senso LEIS. U1 (5` - AAGTGCTTTCCCATCGCAACT – 3`) e o antisense Leis. L1 (5` - GACGCACTAAACCCCTCCAA – 3`), que geram um fragmento de 67 pb do SSU rRNA, foram utilizados conjuntamente com uma sonda TaqMan, LEIS.P1 (FAM 5` - CGGTTCGGTGTGTGGCGCC –3` TAMRA) (Wortmann et al., 2001), por conferirem sensibilidade e especificidade ao ensaio.

### 5.5.2 c) Construção da curva padrão

O ensaio molecular em tempo real quantitativo realizado necessitou de uma curva padrão que foi construída com quantidades conhecidas de cópias do fragmento do genoma de *L. chagasi* a ser amplificado. Elaborou-se essa curva a partir de plasmídeos contendo o fragmento de interesse clonado. Dessa maneira, os produtos de PCR do SSU rRNA foram clonados no vetor pCR 4-TOPO (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) seguindo instruções do fabricante. A linhagem TOP10 da bactéria *Escherichia coli* foi submetida a ensaio de competência, por meio de choque térmico, a fim de torná-las aptas ao recebimento do vetor contendo o inserto. Após essa etapa, as colônias de bactérias foram avaliadas em PCR convencional com os iniciadores já mencionados para verificar a presença do fragmento de interesse, o qual foi submetido ao sequenciamento. Após essa confirmação, as bactérias foram crescidas por 12h a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina. A extração dos plasmídeos seguiu o protocolo de extração plasmidial do kit utilizado (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, PROMEGA). Posteriormente, os plasmídeos foram submetidos à reação de restrição enzimática para linearização. A concentração dos plasmídeos lineares foi dosada após purificação (Kit Healthcare Illustra Microspin G-25, GE) estando, dessa maneira, apropriados para utilização na curva padrão da qPCR.

### 5.5.2 d) PCR quantitativa em tempo real

A qPCR em tempo real foi utilizada para detectar a presença do DNA do parasito em amostras clínicas, bem como para determinar a quantidade de DNA de *Leishmania* presente nas mesmas. O DNA extraído das amostras de sangue foi submetido à amplificação e quantificação das cópias do fragmento de 69pb do SSU rRNA de *L. chagasi*.

As reações foram preparadas utilizando os iniciadores descritos e o sistema de detecção TaqMan® (IDT, EUA) para as amostras. As concentrações finais dos reagentes utilizados foram: TaqMan® MasterMix: 1x;, Sonda Leis P1: 0,25 pmol/μL; Primer Leis L1: 0,3 pmol/μL e Primer Leis U1: 0,3pmol/μL. O volume final das reações estabelecido foi de 20 μL. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata.

As curvas-padrões com 6 pontos em triplicata (diluições seriadas em base decimal de 17600 até 0,176 parasitos) de quantidades conhecidas dos plasmídeos pCR- 4 TOPO (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) com o gene de interesse clonado foram utilizadas em cada experimento.

O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 50°C por 2 minutos para ativação da enzima UDG; 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C 1 minuto para anelamento. Devido à pequena extensão do fragmento alvo, o ciclo relativo à temperatura de extensão não foi necessário.

Como controle do procedimento de extração e de amplificação, um ensaio de qPCR em tempo real foi utilizado para o gene humano da β-actina, utilizando os iniciadores Aco1 e Aco2 (Musso et al., 1996), que geram um fragmento de 120pb. O sistema de detecção utilizado nesse caso foi o SYBR Green (Applied Biosystems, Foster, EUA). Além disso, foi realizado um ensaio específico para avaliação dos controles negativos das extrações.

Ao longo dos ensaios com as amostras, a curva padrão, presente em todas as placas, foi considerada o controle positivo da reação.

O processamento das amostras de sangue foi realizado no Laboratório de Pesquisas Clínicas, do CPqRR/FIOCRUZ e o equipamento utilizado na realização dos ensaios foi o modelo StepOne plus (Applied Biosystems, Foster, EUA) .

## 5.6 Avaliação da confiabilidade

Para avaliar a reprodutibilidade dos testes diagnósticos (índice kappa) foram realizadas repetições em 10% das amostras, com leitura dos resultados independente em mascarado.

Para assegurar a confiabilidade dos ensaios quantitativos foram calculados os coeficientes de variação (CV) por meio da relação entre o desvio padrão e a média dos CTs de cada ponto da curva padrão em todos os ensaios realizados. Além disso, é interessante ressaltar que o *software* do equipamento *StepOne* versão 2.1 apresenta alguns parâmetros para a validação do experimento relacionados a aspectos como coeficiente angular (Slope), eficiência (Eff%) e linearidade da curva ( $R^2$ ). Todos esses parâmetros foram observados para a validação de cada um dos ensaios realizados.

## 5.7 Análise de dados

Os resultados dos exames laboratoriais e as informações coletadas a partir do questionário pré-codificado foram organizados em banco de dados com o auxílio do Programa Epi Data (versão 3.1). A análise e cruzamento dos dados foram realizados utilizando o software STATA versão 10.0.

A análise estatística foi conduzida pelas seguintes etapas:

- (i) Cálculo das estimativas de prevalência da infecção pelos diferentes métodos;
- (ii) Comparação entre os testes diagnósticos e reprodutibilidade utilizando-se a estatística kappa.

O georreferenciamento dos casos foi realizado por meio do programa MapInfo versão 8.5.

## **6.0 Resultados**

## 6.1 Dados de prevalência

### 6.1a) Sorologia

As 1875 amostras coletadas em papel filtro foram submetidas à sorologia. Pela técnica ELISA-AgT foram diagnosticadas como positivas 52 amostras, enquanto para ELISA- rk39 foram diagnosticadas 280 amostras positivas. O total de 317 amostras foram positivas em pelo menos um dos testes realizados. Somente 15 amostras foram diagnosticadas positivas simultaneamente nos dois métodos. Os dados de prevalência da infecção por *L. chagasi* estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1:** Prevalência da infecção por *L. chagasi* segundo métodos sorológicos em crianças residentes na regional Noroeste de BH, 2010.

	Positivas	Negativas	Prevalência (%) (IC 95%)
<b>ELISA –AgT</b>	52	1823	2,8 (2,2-3,7)
<b>ELISA – rk39</b>	280	1595	14,9 (13,4-16,7)
<b>ELISA-AgT e/ou ELISA-rk39</b>	317*	1558	16,9 (15,3-18,7)

\*15 amostras foram positivas nos dois testes simultaneamente.

### 6.1 b) Ensaio molecular quantitativo

Avaliou-se por meio da qPCR as 317 amostras diagnosticadas positivamente pelas técnicas sorológicas e 242 amostras negativas pela sorologia, selecionadas aleatoriamente. A tabela 2 mostra os resultados obtidos considerando a subamostragem selecionada.

**Tabela 2:** Prevalência infecção por *L. chagasi* segundo a qPCR em crianças residentes na regional Noroeste de BH (amostra n= 559), 2010.

	Positivas	Negativas	Prevalência (% positivos)
qPCR	82	477	14,7%

Entre as 82 amostras positivas na qPCR, 49 (59,8%) foram positivas na sorologia e 33 (40,2%) foram negativas.

A estimativa de prevalência da infecção por *L. chagasi*, detectada pela qPCR utilizando a amostra total como parâmetro também foi calculada. O valor encontrado para essa estimativa foi de 13,9%. Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Para determinação da prevalência de infecção pelos métodos sorológicos isolados, utilizou-se a relação direta entre as amostras diagnosticadas como positivas e o número total de amostras.

Em contrapartida, para a determinação da prevalência de infecção pelo método molecular quantitativo e suas associações foi proposto o seguinte modelo:

I) Cálculo da porcentagem de amostras PCR positivas (n) entre as negativas (559-n) do(s) método(s) a se comparar (A):

$$\frac{\text{amostras positivas somente na qPCR}}{559\text{-amostras positivas na técnica a se comparar}} = A$$

II) Estimativa do número de amostras que seriam positivas pela técnica qPCR caso a mesma tivesse sido realizada em todas as 1875 amostras (B):

$$(1875 - \text{amostras positivas na técnica a se comparar}) \times (A) = (B)$$

III) Cálculo do número total de amostras positivas pelo(s) método(s) a se comparar (C):

$$(B) + \text{amostras positivas na(s) técnica(s) a se comparar} = (C)$$

IV) Cálculo da prevalência considerando as estimativas propostas (Prev.%)

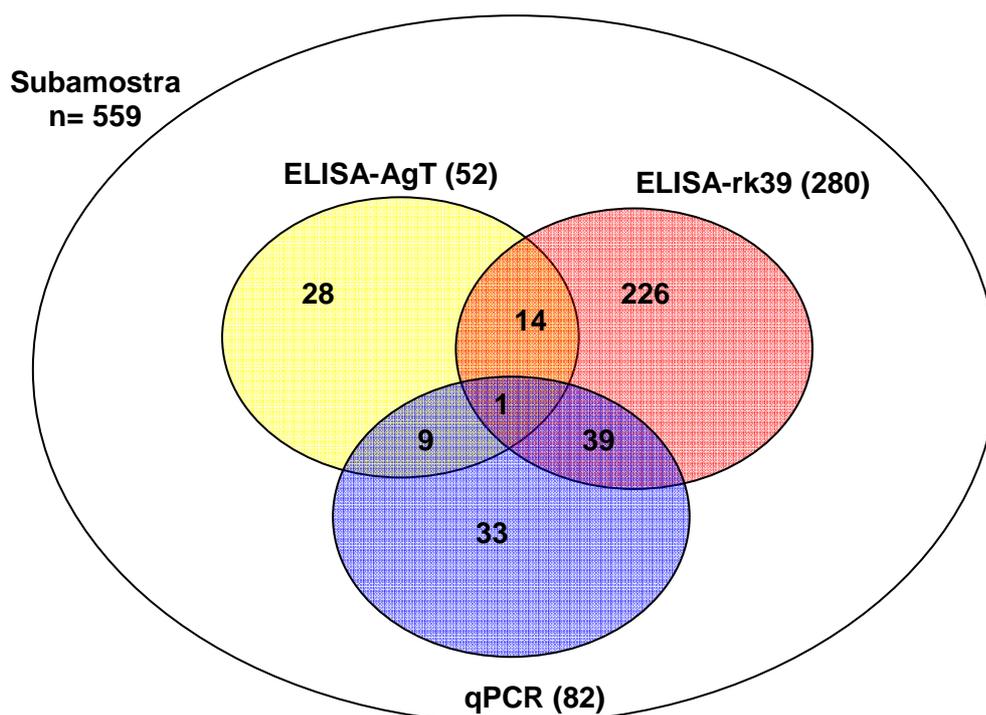
$$\frac{(C) \times 100}{1875} = \text{Prev. (\%)}$$

**Tabela 3:** Estimativa da prevalência de infecção por *L. chagasi* em crianças residentes na regional Noroeste de BH segundo a qPCR (amostra n =1875).

	<b>% Positivas entre negativas pela sorologia</b>	<b>Número esperado de amostras positivas pela qPCR</b>	<b>Prevalência (%) (IC 95%)</b>
<b>qPCR</b>	13,6% (33/242)	260,9 [(1558 x 0,136) + 49]	13,9 (12,4-15,5) (260,9/1875)

### 6.1 c) Associações de técnicas diagnósticas

Observou-se que algumas amostras foram positivas em mais de um teste. A associação entre as técnicas diagnósticas utilizadas pode ser visualizada na figura 4 e tabela 4.



