



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**Avaliação do Grau de Exposição de Seres Humanos
da Sub-Região da Cova da Beira ao Agente
Zoonótico *Leishmania infantum***

Sónia Daniela Carneiro Moreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor Miguel Castelo Branco
Co-orientador: Prof. Hugo Brancal

Covilhã, maio de 2016

Dedicatória

Aos meus pais,

Por terem acreditado sempre em mim

E lutado para que o meu sonho se tornasse realidade.

A eles, por eles...

Tudo...

Sempre.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Castelo Branco, e ao meu co-orientador, Professor Hugo Brancal, por toda a disponibilidade, apoio e preciosas orientações.

Ao Laboratório de Parasitologia (responsável: Prof. Doutora Ana Patrícia Lopes) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e à Unidade de Parasitologia Médica (responsável: Prof. Doutora Lenea Campino) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical pela execução da análise das amostras.

Ao Prof. Doutor Luís Cardoso, pela exímia revisão do trabalho.

À Dra. Rita Faísca, pelo valioso auxílio na interpretação dos dados obtidos e por todo o tempo dispensado.

Ao técnico de análises Luís Taborda, do serviço de Patologia Clínica do CHCB, pela incansável ajuda na recolha das amostras para este estudo.

À Dra. Marisa Santos Silva, do serviço de Gestão da Qualidade do CHCB, pela colaboração na componente estatística.

Aos meus pais, por todo o apoio incondicional.

À minha segunda família da Covilhã, pela amizade inestimável e paciência constante ao longo destes 6 anos.

À C'a Tuna Aos Saltos, por me permitir crescer como ser humano de uma forma que nenhum curso é capaz de o fazer.

Resumo

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do género *Leishmania*. Aproximadamente 20 espécies apresentam carácter zoonótico, sendo a transmissão efetuada sobretudo pela picada de insetos flebotomíneos hematófagos, que funcionam como vetores. A bacia do Mediterrâneo é endémica para a espécie *L.infantum*, responsável por uma das formas mais graves da doença: a leishmaniose visceral. O cão é o principal hospedeiro comprovado. Apesar de endémica no nosso país, é ainda bastante negligenciada e subnotificada. Devido aos escassos dados epidemiológicos relativos a Portugal, mais concretamente à sub-região da Cova da Beira, este estudo tem como principal objetivo avaliar o grau de exposição da população desta região ao agente zoonótico *L.infantum*.

Foi feito o aproveitamento de amostras de sangue e de soro de 229 participantes voluntários no Centro Hospitalar Cova da Beira, para posterior realização do teste de reação em cadeia de polimerase e teste de aglutinação direta, respetivamente. Para cada par de amostras foi também recolhida informação anónima respeitante ao sexo do dador, idade, local de residência e também à posse e/ou contacto com cães e gatos. Os resultados obtidos em ambos os testes foram negativos, não tendo sido detetado nenhum caso de infeção ativa ou sinal de contacto prévio com o parasita.

A melhoria das condições de habitação, saneamento, higiene, alimentação e saúde poderão ter um importante papel na capacidade dos hospedeiros em combater a infeção eficazmente. Por outro lado, a melhoria do tratamento e controlo dos doentes com HIV (grupo de maior suscetibilidade para a doença) pode estar também associada a uma queda na incidência da infeção neste grupo, tal como já se vem a verificar noutros países europeus. Por último, o maior controlo da infeção nos animais domésticos por parte da comunidade veterinária poderá estar a influenciar positivamente o bloqueio da dispersão desta endemia. Em suma, apesar de não ser possível extrapolar conclusões com base nesta amostra, este estudo não corrobora a hipótese de que a sub-região da Cova da Beira seja endémica para a *L.infantum*.

Palavras-chave

Leishmania infantum; leishmaniose visceral; Cova da Beira; Grau de exposição; Fatores de Risco.

Abstract

Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Approximately 20 of these species are zoonotic, transmission occurring mainly by hematophagous sandflies insect bite, which function as vector. The Mediterranean basin is endemic to *L.infantum* species, responsible for one of the most severe forms of the disease: visceral leishmaniasis. The dog is the main proven host. Although endemic in our country, human leishmaniasis is still somewhat neglected and underreported. There are few epidemiological data about human population of Portugal, specifically the Cova da Beira region. So, this study aims to evaluate the exposure degree to zoonotic agent *L.infantum* in the population of this region.

Samples of blood and serum of 229 volunteers were collected, at Centro Hospitalar Cova da Beira, for later execution of polymerase chain reaction test and direct agglutination test, respectively. For each pair of samples was also collected anonymous information concerning the sex, age, place of residence of the donor and the possession and/or contact with dogs and cats. The results obtained in both tests were negative and was not detected any case of active infection or any sign of previous contact with *L.infantum*.

The improvement of housing conditions, sanitation, hygiene, nutrition and health state may play an important role in the ability of human hosts to effectively fight the infection. Furthermore, the improved treatment and monitoring of patients with HIV infection (group with an increased susceptibility to the development of visceral leishmaniasis) may also be associated with a decrease in the incidence of infection in this group, as already happened previously in other European countries. Finally, a greater control of the infection in domestic animals by the veterinary community may have positively influenced the blocking of this endemic dispersion. In short, although no conclusions can be extrapolated based on this sample, this study suggests the hypothesis that *L.infantum* infection is not endemic in the human population of Cova da Beira region.