**Figura 4:** Associação entre as amostras positivas para infecção por *L. chagasi* de acordo com os métodos sorológicos (ELISA-AgT e ELISA-rk39) e a qPCR.

**Tabela 4:** Associação entre as amostras positivas para infecção por *L. chagasi* pelos diferentes testes e o número de concordantes.

Associação	Amostras concordantes
ELISA-AgT e ELISA-rk39	15
ELISA-AgT e qPCR	10
ELISA- rk39 e qPCR	40
ELISA-AgtT, ELISA-rk39 e qPCR	1

A tabela 5 apresenta as prevalências de infecção por *L. chagasi* na regional Noroeste de Belo Horizonte considerando a associação entre as técnicas sorológicas e a qPCR. Para associação entre qPCR e ELISA-rk39, o valor encontrado foi 16%; para qPCR e ELISA-AgT foi de 25,7% e para a associação das três técnicas realizadas a prevalência encontrada foi de 30,8%.

**Tabela 5:** Prevalência da infecção por *L. chagasi* em crianças residentes na regional Noroeste de BH por meio da associação de técnicas sorológicas e qPCR .

		qPCR		
		Positivas (%)	Negativas (%)	Prevalência (% positivos)
<b>ELISA -rk39</b>	<b>Positivas</b>	40 (7,2)	240 (42,9)	16,0
	<b>Negativas</b>	42 (7,4)	237 (42,5)	
	<b>Total</b>	82 (14,6)	477 (85,4)	
<b>ELISA –AgT</b>	<b>Positivas</b>	10 (1,8)	42 (7,6)	25,7
	<b>Negativas</b>	72 (12,8)	435 (77,8)	
	<b>Total</b>	82 (14,6)	477 (85,4)	
<b>ELISA AgT e/ou ELISA- rk39</b>	<b>Positivas</b>	49 (8,7)	268 (47,9)	30,8
	<b>Negativas</b>	33 (5,9)	209 ( 37,5)	
	<b>Total</b>	82 (14,6)	477 (85,4)	

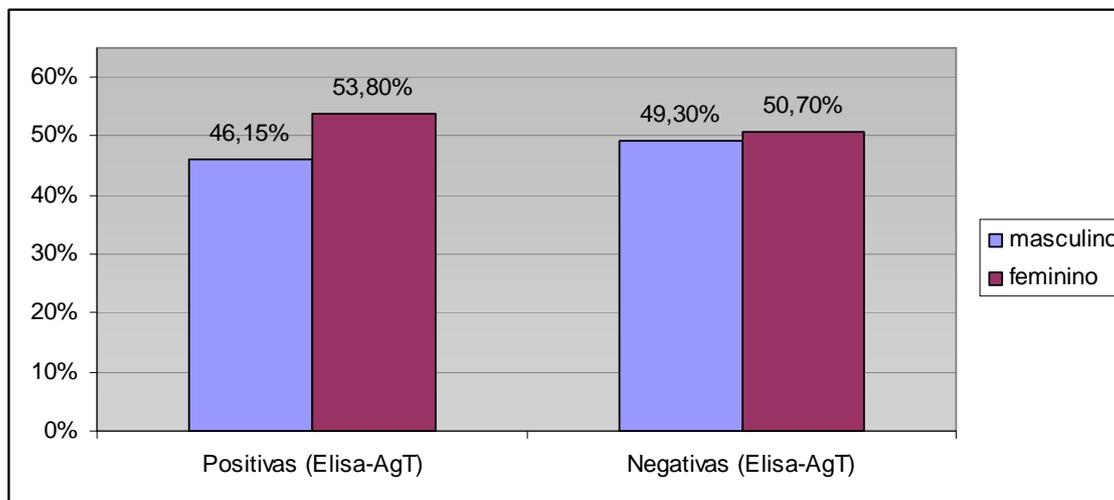
A estatística kappa foi realizada para verificar a concordância entre todas as associações de métodos propostas e o índice encontrado foi <0,1 em todas as análises, indicando fraca concordância.

## 6.2 Caracterização das crianças consideradas reativas aos testes

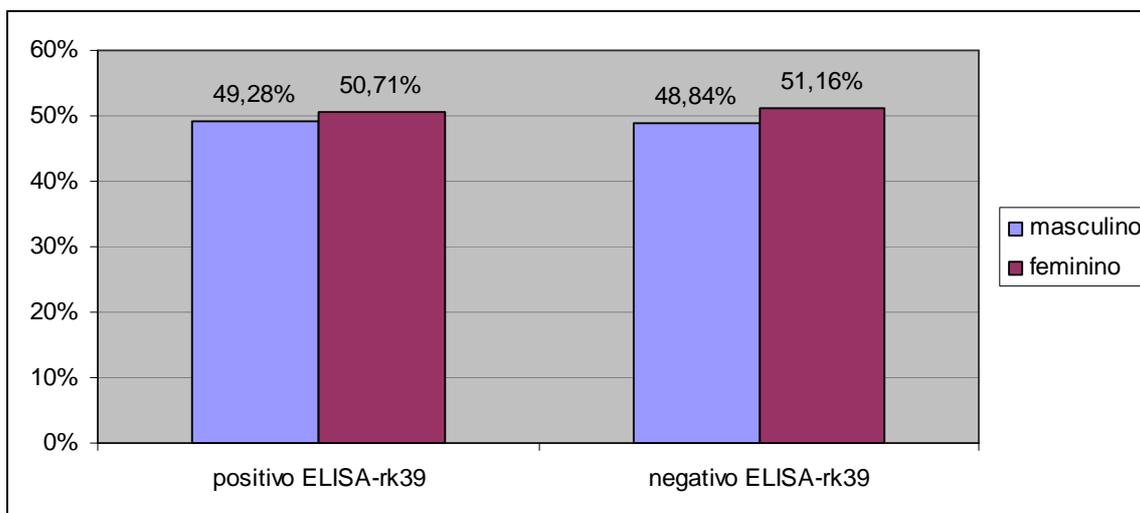
Parâmetros como sexo e idade das crianças consideradas reativas pelos testes realizados foram avaliados.

Considerando a amostragem total, das 1875 crianças, 48,91% eram do sexo masculino e 51,09% eram do sexo feminino. Já no subgrupo de 559 crianças, 47,58% eram do sexo masculino e 52,42% do sexo feminino.

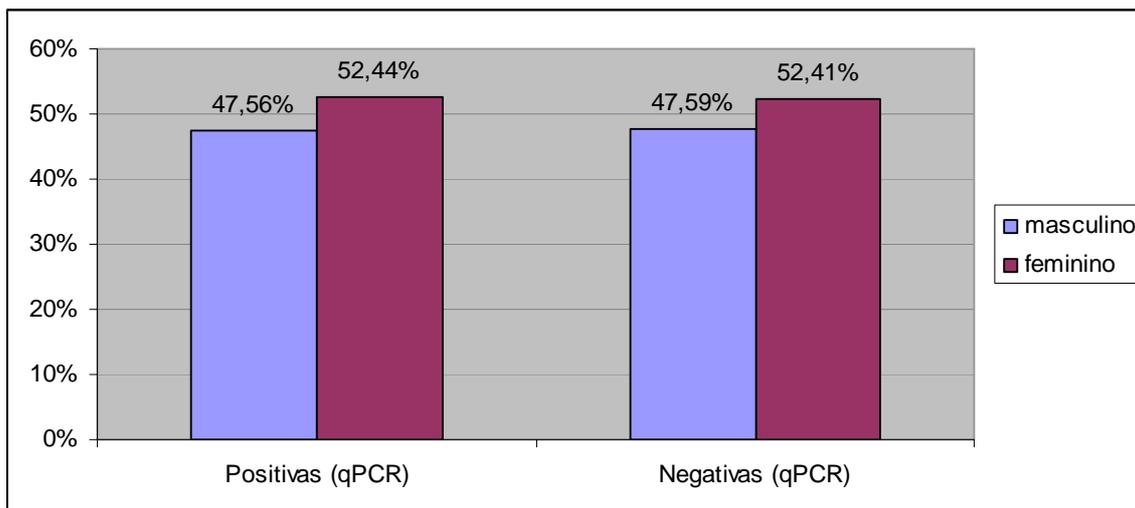
A relação entre o resultados dos testes realizados e o sexo das crianças estão apresentadas nas figuras 5, 6 e 7 a seguir.



**Figura 5:** Amostras positivas e negativas pelo ELISA-AgT de acordo com o sexo da criança.

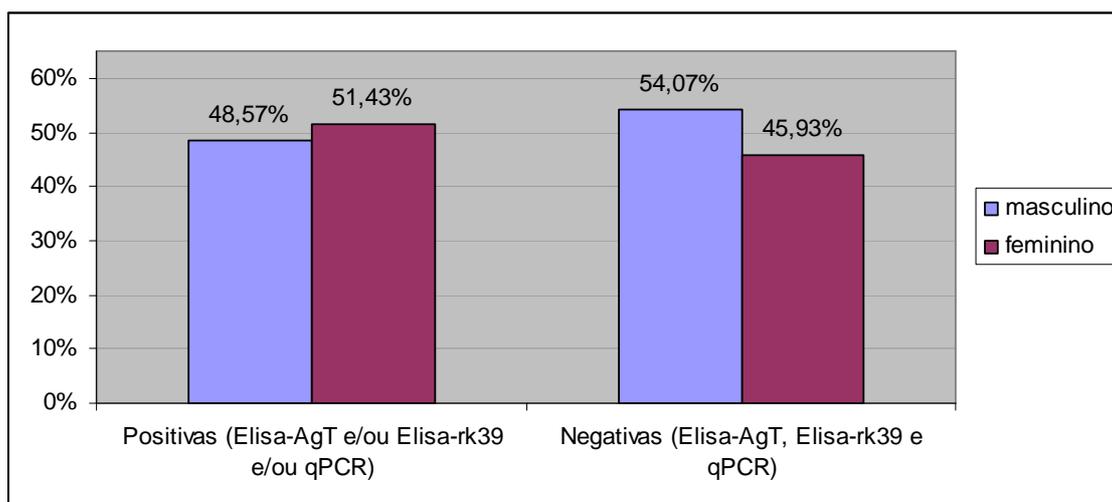


**Figura 6:** Amostras positivas e negativas pelo ELISA-rk39 de acordo com o sexo da criança.



**Figura 7:** Amostras positivas e negativas pela qPCR de acordo com o sexo da criança.

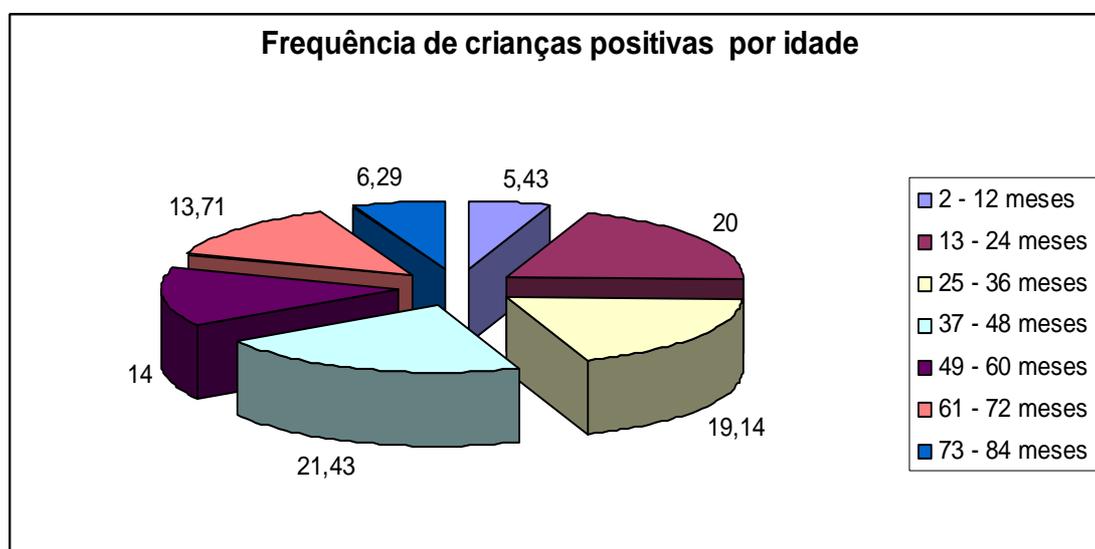
A figura 8 mostra a relação entre o resultado dos testes e o sexo da criança, sendo ela positiva em pelo menos um teste ou negativa em todos os testes realizados.