Keywords

Leishmania infantum; Visceral leishmaniose; Cova da Beira; Exposure degree; Risk Factors.

Índice

| | |
|--|------|
| Dedicatória..... | ii |
| Agradecimentos | iii |
| Resumo | iv |
| Palavras-chave | iv |
| Abstract..... | v |
| Keywords | v |
| Índice | vi |
| Lista de Figuras..... | vii |
| Lista de Tabelas..... | viii |
| Lista de Abreviaturas..... | ix |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Objetivos | 4 |
| 2 Materiais e métodos..... | 5 |
| 2.1 Desenho do estudo | 5 |
| 2.2 Grupo de estudo e contextualização geográfica..... | 5 |
| 2.3 Metodologia do estudo..... | 6 |
| 2.4 Considerações éticas | 7 |
| 2.5 Análise estatística | 8 |
| 3 Resultados | 9 |
| 3.1 Estatística descritiva | 9 |
| 3.2 PCR e DAT..... | 12 |
| 4 Discussão | 13 |
| 4.1 Limitações do estudo..... | 13 |
| 4.2 Análise dos resultados | 13 |
| 5 Conclusões | 17 |
| 6 Referências bibliográficas..... | 18 |
| 7 Anexos | 21 |
| Anexo 1 | 21 |
| Anexo 2 | 23 |
| Anexo 3 | 24 |

Lista de Figuras

Figura 1 - Histograma: distribuição da amostra por idades.

Figura 2 - Mediana das idades e variabilidade etária.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição da amostra por género.

Tabela 2 - Distribuição da amostra por conselho de residência

Tabela 3 - Distribuição da amostra por residência em meio rural ou urbano

Tabela 4 - Distribuição da amostra relativamente à posse de cães em casa ou no quintal

Tabela 5 - Distribuição da amostra relativamente à posse de gatos em casa ou no quintal.

Tabela 6 - Distribuição da amostra relativamente ao contacto com cães e/ou gatos.

Lista de Abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| CHCB | Centro Hospitalar Cova da Beira |
| DALY's | Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (“Disability Adjusted Life Year”) |
| DAT | Teste de aglutinação direta (“Direct Agglutination Test”) |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético (“ethylenediamine tetraacetic acid”) |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana (“human immunodeficiency vírus”) |
| IHMT | Instituto de Higiene e Medicina Tropical |
| kDNA | DNA do cinetoplasto |
| LC | Leishmaniose cutânea |
| LV | Leishmaniose visceral |
| NUTs | Unidades territoriais para fins estatísticos |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction”) |
| PKDL | Leishmaniose dérmica pós-kala-azar |
| SPSS | Statistical Package for Social Sciences |
| UTAD | Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro |

Introdução

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do género *Leishmania*, com cerca de 30 espécies identificadas (1,2). Aproximadamente 20 destas espécies apresentam carácter zoonótico, sendo a transmissão de *Leishmania*, tanto ao homem como aos animais, efetuada sobretudo pela picada de insetos flebotomíneos hematófagos, que funcionam como vetores (3-5).

Os parasitas *Leishmania* estão amplamente dispersos por todo o mundo, havendo predomínio de determinadas espécies em territórios geograficamente distintos e, conseqüentemente, de formas clínicas diferentes (3).

A doença pode ter diversas formas de apresentação, variando a sua gravidade com a virulência da espécie infetante bem como as características da população hospedeira afetada. As formas clínicas conhecidas são (3):

- Leishmaniose visceral (LV) ou “kala-azar”;
- Leishmaniose cutânea (LC);
- Leishmaniose cutânea difusa;
- Leishmaniose mucocutânea;
- Leishmaniose dérmica pós-kala-azar (PKDL).

Considerada uma das doenças mundiais mais negligenciadas e subnotificadas, a leishmaniose é endémica em 98 países/territórios, havendo mais de 350 milhões de pessoas em risco de contrair esta patologia (4,6,7). A incidência anual estimada é de aproximadamente 2 milhões de novos casos (1,5 milhões de casos de LC e 0,5 milhões de LV) (5,6,8).

Estima-se que a LV cause mais de 50.000 mortes anualmente, um valor que, dentro das doenças infecciosas, apenas é ultrapassado pela malária (6). A LV é ainda responsável por aproximadamente 2,4 milhões de DALY's (Disability-Adjusted Life Year - Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade), colocando-a assim em 9º lugar na avaliação global de doenças infecciosas (6).

No Velho Mundo (i.e. África, Ásia e Europa), a espécie *Leishmania infantum* é endémica na Bacia do Mediterrâneo, ocorrendo principalmente em zonas rurais, aldeias de regiões montanhosas e também em áreas periurbanas (6,9,10). As casas e os locais circundantes formam os microfocos onde o contacto inseto-vertebrado ocorre e onde se dá a infeção. É frequente a presença de animais domésticos na população destas regiões

(principalmente cães) que atraem insetos flebotomíneos (flebotomos, género *Phlebotomus*) para as casas, favorecendo a transmissão aos humanos (6,11).

O cão é o principal reservatório de *L.infantum* (6,8,12,13). O risco de um cão contrair a infeção é bastante variável, dependendo da localização geográfica em que vive. Em Portugal o risco médio é de aproximadamente 6% (24). Nos últimos anos, os valores de seroprevalência para *L.infantum* em cães no sul da Europa demonstraram que cerca de 2,5 milhões dos animais se encontravam infetados (8,14). No entanto, vários estudos epidemiológicos feitos em áreas onde a infeção canina é endémica mostraram que mais de 50% dos animais infetados estavam aparentemente saudáveis (15,24,26), embora com anticorpos anti-*Leishmania*, sendo portanto, potencialmente infetantes para o vetor e, conseqüentemente, um importante fator na manutenção da endemia (8,11,12,16). Em Portugal, o número de casos de infeção canina por *Leishmania* tem vindo a aumentar, com uma prevalência que pode atingir cerca de 20% em localidades de áreas de endemicidade (8,17). Existem evidências crescentes de que os gatos domésticos também podem estar infetados e envolvidos na manutenção da infeção por *L.infantum* (5,8,12,18,19). Também têm sido descritas, embora em menor proporção, infeções noutros animais tais como cavalos (12), ratos e raposas (5,13,18,24,25).

Tal como as outras espécies do género *Leishmania*, *L.infantum* apresenta duas formas no seu ciclo biológico (3,24,25,26): a promastigota (forma extracelular flagelada, no interior do trato digestivo do vetor - hospedeiro não vertebrado) e a amastigota (intracelular, não flagelada, no interior dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados). O flebotomo, ao picar um hospedeiro infetado (por exemplo o cão) ingere sangue cujos macrófagos contêm as formas amastigotas de *Leishmania* (24). Uma vez no intestino do vetor, o parasita sofre um processo de diferenciação para a forma promastigota, com uma duração aproximada de 7 dias até adquirir capacidade infetante. Assim, quando o inseto realiza outra ingestão de sangue, os parasitas passam para o sangue do novo hospedeiro (por exemplo, o ser humano) completando-se o ciclo. Ambas as formas multiplicam-se por divisão binária (3).

No Velho Mundo a transmissão é feita por insetos do género *Phlebotomus*, enquanto no Novo Mundo os vetores são flebotomíneos do género *Lutzomyia* (6,12,18,19). Na Europa ocidental, nomeadamente em Portugal, as espécies *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi* são os vetores mais importantes de *L.infantum* (8,17). São insetos de pequeno tamanho e ataque silencioso, predominantemente vespertinos e noturnos, que habitam zonas de clima temperado e quente (20,23). Supõe-se que na Península Ibérica possam viver aproximadamente 1 mês (24). O vetor tem quatro fases de desenvolvimento (23,24): ovo (7-10 dias), larva (dura, pelo menos, 3 semanas), pupa (aproximadamente 10 dias) e adulto. Os insetos do sexo masculino alimentam-se de néctar das plantas. No entanto, as fêmeas, para conseguirem pôr os ovos, necessitam de se alimentar de sangue de animais vertebrados (21). Deste modo, o parasita é transmitido apenas pelas fêmeas de flebotomos (20).

A LV, causada por parasitas do complexo *Leishmania donovani*, é a forma clínica mais grave desta patologia (20) e, quando não tratada, é fatal em 85-90% dos casos (4,7). Estas infeções são na maioria das vezes assintomáticas nos seres humanos (6,19). As populações das áreas endémicas são as mais afetadas e a doença tende a ser relativamente crónica. No entanto, também os indivíduos que viajam para estes locais estão em risco acrescido de contrair a infeção e manifestar um quadro mais agudo (1). Inicialmente, as crianças constituíam o grupo mais atingido (maior incidência entre 1-4 anos) (6,8). No entanto tem-se assistido a uma inversão da tendência, sendo atualmente os adultos imunodeprimidos (por má-nutrição e com fatores de imunossupressão) o grupo mais suscetível (1,19). Com o crescimento do número de infeções por HIV (co-infeção parece ter uma ação sinérgica (3,23)) e da expansão dos tratamentos imunossupressores para transplantes e quimioterapia, metade dos casos europeus ocorrem agora em adultos (6,8). Após a implementação da terapêutica antirretroviral HAART verificou-se um declínio do número de casos de co-infeção HIV-*Leishmania* (2,8,19). No entanto, tal não se verificou em Portugal (2,8). O período de incubação em seres humanos pode variar entre 10 dias a 1 ano, sendo que o início da doença é normalmente gradual. Os sintomas são inespecíficos, podendo ser confundida com outras doenças infecciosas (4,23). Geralmente o primeiro sintoma é febre baixa recorrente e intermitente (3). A manifestação com maior importância destacada na LV é a esplenomegalia. Normalmente ocorre em maior grau do que a hepatomegalia (mais marcada nos estádios mais avançados) e acompanhada de desconforto no hipocôndrio esquerdo e palidez das mucosas. Outros sintomas frequentes são mal-estar geral, tremores, calafrios, perda ponderal e anorexia (6). Nalguns casos, linfadenopatias podem estar presentes e pode ser mesmo o único sinal clínico (3). Há uma diminuição do tempo de vida dos leucócitos e eritrócitos e diminuição da taxa de produção celular, causando pancitopenia (19). O comprometimento hepático leva a disproteinemia severa, com hipoalbuminemia, que à medida que a doença progride pode associar-se a má-nutrição e alterações vasculares com consequentes edemas dos membros inferiores bem como alterações da pele e do cabelo. Mais tarde pode ocorrer diminuição da produção de protrombina que, associada a trombocitopenia, pode resultar em hemorragias graves das mucosas (6). Nos rins, podem ocorrer quadros de glomerulonefrite proliferativa e de nefrite intersticial devido à presença de imunocomplexos circulantes. A diarreia pode surgir como resultado da parasitação intestinal e ulceração bem como de enterite secundária (6). Nos estádios mais avançados, devido à grande depressão do sistema imunitário, é frequente a existência de co-infeções, principalmente pneumonia, tuberculose e disenteria, sendo estas causas comuns de morte (3,6).