**Figura 8:** Amostras positivas em pelo menos um teste (qPCR e/ou ELISA-AgT e/ou ELISA-rk39) e negativas em todos os testes para infecção por *L. chagasi* relacionadas ao sexo da criança.

Foi realizada a estatística do  $X^2$  de Pearson para avaliar o sexo das crianças e o resultado dos testes. O valor encontrado para associação das três técnicas foi  $X^2 = 0,0194$  ( $p=0,889$ ). Para o ELISA-rk39,  $X^2 = 0,0189$  ( $p=0,891$ ); para o ELISA-AgT,  $X^2 = 0,162$  ( $p=0,687$ ) e para a qPCR  $X^2 = 0,001$  ( $p=0,996$ ).

A média de idade da população estudada foi de 42,07 meses ( $\pm 20,4$ ), sendo a menor idade 3 meses e a maior 84 meses. A figura 9 mostra a distribuição das crianças positivas para infecção por *L. chagasi* em pelo menos um dos testes realizados (qPCR, ELISA-AgT ou ELISA-rk39) de acordo com a idade. Nesse gráfico é possível observar que a maior frequência de crianças positivas está na faixa etária de 37 a 48 meses.



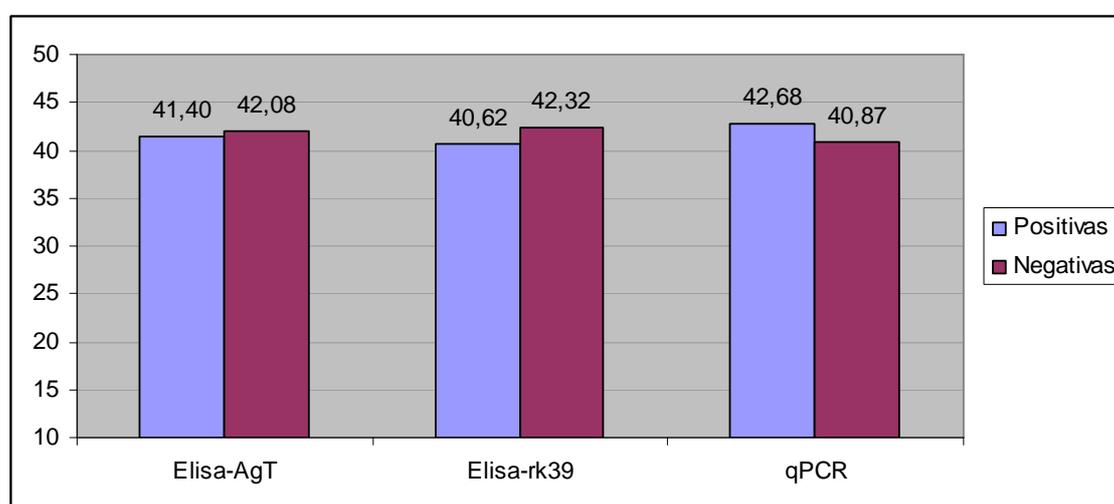
**Figura 9:** Relação entre idade e positividade da criança para infecção por *L. chagasi* em pelo menos um dos testes realizados (qPCR, ELISA-AgT ou ELISA-rk39).

A tabela 6 e a figura 10 mostram as médias de idade de acordo com os resultados dos testes realizados. Foi realizado o teste t de "Student" para avaliar diferenças entre as médias de idades encontradas entre as crianças diagnosticadas como positivas e negativas em cada teste. O valor p encontra-se na tabela 6

**Tabela 6:** Relação entre a média de idade das crianças e resultado dos testes realizados [média em meses, ( $\pm$ desvio padrão)] e valor p (teste *T*).

Técnica	Média de idade (meses)		p-valor*
	Positivas	Negativas	
ELISA-AgT	41,4 ( $\pm$ 17,58)	42,08 ( $\pm$ 20,5)	0,812
ELISA-rk39	40,62 ( $\pm$ 20,00)	42,32( $\pm$ 20,49)	0,198
qPCR	42,68 ( $\pm$ 20,01)	40,87( $\pm$ 20,01)	0,459

\*teste *T* de Student



**Figura 10:** Relação entre a média de idade das crianças (meses) e resultado dos testes realizados.

As amostras analisadas foram classificadas de acordo com as faixas etárias, pelo número de amostras das crianças examinadas e a proporção entre positivas e negativas em cada teste. Os resultados estão apresentados nas tabelas 7, 8 e 9.

**Tabela 7:** Proporção de amostras positivas e negativas pelo ELISA-AgT de acordo com total de amostras avaliadas por idade.

Idade	ELISA-AgT		Total de amostras
	Positivas	Negativas	
2-24 meses	12 (2,5%)	469 (97,5%)	481
25-48 meses	24 (3,6%)	634 (96,4%)	658
49-72 meses	14 (2,2%)	609 (97,8%)	623
> 72 meses	2 (1,8%)	111 (98,2%)	113
Total	52	1823	1875

**Tabela 8:** Proporção de amostras positivas e negativas pelo ELISA-rk39 de acordo com total de amostras avaliadas por idade.

Idade	ELISA-rk39		Total de amostras
	Positivas	Negativas	
2-24 meses	74 (15,4%)	407 (84,6%)	481
25-48 meses	112 (17,0%)	546 (83%)	658
49-72 meses	75 (12,0%)	548 (88,0%)	623
> 72 meses	19 (16,8%)	94 (83,2%)	113
Total	280	1595	1875

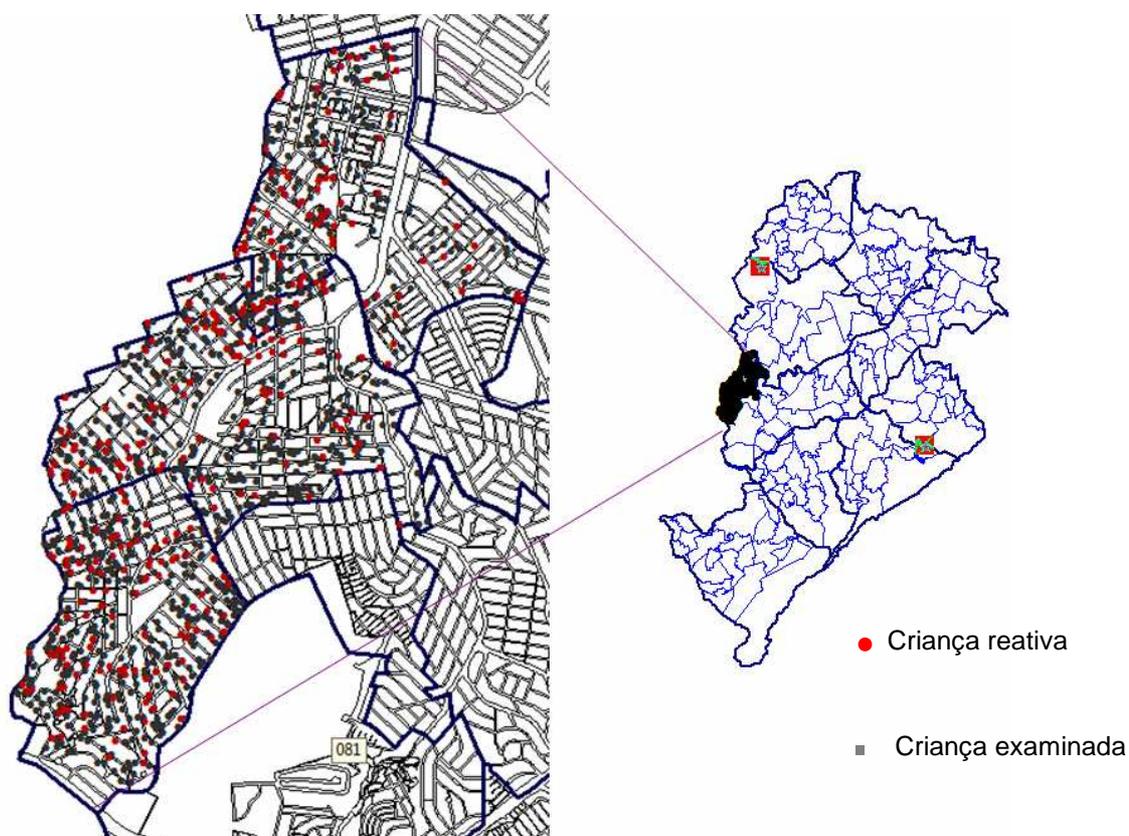
**Tabela 9:** Proporção de amostras positivas e negativas pela qPCR de acordo com total de amostras avaliadas por idade.

Idade	qPCR		Total de amostras
	Positivas	Negativas	
2-24 meses	20 (12,9%)	134 (87,1%)	154
25-48 meses	32 (15,7 %)	172 (84,3%)	204
49-72 meses	24 (14,4%)	143 (85,6%)	167
> 72 meses	6 (17,6)	28 (82,4)	34
Total	82	477	559

Foi realizada a estatística do  $X^2$  de Pearson para avaliar as faixas etárias das crianças de acordo com o resultado dos testes. O valor encontrado para associação entre as idades e o ELISA-rk39 foi  $X^2 = 6,675$  ( $p=0,08$ ); para o ELISA-AgT,  $X^2 = 3,06$  ( $p=0,382$ ) e para a qPCR foi de  $0,769$  ( $p=0,857$ ).

#### 6.4 Georreferenciamento dos casos detectados

Foi realizado o georreferenciamento dos casos considerados positivos em pelo menos um dos testes com o objetivo de verificar a extensão da infecção por *L. chagasi* na área estudada. A figura 11 apresenta o mapa dos casos georreferenciados. Cada ponto vermelho representa um caso de infecção por *L. chagasi*.



**Figura 11:** Georreferenciamento dos casos diagnosticados como positivos em pelo menos uma das técnicas utilizadas. Os pontos vermelhos correspondem aos casos de infecção por *L. chagasi* detectados. Em cinza estão as crianças analisadas. O mapa menor mostra a localização da regional noroeste em BH e as áreas de abrangências estudadas.