Do grupo de doenças parasitárias, a leishmaniose é teoricamente considerada como a de mais provável controlo por vacinação, pois a sua cura está associada ao desenvolvimento de uma forte resistência a reinfeções. No entanto, devido à complexidade antigénica e à variabilidade dos organismos, ainda não se conseguiu desenvolver vacinas eficazes para a leishmaniose humana (3,4,12,13) e a terapêutica é cara, lenta e associada a inúmeros efeitos

secundários (3,6,22). Uma forma de prevenção da doença nos humanos é o controlo do vetor e hospedeiros (4,5,13). A infeção nos cães deve ser monitorizada e tratada (6,19) e devem ser tomadas medidas que impeçam a disseminação do vetor (12,20). As alterações climáticas a que se tem assistido nos últimos anos, principalmente o aumento da temperatura com invernos menos rigorosos, podem estar associadas a um aumento da atividade flebotómica, com conseqüente aumento da transmissão da infeção bem como dispersão para locais anteriormente não endémicos (8,19,23).

Em Portugal, onde *L.infantum* é endémica, a LV é a forma clínica relativamente mais frequente, mas existem também alguns casos reportados de LC (8,17). Em 1950, esta infeção foi incluída nas de declaração obrigatória. No entanto, a partir de 1999 apenas a LV tem que ser reportada. Atualmente o seu diagnóstico é ainda bastante negligenciado e subnotificado, havendo ainda poucos dados referentes ao nosso país (8,17). Estima-se que por cada doente sintomático existam cerca de 10-100 assintomáticos (8). Constitui assim um importante problema de Saúde Pública que carece de uma avaliação epidemiológica mais aprofundada sobre o seu impacto social bem como de uma melhoria da resposta por parte dos Serviços de Saúde.

1.1 Objetivos

A presente dissertação tem como objetivo geral avaliar o grau de exposição da população da sub-região da Cova da Beira ao agente zoonótico *L.infantum*.

Objetivos específicos:

- Caracterizar demograficamente a prevalência da LV na sub-região da Cova da Beira.
- Determinar se existe algum foco de infeção.
- Avaliar se existe predomínio da infeção em meios rurais ou urbanos.
- Perceber se existe mais suscetibilidade para a infeção para determinado sexo ou faixa etária.
- Confirmar a relação com a posse e/ou contacto com cães e/ou gatos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Desenho do estudo

O presente trabalho é um estudo descritivo e transversal numa amostra de conveniência.

Procedeu-se, durante setembro e outubro de 2015, à realização de questionários e recolha de amostras de sangue e soro dos participantes, sendo estes selecionados de forma aleatória aquando da sua ida ao Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira.

Com este estudo pretendem-se testar as seguintes hipóteses:

- A Beira Interior é uma região endémica para a *L.infantum*?
- Existe maior prevalência de quadros de infeção nalguma freguesia estudada?
- Infeção por *L.infantum* afeta mais as crianças do que indivíduos em idade adulta?
- Infeção por *L.infantum* é mais frequente no meio rural do que no meio urbano?
- Há correlação entre infeção por *L.infantum* e posse e/ou contacto com animais domésticos (cães /gatos)?

2.2 Grupo de estudo e contextualização geográfica

O estudo foi realizado no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira, EPE, sedado na cidade da Covilhã. Durante 2015, o número de pessoas alvo de análises laboratoriais neste serviço foi 35884.

Este estudo tem por base uma amostra de conveniência de 229 indivíduos (134 do sexo feminino e 95 do sexo masculino) com idades compreendidas entre os 9 e os 94 anos, residentes na Cova da Beira.

A Cova da Beira é uma sub-região portuguesa que compreende quatro concelhos: Belmonte, Covilhã, Fundão e Castelo Branco (do qual se incluem apenas as freguesias de São Vicente da Beira e Lourçal do Campo). De acordo com os Censos de 2011, tem uma população total de 87 869 habitantes.

Usou-se como critério de inclusão indivíduos residentes na sub-região da Cova da Beira.

Definiu-se como critério de exclusão o conhecimento de infeção ou de contacto prévio do participante com o agente em estudo.

A participação foi voluntária, mediante a assinatura de um consentimento livre e informado (Anexo 1) e todas as informações obtidas são confidenciais.

2.3 Metodologia do estudo

Na fase inicial deste estudo foi realizado um questionário (Anexo 2) a 252 indivíduos que se dirigiram ao Serviço de Patologia Clínica do CHCB, escolhidos de forma aleatória. No entanto, após análise dos questionários, verificou-se que 23 não eram residentes na Cova da Beira, sendo posteriormente excluídos do estudo por não cumprirem o critério de inclusão. A amostra final deste estudo é constituída por 229 indivíduos, residentes na Cova da Beira e sem conhecimento de infeção ou contacto prévio com o parasita *L.infantum*.

Este breve questionário tinha como objetivo obter dados relevantes para o estudo, tais como: sexo, idade, Conselho de residência e Freguesia (para aferir se vive em meio rural ou urbano), posse de cães e/ou gatos e contacto com estes animais. Definiu-se como meio rural todas as freguesias, exceto as de Covilhã (Conceição, Santa Maria, São Martinho e S.pedro) e Castelo Branco (de acordo com a Nomenclatura das Unidades Territoriais para fins Estatísticos - NUTS, do Decreto-Lei n.º 46/89).

Devido à inexistência de uma técnica gold standard para a deteção de infeções assintomáticas, este estudo usou dois métodos de diagnóstico não invasivos diferentes: DAT - teste de aglutinação direta (diagnóstico serológico) e PCR - reação em cadeia da polimerase (diagnóstico parasitológico).

Para tal, foi feita a colheita de sangue periférico, por venopunção esterilizada, e separadas duas amostras: (A) uma de 2 mililitros de sangue em EDTA para realização da PCR; (B) outra de 500 microlitros de soro, obtido por centrifugação, para realização do DAT.

As amostras de soro dos 229 participantes foram posteriormente enviadas para o Laboratório de Parasitologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. O DAT é um teste semi-quantitativo, no qual o soro dos indivíduos é diluído e misturado com partículas antigénicas das formas promastigotas inativadas. Durante a infeção por *L.infantum*, há produção de anticorpos contra os antígenos de superfície do parasita invasor. O DAT deteta

os anticorpos contra o complexo *L. donovani* no soro dos indivíduos infectados, por aglutinação direta. Na ausência de anticorpos contra o parasita, o antígeno usado no DAT acumula-se na parte inferior da placa de modo a formar uma mancha azul escura. Se os anticorpos para *Leishmania* estiverem presentes, então o antígeno forma uma película azul clara, constituindo um resultado positivo. Neste estudo, foram usadas diluições de 1:100 a 1:400. O cut-off (limiar de positividade) escolhido foi de 1:1,600, não tendo sido necessário testar as amostras para fenómenos de zona. Este teste possui uma sensibilidade de 97% (índice de confiança de 95%: 91.6% - 99%) e especificidade de 100%.

As amostras de sangue foram enviadas, conservadas e avaliadas pela Unidade de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Por limitações de recursos financeiros apenas foi possível fazer PCR de 95 amostras. Para tal foram selecionados os indivíduos de faixa etária mais avançada, devido à maior frequência de estados de sub-nutrição e/ou patologias concomitantes, com conseqüente comprometimento do sistema imunitário, e portanto teoricamente com uma maior probabilidade de encontrar quadros de infecção neste grupo mais suscetível. Na PCR é feita a síntese “in vitro” do DNA do parasita, levando a um aumento exponencial da quantidade de sequências específicas a partir de um único DNA alvo. Esta técnica requer infraestrutura laboratorial adequada, com posse de pipetas, capelas de fluxo laminar e termociclador. Para a sua execução, é fundamental a presença de condições de desnaturação da fita molde, ligação dos iniciadores (moléculas de DNA complementares às regiões flanqueadas da sequência a ser amplificada) e extensão (através de uma DNA polimerase e desoxinucleotídeos trifosfatos), em ciclos alternados promovidos pela variação de temperatura na presença de componentes da reação. Uma das etapas cruciais do processo é a seleção dos genes alvo da PCR. Um dos alvos de amplificação do DNA mais usados é o DNA do cinetoplasto (kDNA) (pois existe uma região conservada do kDNA, homóloga entre as espécies de *Leishmania*). Este é considerado um dos testes mais sensíveis para a deteção de infecções de *Leishmania*, com particular importância nos casos assintomáticos.

2.4 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Conselho de Administração do CHCB a 24 de julho de 2015 (anexo 3), pelo que respeita todos os princípios éticos do consentimento informado, assinado por todos os participantes.

Não se relatam conflitos de interesses.

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software Statistical Package for Social Sciences® (SPSS - versão 21.0 para Windows) e no Microsoft Excel 2010®, sendo utilizada análise descritiva.

3 Resultados

3.1 Estatística descritiva

Tal como referido anteriormente, a amostra deste estudo compreende 229 indivíduos, 134 do sexo feminino (58,5%) e 95 do sexo masculino (48,5%). A idade média da amostra é de 55,97 anos e o desvio padrão de 18,82 anos.

Estes e outros dados são apresentados com mais pormenor nas Figuras 1 e 2 e Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Figura 1. Histograma: Distribuição por idades.