## 6.4 Quantificação das amostras diagnosticadas como positivas para LV por meio da qPCR

Além de fornecer o diagnóstico, a qPCR permite a quantificação da carga parasitária em amostras positivas. A média dos níveis de parasitemia encontrados entre os indivíduos assintomáticos foi de 56,5 parasitos/mL de sangue (valor normalizado por nanograma de DNA extraído).

## 6.5 Avaliação de Confiabilidade

### 6.5 a) Reprodutibilidade

Os resultados indicam boa concordância para o teste de ELISA-rK39, regular para qPCR e fraca para ELISA-AgT. Os resultados de reprodutibilidade das técnicas estão apresentados na tabela 10.

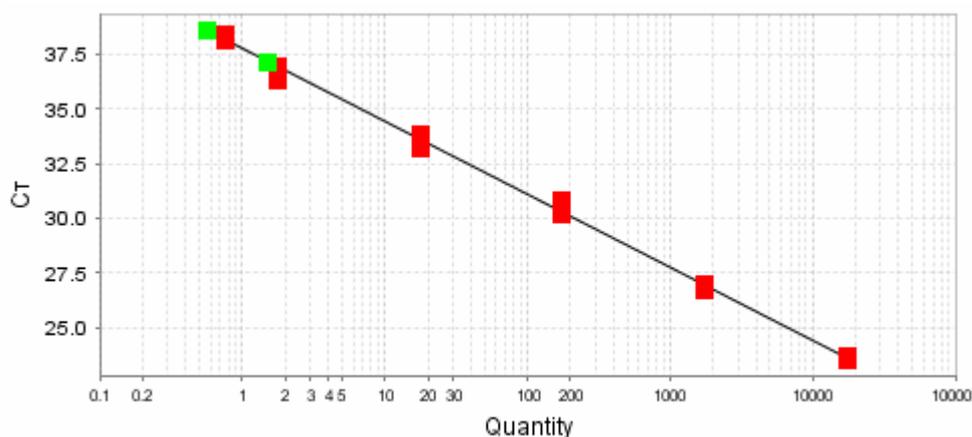
**Tabela 10:** Índices de concordância da reprodutibilidade das técnicas diagnósticas.

	Índice kappa	IC 95%
<b>ELISA-AgT</b>	0,2995	(0,1682 - 0,4308)
<b>ELISA-rk39</b>	0,6525	(0,5198 - 0,7852)
<b>qPCR</b>	0,5806	(0,3591 - 0,8022)

\* Índices calculados utilizando-se o software OpenEpi v.2

### 6.5 b) Confiabilidade dos ensaios quantitativos

A figura 12 ilustra a maneira como o *software* do equipamento StepOne versão 2.1 apresenta a curva padrão constituída a partir os pontos de concentrações conhecidas e pré-definidas relacionados aos seus respectivos “Cts”. A figura 12 mostra também os critérios de validação do ensaio propostos pelo próprio *software* do equipamento. Nesse ensaio apresentado o slope foi -3,34, o R<sup>2</sup> foi 0,997 e a eficiência da reação foi de 99,49%. Como foram realizadas várias reações de qPCR a fim de se testar todas as amostras, o valor médio encontrado ao longo de todos os ensaios para cada um desses critérios está apresentado na tabela 11.



**Figura 12:** Exemplo de curva padrão apresentada pelo *software* StepOne v2.1 de um dos experimentos de qPCR realizados. Os pontos vermelhos referem-se à curva padrão e em verde estão as amostras interpoladas.

**Tabela 11:** Média dos parâmetros de validação dos ensaios de qPCR relacionados à curva padrão.

Parâmetro	Média
Slope	-3,177 ( $\pm$ 0,12)
R <sup>2</sup>	0,989 ( $\pm$ 0.004)
Eficiência	97,43% ( $\pm$ 2,86)

Outro aspecto avaliado para medir a confiabilidade dos ensaios quantitativos foi o coeficiente de variação dos pontos da curva padrão apresentados na tabela 12. O coeficiente de variação (CV) foi calculado por meio da relação entre o desvio padrão e a média dos “Cts” de cada ponto em todos os ensaios realizados (tabela 12).

**Tabela 12:** Coeficientes de variação dos pontos da curva padrão.

	<b>Quantidade de parasitos</b>	<b>Média dos "Cts"</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>CV (%)</b>
Ponto 1	17600	23,06	0,54	2,35
Ponto 2	1760	26,63	0,81	3,05
Ponto 3	176	30,41	1,11	3,64
Ponto 4	17,6	33,02	1,08	3,27
Ponto 5	1,76	35,99	1,21	3,35
Ponto 6	0,176	38,18	1,32	3,46



No presente estudo, demonstrou-se a existência da infecção por *L. chagasi* em crianças residentes na regional Noroeste de Belo Horizonte, utilizando-se como métodos diagnósticos a sorologia (ELISA-AgT e ELISA-rk39) e a PCR quantitativa em tempo real.

A expansão da LV em áreas urbanas, que ocorre em Belo Horizonte, indica a necessidade de implementação de ações efetivas de controle da endemia, o que está diretamente relacionado à identificação das áreas de maior transmissão. Vários estudos sugerem que a taxa de assintomáticos pode ser maior do que esperado. Isso indica que embora o cão seja o principal reservatório da LV em áreas urbanas, é possível considerar que a prevalência de indivíduos assintomáticos infectados por *L. chagasi* em áreas endêmicas pode ter importância na manutenção de focos de LV e atua como um indicador da extensão da transmissão do parasito (Bañuls et al., 2007; Riera et al., 2004; Caldas et al., 2002; Biglino et al., 2010; Alborzi et al., 2008; Romero et al., 2009; Crescente et al., 2009).

Nesse contexto, os resultados apresentados mostram algumas das técnicas diagnósticas disponíveis e a variação encontrada ao se utilizar apenas uma técnica ou a associação delas no levantamento da infecção por *L. chagasi*.

Os resultados de prevalência apresentados na tabela 1 mostram que a sorologia realizada por meio do ELISA-AgT apresentou 2,8% de positividade, enquanto o mesmo teste realizado com o antígeno recombinante k39 apresentou positividade de 14,9%. Ao se utilizar o antígeno total, obtido a partir de formas promastigotas de *L. chagasi*, pretendia-se identificar a maior quantidade de possíveis amostras sororeativas, visto que de acordo com a literatura, antígenos totais tendem a apresentar maior variedade de epítomos detectáveis por anticorpos de indivíduos infectados (Cândido et al., 2008; Carvalho et al., 2003; Kumar et al., 2001). Assim, a maior ocorrência de amostras positivas ao ELISA-rK39, que apresenta um antígeno mais purificado, em relação ao ELISA-AgT, faz os achados assumirem uma posição discordante da encontrada por esses autores. No entanto, Souza et al. (2008), ao realizarem um inquérito sorológico utilizando como método diagnóstico o ELISA-AgT em crianças residentes no estado da Bahia, encontraram uma prevalência de 2,4% sororeativos, semelhante ao encontrado por esse estudo.

Pedras et al. (2008), em um estudo comparativo de técnicas no diagnóstico de indivíduos com LV clínica e grupos-controle não encontrou diferença significativa entre a sensibilidades do ELISA-AgT e o ELISA-rk39, sendo 89,8% e 88,6% respectivamente. Isso mostra que o ELISA-rk39 também pode ser considerado uma ferramenta para triagem, sendo possível, assim, identificar grande número de amostras sororeativas, como observado nesse trabalho.

Em relação aos dados de prevalência segundo a técnica molecular, pode-se observar que ao calcular a prevalência a partir do subgrupo de 559 amostras, obtem-se um índice de 14,7% (Tabela 2). Entretanto, esse índice isoladamente, não é representativo. Isso porque parte dessa subamostragem (317 amostras) não foi selecionada de maneira aleatória, mas por critério de sororreatividade dos indivíduos. Dessa maneira, o cálculo da prevalência estimada a partir dos indivíduos sorologicamente negativos e considerando também os positivos, resultando em 13,9% de assintomáticos, como indicado na metodologia e apresentado na tabela 3, seria mais adequado para utilização nas associações e interpretação dos dados.

Ao associar as técnicas ELISA-AgT e ELISA-rk39 foi possível perceber um aumento da positividade nas crianças, passando para 16,9%. O mesmo ocorreu quando se associou as técnicas sorológicas com a qPCR. Em todos os casos foi observado aumento da prevalência de infecção por *L. chagasi* como pode ser verificado na tabela 5. A positividade na associação da qPCR com o ELISA-rk39 fez aumentar os índices de 14,9%, quando avaliado o ELISA-rk39 separadamente, para 16,0% quando avaliado em conjunto. Para a associação do ELISA-AgT com a qPCR houve aumento para 25,7%; e na associação das três técnicas o índice chegou a 30,8% de positividade. Os maiores aumentos foram verificados na associação entre qPCR e ELISA-AgT, e na associação das três técnicas utilizadas. Esse aumento da prevalência pode ser explicado pelo fato de o número de amostras concordantes entre os testes ser pequeno. Assim, a quantidade de amostras positivas aumenta quando ocorre a combinação de técnicas e são selecionadas as reativas por um ou mais métodos.

Além disso, sabe-se que a associação de métodos diagnósticos em paralelo provoca aumento da sensibilidade e diminuição da especificidade.

Consequentemente, aumenta-se a probabilidade de conseguir uma maior abrangência da detecção dos indivíduos assintomáticos na região onde ocorre a transmissão (Moreno et al., 2009; Souza et al., 2008). Nesses casos, considera-se a possibilidade de que falsos positivos estejam presentes dentre essas amostras.

A avaliação da concordância entre as técnicas mostrou que as mesmas apresentam baixos índices de correlação. O índice kappa foi menor que 0,1 tanto na associação de apenas métodos sorológicos, quanto na associação entre as técnicas sorológicas e a qPCR.

Os baixos índices de concordância observados entre as técnicas podem ser explicados pelos diminuídos títulos de anticorpos produzidos no sangue e devido ao pequeno número de parasitos encontrados em assintomáticos, o que já foi sugerido por outros autores (Moreno et al., 2009). De acordo com a figura 4 e tabela 4, apenas uma amostra foi concordante entre as três técnicas. Posteriormente, realizou-se uma averiguação e foi descoberto que essa amostra referia-se a uma criança que desenvolveu a forma clínica da LV e estava em estágio de tratamento, o que indica que a mesma não se encaixa no perfil dos assintomáticos.

As discordâncias entre as técnicas sorológicas comprovam que os antígenos reconhecidos por pacientes assintomáticos são muito variáveis e que a utilização isolada de métodos sorológicos pode subestimar as verdadeiras taxas. Gontijo e Melo (2004) também referenciaram o método ELISA como pouco preciso na detecção de assintomáticos. Romero et al. (2009) realizaram um estudo comparativo de técnicas sorológicas em vários grupos de indivíduos, incluindo os assintomáticos provenientes de área endêmica. Os resultados encontrados pelo referido estudo não permitiram estabelecer um método de escolha para o diagnóstico da infecção em assintomáticos devido às baixas concordâncias verificadas. O kappa por eles encontrado entre ELISA-AgT e ELISA-rk39 também foi abaixo de 0,1. Limitação semelhante da técnica ELISA na detecção de assintomáticos pode ser verificada em inquéritos envolvendo a prevalência de LV na população canina (Berrahal et al., 1996, Reale et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2001; Lachaud et al., 2002).