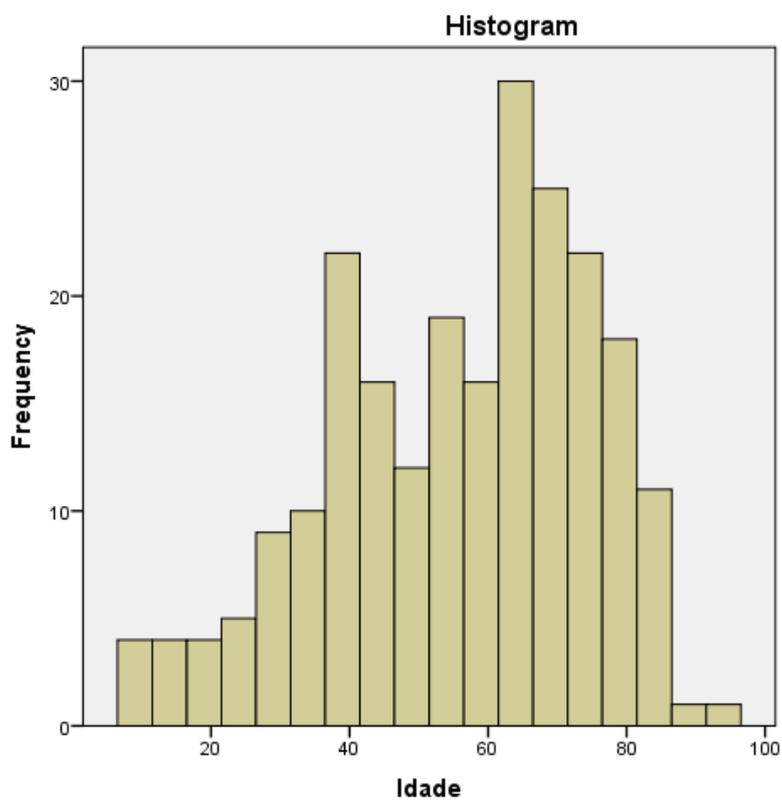
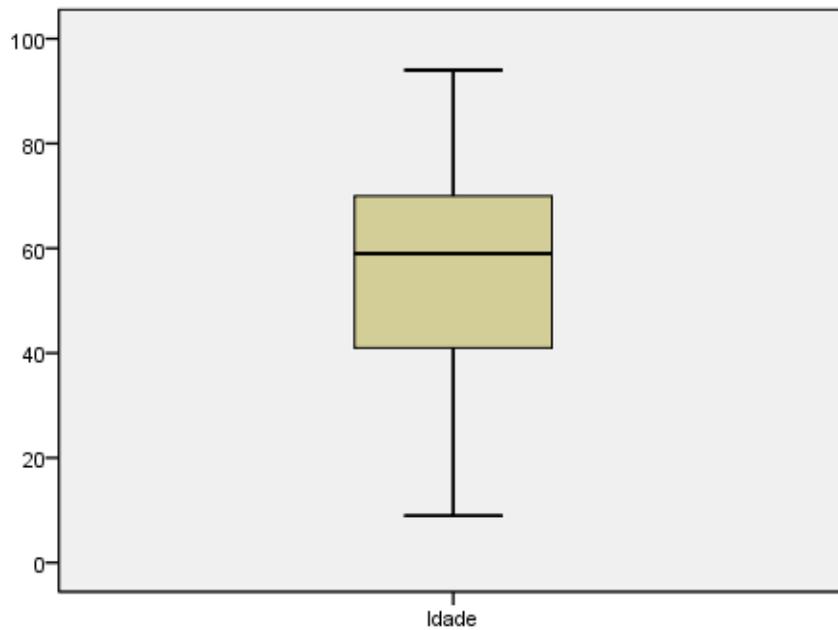


Figura 2. Mediana das idades e variabilidade.



Nestas duas figuras verifica-se um predomínio de indivíduos com idades mais avançadas (superiores a 50 anos).

Tabela 1. Distribuição da amostra por género.

| GÉNERO | Frequência | Percentagem |
|--------------|------------|-------------|
| Feminino | 134 | 58.5 |
| Masculino | 95 | 41.5 |
| Total | 229 | 100 |

Tabela 2. Distribuição da amostra por concelho de residência.

| CONCELHO | Frequência | Percentagem |
|--------------|------------|-------------|
| Belmonte | 22 | 9,6 |
| Covilhã | 182 | 79,5 |
| Fundão | 25 | 10,9 |
| Total | 229 | 100 |

Tabela 3. Distribuição da amostra por residência em meio rural ou urbano.

| MEIO | Frequência | Percentagem |
|---------------|-------------------|--------------------|
| Rural | 148 | 64,6 |
| Urbano | 81 | 35,4 |
| Total | 229 | 100 |

Tabela 4. Distribuição da amostra relativamente à posse de cães em casa ou no quintal.

| CÃES | Frequência | Percentagem |
|----------------|-------------------|--------------------|
| Tem | 81 | 35,4 |
| Não tem | 148 | 64,6 |
| Total | 229 | 100 |

Tabela 5. Distribuição da amostra relativamente à posse de gatos em casa ou no quintal.

| GATOS | Frequência | Percentagem |
|----------------|-------------------|--------------------|
| Tem | 68 | 29.7 |
| Não tem | 161 | 70.3 |
| Total | 229 | 100 |

Tabela 6. Distribuição da amostra relativamente ao contacto com cães e/ou gatos.

| CONTACTO | Frequência | Percentagem |
|-----------------|-------------------|--------------------|
| Tem | 146 | 63.8 |
| Não tem | 83 | 36.2 |
| Total | 229 | 100 |

Como se pode verificar pela análise das tabelas apresentadas, a grande maioria dos participantes é residente no concelho da Covilhã (79,5%) e verifica-se também um predomínio claro de habitantes no meio rural (64,6%). Quando questionados acerca da posse de cães ou gatos constataram-se respostas positivas em 35,4% e 29,7% dos casos, respetivamente. No entanto, um total de 63,8% dos participantes afirma ter contacto regular com estes animais.

3.2 PCR e DAT

Todos os resultados obtidos pelas técnicas DAT e PCR foram negativos, não tendo sido detetado nenhum caso de infeção assintomática ou sinal de contacto prévio com o parasita em estudo.

Por este motivo, não é possível fazer qualquer estatística indutiva dos resultados.

Assim, as hipóteses propostas não foram confirmadas com este estudo.

4 Discussão

4.1 Limitações do estudo

A inexistência de um método “gold standard” para o diagnóstico de infeções assintomáticas por *L.infantum* é um dos motivos que dificulta a obtenção de dados epidemiológicos no nosso país e, portanto, limitou também este estudo.

As informações que constataam um crescimento da infeção canina em regiões endémicas de Portugal associadas à escassez de dados epidemiológicos sobre a prevalência da infeção humana dificultaram o dimensionamento da amostra, assumindo assim este estudo apenas um carácter exploratório baseado numa avaliação serológica de conveniência.

Os reduzidos recursos financeiros constituíram também um importante fator limitante. Para que a amostra fosse considerada estatisticamente significativa com um intervalo de confiança de 90%, esta teria de ser composta por, no mínimo, 269 participantes. No entanto, não foi possível obter este valor devido às limitações económicas na análise por DAT e PCR, sendo que nesta última foi apenas analisado um total de 95 amostras. Deste modo, os resultados obtidos não podem ser extrapolados para a população da Cova da Beira e todas as conclusões aqui apresentadas são referentes apenas à amostra em estudo.

Tal como foi referido, um dos grupos anteriormente reportados como tendo maior suscetibilidade para a infeção por *L.infantum* eram as crianças pequenas, com idades inferiores a 4 anos. A amostra analisada compreende indivíduos entre os 9 e os 94 anos, não incluindo portanto esse grupo de risco. Esta é outra das limitações do estudo, estando este dependente da população que se dirigia ao Serviço de Patologia Clínica do CHCB e portanto às faixas etárias desses utentes.

Por último, o facto de ser um estudo transversal baseado numa amostra estatisticamente reduzida e sem acompanhamento durante um intervalo de tempo significativo torna difícil a deteção de casos positivos para a infeção em estudo.

4.2 Análise dos resultados

A inexistência de dados referentes à seroprevalência da infeção humana por *L.infantum* na sub-região da Cova da Beira associada a informações recentes que apontam para um crescimento global desta endemia, motivaram a realização deste estudo exploratório.

Segundo o “Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis” de março de 2010, tem-se verificado um aumento da dispersão mundial da *Leishmania*, não só nas áreas endémicas como também para outras anteriormente não endémicas, com um crescimento da atividade flebotomínica.

Tal como foi referido, Portugal, situado na Bacia do Mediterrâneo, é uma região endémica para *L.infantum*. Apesar de apresentar uma média de apenas 15-20 casos de LV diagnosticados anualmente em indivíduos imunocompetentes, estima-se que por cada infeção sintomática existam 10-100 assintomáticas. Apesar da existência de poucos dados referentes à prevalência da *L.infantum* e LV no nosso país, foram anteriormente identificadas três áreas endémicas para o parasita (Lenea CAMPINO et al, Epidemiologia das leishmanioses em Portugal, Acta Med Port. 2010; 23(5):859-864): Região Metropolitana de Lisboa, Região do Alto Douro e Região do Algarve. No entanto, relativamente à Cova da Beira são escassas as informações sobre infeções humanas.

A Cova da Beira é uma região montanhosa, constituída maioritariamente por áreas rurais, onde existe um grande número de animais que atraem os flebótomos. Também as temperaturas que se verificam entre os meses de março e setembro, com médias superiores a 18°C, potenciam a atividade do vetor. Tem portanto diversas características favoráveis à sua disseminação.

No entanto, avaliando retrospectivamente os casos de leishmaniose humana detetados pelo CHCB, durante o período de 2005-2015 foram reportados apenas 20 casos de LV e nenhum de LC foi detetado. Assumindo uma incidência média de 2 casos por ano e sabendo que por cada caso assintomático estima-se que haja entre 10-100 assintomáticos, então, para a população de 87869 habitantes da sub-região da Cova da Beira existirão, em média, entre 20 a 200 infeções não diagnosticadas anualmente. Este valor corresponde a aproximadamente 0,23% da população, considerando o limiar superior. Assim, tendo em conta o número reduzido de casos diagnosticados na última década no CHCB e também os anualmente detetados em todo o território do país, bem como o desconhecimento sobre a seroprevalência da seropositividade, a probabilidade de deteção de algum caso de infeção ativa era, à partida, desconhecida, pelo que se justifica a realização deste estudo.