Uma baixa associação foi encontrada entre a sorologia e a qPCR. Vários autores mostram casos de amostras proveniente tanto de humanos quanto de

cães diagnosticadas positivamente por meio da sorologia e negativamente pela técnica molecular para infecção por *L. chagasi* e também o inverso. (Ashford et al., 1995; Berahal et al., 1996; Quinnel et al., 2001; Solano-Galego et al., 2001; Moreno et al., 2009). As explicações para esses casos baseiam-se no fato de que no início da infecção, antes de ocorrer a soroconversão ou o desenvolvimento de sintomas, a PCR é mais sensível que a sorologia. Entretanto, com a progressão da doença há uma elevação nos títulos de anticorpos e a sensibilidade da sorologia é aumentada (Quinnel et al., 2001). É preciso considerar também a possível presença de amostras falso-positivas detectadas pela sorologia.

A caracterização da população de crianças em relação ao sexo mostrou que a amostra encontrava-se homoganeamente distribuída entre os dois sexos. Além disso, por meio da comparação entre os resultados dos métodos diagnósticos e o sexo da criança não foi possível notar diferença significativa entre positividade de meninas e meninos ( $p > 0,05$  em todas as relações). Para as três técnicas utilizadas, o número de crianças do sexo masculino diagnosticadas positivamente foi muito semelhante àsquelas do sexo feminino. Vários autores (Costa et al. 1990; Marzochi & Marzochi, 1994 e Nascimento et al., 1996) assim como o Manual de Vigilância e Controle da LV (MS, 2006) relatam que o sexo masculino é mais afetado pela forma clínica da LV (aproximadamente 60%). Entretanto, no que se refere aos indivíduos assintomáticos, no Brasil, não se tem observado diferença de soroconversão entre os dois sexos (Evans et al. 1992, Moreno et al. 2005; Caldas et al. 2002; Souza et al. 2008). Os dados obtidos também sugerem que essa predominância de sexo pode não existir no caso de infecções subclínicas.

Em relação às idades, foi possível observar que a maioria das crianças consideradas positivas por pelo menos um teste se encontra na faixa etária de 37-48 meses (21,43%), seguido pelas crianças de 13 a 24 meses (20,0%) e 25 a 36 meses (19,14%). Conforme apresentado, a média de idade das crianças em estudo foi de 40,07 meses. Isso indica que a maioria das crianças diagnosticadas positivamente possuem idades próximas à média de faixa etária da população.

Foi realizada a estatística do  $X^2$  de Pearson para avaliar relação entre as faixas etárias classificadas e positividade das crianças pelos métodos

empregados. Não houve diferença significativa em nenhuma dessas associações (valor  $p > 0,05$ ). O teste “T” de Student foi utilizado para avaliar diferença entre as médias de idade e o resultado dos testes. O valor  $p > 0,05$  mostrou também não haver diferença significativa entre as médias de idades de crianças positivas e negativas por teste (tabela 6). No Brasil, as diferenças já observadas em relação à idade estão relacionadas a casos clínicos de LV, verificando-se a ocorrência de 80% dos casos em crianças com menos de 10 anos (Badaró et al. 1986; Costa et al. 1990; Marzochi, 1994). Entretanto, para assintomáticos não se tem observado associação entre infecção e idade, conforme observado por Cunha et al. (1995), Moreno et al. (2005), Caldas et al. (2002) e Souza et al. (2008).

O mapa de georreferenciamento dos casos mostrou uma distribuição abrangente dos indivíduos assintomáticos ao longo das três áreas estudadas. Isso sugere que as condições para manutenção do ciclo de transmissão do parasito causador da LV encontram-se adequadas e que as ações de controle ali empregadas podem ser consideradas pouco eficientes (figura 11).

A realização da qPCR permitiu não apenas o diagnóstico das amostras positivas, mas também a quantificação do DNA de *Leishmania* sp. presente nas mesmas. Sabe-se que a PCR em tempo real possibilita, basicamente, a realização de três tipos de ensaios: quantificação absoluta, quantificação relativa e discriminação alélica. A quantificação absoluta foi o método escolhido. Considerando que a quantificação está diretamente relacionada à intensidade do sinal gerado e reflete a quantidade do produto formado no decorrer da termociclagem, a detecção da infecção associada à quantificação de seu agente etiológico torna-se viável (Kubista et al. 2006).

Nesse estudo, a média de parasitos encontrados em amostras clínicas foi de 56,5 parasitos/mL de sangue, valor calculado considerando a dosagem de DNA extraído e os volumes empregados em cada etapa. Esse valor está acima do encontrado por Mary et al. (2004) e Verma et al. (2010), que realizaram um estudo de monitoramento da carga parasitária em pacientes em tratamento com a forma clínica de LV e assintomáticos. Entretanto, ao comparar os experimentos de quantificação realizados nesse estudo e pelos autores citados é possível observar características que influenciariam nos resultados. Esses autores utilizaram iniciadores com alvo no kDNA, diferindo do

presente trabalho que tem como alvo a subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA). Essa diferença no alvo de DNA torna a metodologia de quantificação bem distinta, pois o número de cópias do kDNA por parasito é bem superior ao número de cópias do SSU rRNA, influenciando diretamente a sensibilidade do método. Além disso, as amostras clínicas utilizadas pelos grupos citados são provenientes de outras origens que não o sangue periférico em papel filtro. O método de extração utilizado foi também distinto.

Para fins de averiguação do valor encontrado para carga parasitária, foi realizado um ensaio similar em amostras provenientes de crianças sintomáticos com a confirmação da forma clínica de LV seguindo os mesmos critérios daqueles realizados anteriormente. O valor da carga parasitária determinado para os pacientes foi expressivamente maior que o encontrado para os assintomáticos (dados não mostrados). Isso indica que o dado de carga parasitária não deve ser utilizado de forma isolada, mas de maneira comparativa ao longo do acompanhamento de cada paciente, ou entre grupos de indivíduos com a forma clínica da LV confirmada e assintomáticos.

Vários estudos encontrados na literatura utilizam experimentos de qPCR com a finalidade de monitoramento clínico e de terapêutica proposta para LV tanto em humanos quanto em cães (Aoun et al. 2009; Manna et al. 2008; Manna et al. 2009; Francino et al. 2006; Mukherjee et al. 2010; Silva et al. 2010). No caso de grupos assintomáticos, a determinação da carga parasitária poderia ser uma ferramenta para monitorar os níveis de parasitemia considerados insuficientes para desenvolvimento de sinais clínicos.

Todos os parâmetros de validação dos ensaios de qPCR foram considerados. Os índices slope ficaram próximos a -3,17, indicando uma eficiência satisfatória. Isso porque uma alta eficiência está associada a uma inclinação de aproximadamente 3,32 para cada diluição de 10x do DNA alvo (Too, 2003). Um slope de -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100% indicando que o número de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo da PCR, possibilitando, assim, considerar os valores médios encontrados de 97,45% de eficiência e 0,989 de coeficiente linear ( $R^2$ ) satisfatórias (Kubista et al. 2006).

O coeficiente de variação dos pontos da curva padrão ao longo de todos os ensaios também foi avaliado. Os valores encontrados para os seis pontos mostram uma variação de 2,35%; 3,05%; 3,64%; 3,27%; 3,35% e 3,46 %,

respectivamente para os pontos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (tabela 12). Essa variação predominantemente ascendente vai ao encontro dos resultados de Rolão et al. (2004) e Verma et al. (2010), sugerindo que as maiores concentrações de DNA apresentam menores variações entre os ensaios, ao passo que em menores concentrações estão sujeitas a variações maiores.

A medida de avaliação utilizada para a reprodutibilidade foi o índice Kappa. Conforme demonstrado na tabela 10, os valores encontrados estão aquém do que se desejaria. Entretanto, todos os cuidados relacionados à parte metodológica dos experimentos foram tomados. Os ensaios sorológicos seguiram o mesmo padrão, observando-se sempre os controles positivos, negativos e de determinação do “cut-off”, assim como os de níveis de absorbância obtidos e atenção à identificação das amostras. Para a qPCR, os parâmetros avaliados já foram mostrados e explicados. Dessa maneira, pode-se inferir que a variação encontrada está relacionada a limitações inerentes às amostras.

Embora a coleta em papel filtro seja a maneira mais viável de se conseguir realizar um levantamento epidemiológico desse tipo, o fato de essas amostras serem provenientes de sangue periférico de indivíduos assintomáticos pode ser considerado uma limitação. Já se sabe que esses indivíduos possuem baixos níveis de anticorpos e DNA alvo circulante, comprometendo, assim, o sucesso da ligação antígeno-anticorpo nos testes sorológicos e a produtividade da extração de DNA para a qPCR. Além disso, o papel utilizado possui em sua constituição substâncias variadas, algumas delas desconhecidas, que podem atuar como inibidoras nas reações, o que pode ser considerado outra limitação.

Apesar das limitações supracitadas, a metodologia de coleta proposta e realizada foi a maneira encontrada para desenvolvimento do projeto de acordo com as recomendações éticas, promovendo segurança aos envolvidos.

O estudo mostrou que independentemente da técnica utilizada nas associações, as taxas de prevalência de assintomáticos encontradas apresentam-se elevadas. Inquéritos epidemiológicos realizados por outros grupos também indicam que a prevalência da forma subclínica da LV em áreas endêmicas pode ser maior que o esperado (Bañuls et al. 2007). Souza et al. (2008) encontraram taxas de 14,9% ao associar o teste ELISA e a

intradermorreação de Montenegro para avaliar a prevalência da infecção em crianças residentes no município de Feira de Santana, na Bahia. Riera et al. (2004), utilizando a PCR, encontraram positividade de 22% entre doadores de sangue assintomáticos em uma área endêmica da Espanha. Em um outro estudo epidemiológico realizado por Caldas et al. (2002) em crianças de até 5 anos de idade residentes no estado de Maranhão apresentou 28,5%, como índice de prevalência para infecção por *L. chagasi* utilizando método sorológico. Romero et al., realizaram um estudo comparativo de técnicas sorológicas e encontraram para grupos provenientes de área endêmica em Minas Gerais, sem histórico de LV, 14,6% de prevalência pelo ELISA-rk39 e 26,6% por meio do ELISA-AgT.

As prevalências apresentadas nos resultados desse trabalho indicam que a infecção para *L. chagasi* na regional Noroeste de Belo Horizonte atinge parcela significativa da população de crianças. Dessa maneira, pode-se afirmar que a transmissão continua ocorrendo e que as ações de controle realizadas pelos órgãos competentes na referida região não tem sido efetivas.

Portanto, a aplicação de métodos diagnósticos associados pode ser considerada uma alternativa válida para ampliar a sensibilidade na identificação de assintomáticos em áreas endêmicas. Consequentemente, resultados mais próximos à realidade da região serão gerados, servindo assim, como base para avaliação e elaboração de medidas de controle mais efetivas.



## 8.0 Conclusões

- Embora as técnicas utilizadas tenham apresentado baixa concordância, os resultados obtidos indicaram a presença de infecção assintomática por *L. chagasi* na regional noroeste de BH.

- Tendo em vista as limitações das técnicas diagnósticas em assintomáticos, a determinação de um “*padrão ouro*” para diagnóstico da *infecção por L.(L.) chagasi* nesses indivíduos torna-se difícil de ser realizada.

- A associação de mais de uma técnica diagnóstica pode ser considerada uma alternativa para realizar uma identificação mais ampla de assintomáticos em uma área de estudo e permitir melhor avaliação e elaboração de medidas de controle mais efetivas.

-



- Andrade HM, Reis AB, Dos Santos SL, Volpini, AC, Marques MJ, Romanha AJ 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol.* 140: 231-238.
- Alborzi A, Pourabbas B, Shahian F, Mardaneh J, Pouladfar GR, Ziyaeyan M 2008. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in the whole blood of asymptomatic individuals by PCR-ELISA and comparison with other infection markers in endemic areas, southern Iran. *Am J Trop Med Hyg.* Dec;79(6):839-42.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10: 298-319.
- Aoun K, Chouih E, Amri F, Ben Alaya N, Raies A, Mary C, Bouratbine A 2009. Short report: Contribution of quantitative real-time polymerase chain reaction to follow-up of visceral leishmaniasis patients treated with meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* Dec;81(6):1004-6.
- Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker Jr RH, Badaró R, David JR 1995. Comparison of the polymerase and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Hyg.* 53 (3): 251-255.
- Badaró R, Jones TE, Carvalho EM 1986. .New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Disease* 154:1003-1011.
- Bañuls, A. L.; Hide, M.; Prugnolle, F 2007.. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, v. 64, p. 1-109,
- Berns DS e Rager B 2000. Emerging infectious disease: a cause for concern. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2(12): 919-923.
- Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, Pratlong F, Lachaud L, Bastien P, Dedet JP 2005. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect.* Oct;7(13):1370-5.

- Berrahal F; Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffer K, Lamouroux D, Dunan S. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. Jour. of Trop. Med. And Hyg.* 55: 273-277.
- Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A, Romano A, Ferroglio E 2010. *Asymptomatic Leishmania infantum infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. J Clin Microbiol. Jan;48(1):131-6.*
- Bonne N, Clark P, Shearer P, Raidal S 2008. Elimination of false-positive polymerase chain reaction results resulting from hole punch carryover contamination *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Vol. 20 Issue 1, 60-63.*
- Brasil 2009. Secretaria de Vigilância e Saúde. Distribuição dos casos confirmados de leishmaniose visceral de 1980 a 2005. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/visceral\\_2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/visceral_2006.pdf).> Acesso em: 20 nov. 2009.
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Jul;8(4):828-31.
- Britto C, Pirmez C, Fernandes O 2005. Técnicas básicas de diagnóstico molecular em doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura JR editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 195-23.
- Bruña-Romero O; Hafalla J.C.R.; Gonzalez-Asequinolaza G.; Sano G, Tsuji M, Zavala F 2001. Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single *Anopheles* mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int. J. Parasitol.* 31: 1499-1502.
- Burns JM Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 90(2):775-9.

- Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A 2002. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 96:21-8.
- Cândido TC, Perri SH, Gerzoschkwitz Tde O, Luvizotto MC, de Lima VM 2008. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. *Vet Parasitol*. Nov 7;157(3-4):175-81.
- Carvalho SF, Lemos EM, Co rey R, Dietze R 2003. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*; 68(3):321-4,
- Castilho TM, Camargo LMA, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM 2008 A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American *Leishmania* Species on the Basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg*, 78: 122–132.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* 5: 873-882.
- Collantes-Fernandez E; Zaballos A, Alvarez-Garcia G, Ortega-Mora L.M 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1194-1198.
- Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV 1990. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil., 1980-1986. *Rev Saúde Pública* 24: 361-72.
- Crescente JA, Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE 2009. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Dec;103(12):1250-6.
- Cunha S, Freire M, Eulalio C, Critosvao J, Netto E, Johnson WD Jr, Reed SG, Badaro R. 1995. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan

area of Brazil. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 89: 155-158.

Cupolillo E. Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. *Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. [on line]. Brasília, Brasil, 2005. [acessado em 28 de janeiro de 2010]. Disponível em: [http://www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf\\_final\\_leish\\_005.pdf](http://www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf_final_leish_005.pdf)*

Dantas-Torres F, Brandão-Filho S P 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48 (3): 151-156.

Desjeux P 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95 (3): 239-243.

Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 27 (5):305-18

Dey A, Singh S 2006. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol.* 24(3):165-70.

Evans TG, Teixeira MJ, Mc Auliffe IT, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Souza AQ 1992. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis.* 166: 1124-1132.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X. 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology, Amsterdam* 137: 214-221.

Gállego M 2004. Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis. *Rev Sci Tech.* 23(2):661-76.

Genaro O, Da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SI, Mayrink W 1990. Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 23:121

- Gomes AC 1992. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *An Bras Dermatol*; 67: 55-60.
- Gomes AC, Silva AR, Costa CHN, Scherlock I, Costa JML, Shaw J 1996. *Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): normas técnicas*. Brasília (DF): Fundação Nacional da Saúde.
- Gontijo CMF; Melo MN 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. bras. epidemiol.* [online], vol.7, n.3, pp. 338-349.
- Guerin PJ, Olliar OP, Sundar S, Bo eldert M, Croft SL, Desjeux P 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2(8):494-501.
- Ho M, Leeuwenburg J, Mbugua G, Wamachi A, Voller A 1983. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*;32:943-946.
- Hosmer DW, Lemeshow S 1989. *Applied Logistic Regression*. New York: Wiley.
- Hermsen CC, Telgt DS, Linders EH, Van de Locht LA, Eling WM, Mensink EJ, Sauerwein RW 2001. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol. Biochem. Parasit.* 118: 247-251.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG 2003. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology* 113: 99-113.
- Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey J, Lunney J.K 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2065-2071.
- Kafetzis DA, Maltezou HC 2002. Visceral leishmaniasis in paediatrics. *Curr Opin Infect Dis*; 15(3):289-94.

- Killick-Kendrick R, Rioux JA 2002. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*. 44(1-2):67-71.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N 2006. The Real Time Polymerase Chain Reaction. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
- Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. Nov;8(6):1220-4.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J.P., Bastien, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*. v. 125, n. Pt 3, p. 197-207, Sep 2002.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine 1*: 1-120,
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 435-443.
- Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J, Milon G 1996. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: A tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *Journal of Immunology* 157: 4537-4545.
- Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALV, Fiúza VOP, Rabello A 2001. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*34 (3): 249-254.
- Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 142: 271-280.

- Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE 2009. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci.* Aug;87(1):76-8.
- Manna L, Gravino AE, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C 2008. *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann N Y Acad Sci.* Dec;1149:358-60.
- Marfurt J, Nerderwieser I, Makia ND, Beck H, Felger I 2003. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 46(2): 115-124.
- Martin-Sanchez J, Pineda JA, Morillas-Marquez F; Garcia-Garcia JA, Acedo C, Macias J 2004. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Trop Med Hyg.* 70(5):545-8.
- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology* 42(11):5249-5255.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF 1994. Leishmanioses tegumentar e visceral no Brasil - Antropozoonoses emergentes e perspectivas de controle. *Cad Saúde Pública.* 10 (2): 359-75.
- Mattner F, Di Padova K, Alber 1997. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infection and Immunity* 65: 4378-4383.
- Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W 1998. Regional differences in the cellular immune to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity* 66:18-27.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFEP, Secundino NEC, Dias ES 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44: 255-259.

Ministério da Saúde 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, Ministério da Saúde.

Ministério da Saúde. SVS. [acesso em 29/05/08] [Leishmaniose Visceral – Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan]. Disponível em <http://www.saude.gov.br/svs>  
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/leishvi/bases/leishvbr.def>

Monteiro OS, Lacerda MM, Arias JR 1994 Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*; 27 (3): 67-72

Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF, Carneiro M 2005. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban área of Minas Gerais State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:456-463.

Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF, Carneiro M 2006. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, Brazil, using serological and molecular biology techniques. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:421-427.

Moreno EC, Gonçalves AV, Chaves AV, Melo MN, Lambertucci JR, Andrade AS, Negrão-Corrêa D, de Figueiredo Antunes CM, Carneiro M 2009. Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. Oct 20 3(10)536.

Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C 2004. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia* 46 (1-2): 163-167.

Mukherjee AK, Gupta G, Bhattacharjee S, Guha SK, Majumder S, Adhikari A, Bhattacharya P, Majumdar SB, Majumdar S 2010. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. *J Infect*. 2010 Jul;61(2):173-84.

Murray HW 2000. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int J Infect Dis*; 4:158-77.

- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*; 366 (9496):1561-77.
- Musso O, Sommer P, Drouet E, Cotte L, Neyra M, Grimaud JA, Chevallier M 1996. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *J Virol Methods*.56(2):125-37.
- Nascimento MDO, Costa D, Fiori J.M, Viana BI, Filho GM, Alvim Ade , Bastos C, Nakatan OC, Reed IM, Badaro R, Burattini MN 1996. The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhao, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 29, n. 3, p. 233-40, May-Jun.
- Nasereddin A, Ereqat S, Azmi K, Baneth G, Jaffe CL, Abdeen Z.J 2006. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J Parasitol*. 92(1):178-83.
- Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G 2002a. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol*. 40:1666-1669.
- Nicolas L, Milon G, Prina E 2002b. Rapid differentiation of world *Leishmania* species by lightcycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J. Microbiol. Met*. 51: 295-299.
- Nygren J, Svanvik N, Kubista M 1998. The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers* 46: 39-51.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L 2006. Incidence and time course of *Leishmania* infections detected by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 1318–1322.
- Oliveira RA, Silva LS, Carvalho VP, Coutinho AF, Pinheiro FG, Lima CG, Leandro JE Jr, Silva GB Jr, Daher EF 2006. Indian J Med Microbiol. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. Jul;24(3):165-70

- Oliveira, F.S.; Pirmez, C.; Pires, M.Q.; Brazil, R.P.; Pacheco; R.S 2005. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 129: 219–22.
- OMS - World Health Organization 1990.. Control of the leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series*, 793.
- OMS - World Health Organization 2006. Control of leishmaniasis. Technical Report Series 793:50-52.
- OMS - World Health Organization - acesso em 08/01/2010 Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- Patz JA, Daszak P, Tabor GM, Aguirre AA, Pearl M, Epstein J, Wolfe ND, Kilpatrick AM, Foufopoulos J, Molyneux D, Bradley DJ 2004. Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ. Health Perspect.* 112(10): 1092-1098.
- PBH- Prefeitura de Belo Horizonte- Portal internet.mht acesso em 16/05/08. <http://portal3.pbh.gov.br/pbh/index.html?idNv1=5&emConstrucaoNv1=N>
- Pedras MJ, de Gouvêa Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A 2008. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Feb;102(2):172-8.
- Piesman J, Schneider BS., Zeidner NS 2001. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1666-1669,
- Profeta da Luz ZM, Pimenta DN, Cabral AL, Fiúza VO, Rabello A 2001. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop.* May-Jun;34(3):249-54.
- Quaresma PF; Murta SMF; Ferreira EC; da Rocha-Lima ACVM; Xavier AAP; Gontijo CMF 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta tropica*;111(3):289-94.

- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso N.S, Caracappa S, Vesco G 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2931-2935.
- Reis A.B, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Science* 81: 68-75.
- Reithinger, R.; Quinzel, R. J.; Alexander, B.; Davies, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic test, Enzyme Immunosorbent-assay, PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 2352–2356, 2002. Reithinger et al. 2000
- Rica-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes G, Campino L 2003. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol. Research* 89:163-169.
- Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M 2004. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Feb;98(2):102-10.
- Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L 2004. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Parasitol.* 90: 1150-1154.
- Romero HD, Silva Lde A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, Alecrim W, Moraes-Souza H, Prata A 2009. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg* Jul;81(1):27-33.
- Ross R 1903. Further Notes on *Leishmania's* bodies. *British Medical Journal.* (11): 1401, 1903 apud Gállego M. Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis. *Rev Sci Tech.* 23(2):661-76,

- Roura X, Sanchez L, Ferrer L 1999. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Veterinary Record* .(144) 262–264.
- Santa Rosa ICA, Oliveira CSO 1997. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clínica Veterinária* 2(11): 24-28.
- Schalling HDFH, Oskam L 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health* 7(8):641-651.
- Shaw J 2003. Visceral leishmaniasis after renal transplantation: report of 4 cases in northeastern Brazil. *Transpl Infect Dis*. 2008 Oct;10(5):364-8
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79 (4) 511.
- Sherlock IA 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in Bahia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91:671-683.
- Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA 1988. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 82(1):66-8.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP 2003. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research* 2:251-257.
- Silva RN, Amorim AC, Brandão RM, de Andrade HM, Yokoo M, Ribeiro ML, Bartchewsky W, Socorro-Silva A, de Castro JA, do Monte SJ 2010. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. *Ann Trop Med Parasitol*. Mar;104(2):137-43.
- Singh S, Sivakumar R 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*;49(1):55-60.
- Singh S 2006. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*;123(3):311-30.

- Singh S, Sivakumar R 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med.* 49(1):55-60.
- Solano-Gallego, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* 39( 2): 560–563.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C 1996. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 3(4):387-91.
- Souza VMM; Julião FS; Neves RSC; Magalhães PB; Bisinotto TV; Lima AS; Oliveira SS; Júnior EDM 2008. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no Município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil *Epidemiol. Serv. Saúde* vol.17 n.2
- Stauber LA, Franchino E.M, Grun, J 1958. Na eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamster. *J. Protozool.* 5: 269-273.
- Sundar S, Rai M 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(5):951-8,
- Sundar S 2003. Diagnosis of kala-azar--an important stride. *J Assoc Physicians India*51:753- 5.
- Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SO, Jaffe CL, Baneth G 2010. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 12;4(1):e581.
- Tesh RB 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg;* 52:287-292.
- Tolezano JE, Taniguchi HH, Araújo MF, Cunha EA, ChioccolaVLP, Pirmez C, Shaw JJ 2005. Evidence of different *Leishmania* enzootic cycles, especially *L. (Viannia) braziliensis*, in two endemic American cutaneous leishmaniasis (ACL) regions of São

- Paulo State, Brazil. Abstract Book, Third World Congress on Leishmaniasis, 10-15 April, 2005. Palermo-Terrasini, Sicily, Italy, p. 213.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J.J., Shaw, M.A., Dye, C 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*. v. 122, n. Pt 3, p. 253-61.
- Too, HP. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, Amsterdam, v.114, p.146-154, 2003.
- van Eys GJJM, Schoone GJ, Kroon CM, Ebeling SB 1992. Sequence analysis of small subunit RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 51: 133–142.
- Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, Salotra 2010. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *Plos one* 9;5(4):e10107.
- Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S 2004. TaqMan-Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Academy of Science* 1026:139-143.
- Volpini AG, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L.(Leishmania) amazonensis* causing American Cutaneous Leishmaniasis. *Acta Tropica*, 90: 31-37.
- Wilson SM 1995. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: Fields applications and practicalities. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89( 1) 95-100.
- Wortmann G, Sweeney C, Houg HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, Ockenhouse C 2001. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 65(5):583-7.

Wortmann GW, Romero L I, Paz HM., Ortega-Barria E., Bayard V, Hochberg LP, Ryan JR 2004. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 148-151.

Xiao-Su HU, Yang WT, Lu HG, Yan HP, Cheng JP, Ma Y, Jin BQ, Zhang T 2000. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *Journal of Parasitology* 86(4): 822–826.

Yang S, Rothman R 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *The Lancet* 4: 337-348

Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P, Mignone W 1999. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). *Vet. Parasitol.* 81:11.

Zijlstra E E; Ali M S, el-Hassan A M; el-Toum I A; Satti M; Ghalib H W; Kager P A 1992. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Trop Med Hyg* 86(5):505-7

**10.0 Anexos**

## 10.1 Anexo 1

### **PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE/SECRETARIA DE SAÚDE**

Gerência Regional de Controle de Zoonoses Noroeste

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

#### **Consentimento Livre e Esclarecido**

Leia ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

**Objetivo:** a Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte (SMSA) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) estão realizando uma pesquisa com crianças residentes nas Áreas de Abrangência do Distrito Sanitário Noroeste em Belo Horizonte. O objetivo deste estudo é avaliar se as medidas empregadas no controle da doença têm conseguido reduzir a ocorrência da leishmaniose visceral. Será realizada uma avaliação da transmissão da infecção em crianças menores de cinco anos.

**Benefícios:** os resultados deste estudo irão auxiliar nas ações de prevenção e controle da doença na cidade. Os resultados dos exames de sangue serão entregues em sua casa. Se houver alguma criança com resultado positivo, a mesma será encaminhada para avaliação e acompanhamento médico no Ambulatório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou.

**Confidencialidade:** toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e a identificação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade será mantida como informação sigilosa. A amostra de sangue de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade será guardada apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

**Direito à recusa:** a participação é totalmente voluntária e você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade poderão se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal para ambos.

**Contato com os pesquisadores:**

Dra. Mariângela Carneiro  
Avenida Antonio Carlos 6627-  
Campus UFMG  
Departamento de Parasitologia/ICB  
Bloco E4 - Sala 254  
31-34092839

Dra. Maria Helena Franco Morais  
Rua Peçanha, 114, 4<sup>o</sup> andar  
Regional Noroeste  
Gerência de Controle de Zoonoses  
31-32777648/ 32778543

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde, Av. Afonso Pena 2336, 9<sup>o</sup> andar, telefone 3277 53 09.

### **Termo de consentimento Livre e Esclarecido**

Seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, cujo nome é \_\_\_\_\_ está convidado(a) para participar, voluntariamente, do Projeto “Avaliação da adequação e efetividade das estratégias do Programa de controle da leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.”

Ao concordar com a participação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade você permitirá que:

1. seja realizada uma entrevista confidencial com perguntas sobre as características pessoais de seu filho; sexo, idade, escolaridade; condição socioeconômica da família; características da residência incluindo todos os anexos, construções e lixo no quintal; armazenamento e disposição do lixo doméstico; destino das águas servidas; presença de animais domésticos; conhecimento sobre leishmaniose canina e humana e vetores; fatores relacionados às medidas de controle da doença.

2. seja coletada de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade uma pequena quantidade de sangue por punção capilar na ponta do dedo da mão para pesquisa de anticorpos (células de defesa do corpo humano) para a Leishmaniose Visceral. Esta coleta será realizada duas vezes, com intervalo de menos de um ano entre as coletas.

Sua casa e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade foram escolhidos por sorteio, usando um método científico para obtenção de uma amostra representativa da população do Distrito Sanitário Noroeste em Belo Horizonte.

A entrevista dura em torno de 20 minutos e a coleta de sangue cerca de 3 minutos. A coleta de sangue será feita por técnicos especialmente treinados e será utilizado material esterilizado e descartável, ou seja, material que só é usado uma única vez.

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com Maria Helena Franco Moraes, nos telefones 3277-7648 e 3277-4583, 9907- 4653 no horário de 8 às 12 horas e de 14 às 18 horas de segunda à sexta-feira. Você também pode e



## Anexo 2 - Questionário

## ENTREVISTA INDIVIDUAL

VARIÁVEIS	CODIFICAÇÃO
ENTREVISTADOR: 1. IDCOLETOR: ____ NOME COLETOR: _____	1. IDCOL:
2. IDNUM: _____	2. IDNUM:
<b>DADOS SOBRE A CRIANÇA</b>	
3. Nome da criança:	
4. Data de nascimento: __/__/__	4. CRDTNAS ____/____/____
5. Idade: ____ anos ____ meses ( <b>anotar anos ou meses se menor de um ano</b> )	5. CRIDADE <input type="checkbox"/>
6. Sexo: 1. <input type="checkbox"/> masculino 2. <input type="checkbox"/> feminino	6. CRSEXO <input type="checkbox"/>
7. Nome do principal responsável:	
8. Relação com a criança 1. <input type="checkbox"/> Mãe 2. <input type="checkbox"/> Pai 3. <input type="checkbox"/> Tio(a). 4. <input type="checkbox"/> Avó (ô) 5. <input type="checkbox"/> Irmã(ão) 6. <input type="checkbox"/> Outro _____	8. CRRESREL <input type="checkbox"/>
9. Principal responsável estudou até que série: ( <b>lembrar de saber quantos anos de estudo</b> ) 1. <input type="checkbox"/> Nunca frequentou escola 2. <input type="checkbox"/> Fundamental incompleto 3. <input type="checkbox"/> Fundamental completo 4. <input type="checkbox"/> Médio incompleto 5. <input type="checkbox"/> Médio completo 6. <input type="checkbox"/> 3 <sup>o</sup> Grau incompleto 7. <input type="checkbox"/> 3 <sup>o</sup> Grau Completo	9. RESGRINS <input type="checkbox"/>
10. Profissão/Ocupação do principal responsável: _____	10. RESPROF: <input type="checkbox"/>
11. Renda familiar total: 1. <input type="checkbox"/> Menor que 1 salário 2. <input type="checkbox"/> 1 salário (1 salário = R\$ 465,00) 3. <input type="checkbox"/> Entre 1 a 2 salários 4. <input type="checkbox"/> De 2 a 3 salários 5. <input type="checkbox"/> De 3 a 5 salários 6. <input type="checkbox"/> Acima de 5 salários 9. <input type="checkbox"/> } 0. <input type="checkbox"/> Não sabe	11. RENDA <input type="checkbox"/>
12. Rua: _____ N <sup>o</sup> _____ Complemento: _____ Bairro: _____ Telefone(s): _____	12.
13. A criança morou em outro local? 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 9. <input type="checkbox"/> Não Se sim, em qual bairro _____	13. CROUTLOC <input type="checkbox"/>

		IDNUM: _____
14. A criança frequenta escola ou creche ou escolinha? 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não		14. CRESCOL <input type="checkbox"/>
<b>DADOS SOBRE LV E RESERVATÓRIOS</b>		
15. Você já ouviu falar da leishmaniose (calazar)? 1. <input type="checkbox"/> Sim, pelo agente da PBH 2. <input type="checkbox"/> Não ( <i>se esta for a alternativa, pular para a pergunta nº 21</i> ) 3. <input type="checkbox"/> Sim, por diferentes meios _____ 4. <input type="checkbox"/> Sim, pelo agente da PBH e outros meios		15. LVCONHC <input type="checkbox"/>
16. Você sabe como é transmitida? 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não ( <i>se não, pular para a pergunta nº 18</i> )      8. <input type="checkbox"/> NA		16. LVTRANS <input type="checkbox"/>
17. É transmitida por: ( <i>não ler as alternativas, aguardar resposta espontânea</i> )		17. LVTTTRANS
17.1. Rato	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	17.1. <input type="checkbox"/>
17.2. Mosquito	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	17.2. <input type="checkbox"/>
17.3. Mordida de cachorro	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	17.3. <input type="checkbox"/>
17.4. Água parada	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	17.4. <input type="checkbox"/>
17.5. Água de chuva	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	17.5. <input type="checkbox"/>
17.6. Cachorro	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	17.6. <input type="checkbox"/>
17.7. Outros _____	17.7. _____	
18. Quais animais tem esta doença? ( <i>não ler as alternativas, aguardar resposta espontânea</i> )		18. LVANIM
1. Rato	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	18.1. <input type="checkbox"/>
2. Gato	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	18.2. <input type="checkbox"/>
3. Galinha	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	18.3. <input type="checkbox"/>
4. Cachorro	1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	18.4. <input type="checkbox"/>
5. Outros _____	18.5. _____	
19. Você faz alguma coisa para prevenir a ocorrência de leishmaniose? 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não ( <i>se não, pular para a pergunta nº 21</i> )      8. <input type="checkbox"/> NA		19. LVPREV <input type="checkbox"/>
20. Se sim, o que você faz para prevenir? ( <i>não ler as alternativas, aguardar resposta espontânea</i> )		20. LVPREVQ
1. não tenho cães	20.1- 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	20.1. <input type="checkbox"/>
2. tenho cães e faço exames nele(s)	20.2 - 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	20.2. <input type="checkbox"/>
3. uso coleira com inseticida no cão	20.3- 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	20.3. <input type="checkbox"/>
4. evito criar outros animais em casa	20.4 - 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	20.4. <input type="checkbox"/>
5. uso inseticida no ambiente	20.5 - 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	20.5. <input type="checkbox"/>
6. limpo meu quintal	20.6 - 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	20.6. <input type="checkbox"/>
7. uso mosquiteiro nas camas	20.7 - 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	20.7. <input type="checkbox"/>
8. não deixo água parada	20.8 - 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA	20.8. <input type="checkbox"/>
9. Outros _____	20.9. _____	

		IDNUM: _____
21. Atualmente, na sua casa tem cachorro? 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não (se esta for a escolha, pular para a pergunta n <sup>o</sup> 24) 9. <input type="checkbox"/> NR		21. CAO <input type="checkbox"/>
22. Se sim, quantos? <input type="checkbox"/> 8. <input type="checkbox"/>		22. CAON <input type="checkbox"/>
23. Há quanto tempo adquiriu o primeiro cachorro? (Há quanto tempo o cão mais antigo na casa está com eles, em anos ou meses) <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> meses 8. <input type="checkbox"/>		23.2. CAOTE <input type="checkbox"/>
24. Algum cachorro da sua casa teve leishmaniose? 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não 3. <input type="checkbox"/> para exame, mas ainda não sabe o resultado 4. <input type="checkbox"/> nunca teve cachorro (se esta for a alternativa, pular para pergunta n <sup>o</sup> 31) 9. <input type="checkbox"/> NR 0. <input type="checkbox"/> NS		24. CAOCLV <input type="checkbox"/>
25. Já foi realizado exame para leishmaniose em algum dos seus cachorros? 1. <input type="checkbox"/> sim, pela PBH      2. <input type="checkbox"/> não fez exame 3. <input type="checkbox"/> exame de outro laboratório      4. <input type="checkbox"/> Exame pela PBH e particular 8. <input type="checkbox"/> não      9. <input type="checkbox"/> não sabe      0. <input type="checkbox"/>		25. CAOEXAM <input type="checkbox"/>
26. Teve algum cachorro com leishmaniose sacrificado? (Se não, pular para a pergunta 29) 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> não sabe      9. <input type="checkbox"/> não sabe      0. <input type="checkbox"/>		26. CAOLVEU <input type="checkbox"/>
27. Você adquiriu outro cachorro? 1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não (se esta for a resposta, pular para a pergunta n <sup>o</sup> 29) 8. <input type="checkbox"/> não      9. <input type="checkbox"/> não sabe      0. <input type="checkbox"/>		27. CAOOUT <input type="checkbox"/>
28. Se sim, isso ocorreu quanto tempo depois? 1. <input type="checkbox"/> nos de 1 ano depois      2. <input type="checkbox"/> meses de 1 ano depois 8. <input type="checkbox"/> não      9. <input type="checkbox"/> não sabe      0. <input type="checkbox"/>		28. CAOOUTT <input type="checkbox"/>
29. Teve algum cão positivo não sacrificado? 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não (se esta for a resposta, pular para a pergunta n <sup>o</sup> 31) 8. <input type="checkbox"/> não sabe      9. <input type="checkbox"/> não sabe		29. CAOLVNEU <input type="checkbox"/>
30. O que vocês fizeram com esse cachorro? 1. permaneceu na casa      1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA 2. entrou em tratamento      1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA 3. foi solto ou transferido para outro local      1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA 4. morreu antes de ser sacrificado      1. <input type="checkbox"/> sim      2. <input type="checkbox"/> não      8. <input type="checkbox"/> NA 5. outro      30.5 _____		30. CAOLVDES 30.1 <input type="checkbox"/> 30.2 <input type="checkbox"/> 30.3 <input type="checkbox"/> 30.4 <input type="checkbox"/>

		IDNUM: _____
<b>DADOS SOBRE O DOMICÍLIO</b>		
31. Número de cômodos: <input type="checkbox"/>		31. IMNC <input type="checkbox"/>
32. Número de quartos: <input type="checkbox"/>		32. IMNQ <input type="checkbox"/>
33. Número de pessoas que residem no imóvel: <input type="checkbox"/>		33. IMNP <input type="checkbox"/>
34. Número de banheiros: 1. <input type="checkbox"/> Um banheiro dentro de casa 2. <input type="checkbox"/> Mais de um banheiro dentro de casa 3. <input type="checkbox"/> Banheiro(s) dentro e fora de casa 4. <input type="checkbox"/> Banheiro somente fora de casa 5. <input type="checkbox"/> Sem banheiro		34. IMNB <input type="checkbox"/>
35. Abastecimento de água: 1. Rede geral com água na torneira dentro de casa 2. Rede geral sem água na torneira dentro de casa 3. Poço, cisterna ou nascente com água dentro de casa 4. Poço, cisterna ou nascente sem água dentro de casa 5. Outro _____	1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não	35. IMH20 35.1 <input type="checkbox"/> 35.2 <input type="checkbox"/> 35.3 <input type="checkbox"/> 35.4 <input type="checkbox"/> 35.5 _____
36. Esgotamento sanitário: 1. Rede pública coletora de esgoto 2. Fossa séptica (padronizada com suspiro, fechada) 3. Fossa rudimentar (buraco no chão) 4. Córrego ou fundo de vale 5. Outro _____	1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não	36. IMESG 36.1 <input type="checkbox"/> 36.2 <input type="checkbox"/> 36.3 <input type="checkbox"/> 36.4 <input type="checkbox"/> 36.5 _____
37. Destino do lixo 1. Coleta regular em dias alternados 2. Coleta regular 2 dias da semana 3. Coleta regular semanal 4. Coleta regular mensal 5. Jogar em lotes, córrego 6. Queimar 7. Outros _____	1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 0. <input type="checkbox"/> NS 9. <input type="checkbox"/> NR 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 0. <input type="checkbox"/> NS 9. <input type="checkbox"/> NR 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 0. <input type="checkbox"/> NS 9. <input type="checkbox"/> NR 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 0. <input type="checkbox"/> NS 9. <input type="checkbox"/> NR 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 0. <input type="checkbox"/> NS 9. <input type="checkbox"/> NR 1. <input type="checkbox"/> sim 2. <input type="checkbox"/> não 0. <input type="checkbox"/> NS 9. <input type="checkbox"/> NR	37. IMLIXO 37.1 <input type="checkbox"/> 37.2 <input type="checkbox"/> 37.3 <input type="checkbox"/> 37.4 <input type="checkbox"/> 37.5 <input type="checkbox"/> 37.6 <input type="checkbox"/> 37.7 _____

OUTRAS INFORMAÇÕES (OBSERVAÇÕES DO ENTREVISTADOR)		
38. Tipo do imóvel:		38. IMTP
1. Telhado com laje	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	38.1 <input type="checkbox"/>
2. Telhado com forro	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	38.2 <input type="checkbox"/>
3. Só telhado sem laje ou forro	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	38.3 <input type="checkbox"/>
4. Reboco	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	38.4 <input type="checkbox"/>
5. Sem reboco	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	38.5 <input type="checkbox"/>
6. Janela que fecham (com vidros e fechadas)	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	38.6 <input type="checkbox"/>
7. Janelas que não têm vidros ou não fecham	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	38.7 <input type="checkbox"/>
8. Apartamento	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	38.8 <input type="checkbox"/>
39. No peridomicílio tem:		39. IMPERIAM
1. Quintal com árvores frutíferas	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	39.1 <input type="checkbox"/>
2. Quintal com árvores não frutíferas	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	39.2 <input type="checkbox"/>
3. Área com chão de terra	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	39.3 <input type="checkbox"/>
4. Bananeiras	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	39.4 <input type="checkbox"/>
5. Horta	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	39.5 <input type="checkbox"/>
6. Umidade	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	39.6 <input type="checkbox"/>
7. Lixo não acondicionado	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não	39.7 <input type="checkbox"/>
8. Material orgânico em decomposição no solo	1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> Não	39.8 <input type="checkbox"/>
9. outros _____	39.9 _____	
40. No peridomicílio tem outros animais?		40. IMOUTAN
1. <input type="checkbox"/> sim    2. <input type="checkbox"/> não ( <i>se não, pular para a pergunta nº 42</i> )		<input type="checkbox"/>
41. Quais outros animais:		41. IMOUTANQ
1. ( ) Galinhas    Nº aproximado _____	8. <input type="checkbox"/> NA	41.1 <input type="checkbox"/>
2. ( ) Porcos    Nº aproximado _____	8. <input type="checkbox"/> NA	41.2 <input type="checkbox"/>
3. ( ) Pássaros    Nº aproximado _____	8. <input type="checkbox"/> NA	41.3 <input type="checkbox"/>
4. ( ) Patos    Nº aproximado _____	8. <input type="checkbox"/> NA	41.4 <input type="checkbox"/>
5. ( ) Cavalos    Nº aproximado _____	8. <input type="checkbox"/> NA	41.5 <input type="checkbox"/>
6. ( ) Gatos    Nº aproximado _____		41.6 <input type="checkbox"/>
7. ( ) Outros: _____		41.7 _____
42. O responsável recusou-se a participar da pesquisa:		42. RESRECM
1. Não permitiu a coleta da amostra    Motivo: _____		<input type="checkbox"/>
2. Não permitiu a coleta e não respondeu ao questionário    Motivo: _____		
8. <input type="checkbox"/> NA    _____		
43. Entrevistador _____ Data: ____/____/____		43. _____
		____/____/____