Existe uma grande heterogeneidade no grupo estudado, compreendendo indivíduos de praticamente todas as faixas etárias, habitando tanto zonas rurais (maioritariamente) como urbanas, grande parte destes relatando a posse e/ou contacto com cães (principal hospedeiro do parasita). Assim, abrangeu uma grande diversidade de variáveis importantes para discriminar potenciais fatores de risco.

No entanto não foram detetadas quaisquer diferenças, sendo todos os resultados negativos para a infeção por *L.infantum*, refutando as hipóteses inicialmente colocadas.

Surpreendentemente, segundo vários estudos, a seroprevalência de infecção canina por *L.infantum* tem vindo a aumentar em Portugal, podendo atingir 20% dos cães em determinadas áreas, bem como a atividade do vetor. Assim, com a dispersão do flebótomo e expansão dos reservatórios comprovada, seria de esperar um aumento do número de casos de infecção humana, mesmo que assintomáticas. No entanto, tal não é corroborado com este estudo.

Este estudo baseou-se em dois métodos diagnósticos distintos: PCR e DAT. Por limitações financeiras, apenas foi possível estudar 95 amostras por PCR. Para as PCR foram escolhidos os utentes de faixas etárias mais avançadas devido à maior frequência de estados de comprometimento do sistema imunitário e portanto associarem-se, em teoria, a uma maior suscetibilidade e probabilidade de infecção. A PCR é um método com grande sensibilidade para a *Leishmania*, sendo muito útil na deteção de infeções assintomáticas. Surpreendentemente, todos os resultados foram negativos, não sendo identificado DNA do parasita em nenhum dos 95 indivíduos estudados por esta técnica. Os testes serológicos corroboraram estes resultados, sendo também todos eles negativos. A avaliação serológica está associada a bons resultados na deteção de LV, no entanto, por vezes as infeções assintomáticas caracterizam-se por baixa resposta da imunidade humoral, o que pode levar a que os níveis de anticorpos sejam demasiado baixos para que esta técnica os consiga detetar, com consequentes falsos negativos. Com as diluições utilizadas neste estudo, geralmente não é necessário testar as amostras para fenómenos de zona. Ainda assim, apesar de altamente improvável, pode-se colocar a hipótese de que existam alguns casos de infecção dentro da amostra estudada que não tenham sido detetados pelo DAT, principalmente dentro do grupo de 134 indivíduos em que não foi feita a análise por PCR.

Partindo do pressuposto de que não existe nenhum caso de infecção ativa assintomática na amostra, não deixa de ser interessante o facto de todas as serologias serem negativas, o que também nos indica que estes indivíduos nunca terão contactado com o parasita. Em regiões endémicas, como é o caso de Portugal, é grande a exposição e a probabilidade de contacto com o parasita. Apesar dos indivíduos imunocompetentes serem mesmo capazes de resolver a infecção sem se tornar clinicamente evidente, o seu sistema imunitário desenvolve anticorpos que são detetáveis durante toda a vida. Seria assim de esperar resultados positivos nas serologias, que poderiam não significar necessariamente uma infecção ativa mas apenas um contacto prévio.

Este estudo serológico de conveniência veio assim revelar que a prevalência absoluta de seropositivos para *L.infantum* é inferior ao número de testes negativos obtidos sobre a população estimada da Cova da Beira, ou seja, colocando em proporção, esta será inferior a 0,43%.

Existem alguns fatores que podem estar na base destes resultados negativos para a prevalência da infecção. A melhoria da qualidade de vida durante as últimas décadas, com melhores condições de habitação, alimentação mais equilibrada e completa e o fácil acesso aos serviços de saúde podem associar-se a uma melhoria do sistema imunitário da população em geral e, conseqüentemente, a uma maior resistência às infecções do parasita em questão, podendo esta ser uma das justificações para os resultados obtidos.

Por outro lado, um dos principais grupos de risco apontados atualmente são os doentes com HIV, cuja infecção com a *L.infantum* parece ter uma ação sinérgica. Sabe-se que a região da Cova da Beira tem também uma prevalência significativa para a infecção por HIV. Segundo dados do CHCB, a fevereiro de 2016 eram seguidos neste hospital 122 doentes. No entanto, por motivos de confidencialidade, não foi possível saber quantos deste grupo são residentes da Cova da Beira. Na Europa, durante a década de 90, assistiu-se a um crescimento do número de casos de LV neste grupo, assumindo quadros devastadores. Após a implementação da terapêutica HAART houve um declínio da incidência, bem como das recidivas. No entanto, segundo dados de 2010 da Unidade de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, tal não se verificou em Portugal. Assim, também o controlo da infecção do HIV com a terapêutica HAART pode neste momento estar a ser benéfica para os doentes HIV positivos em Portugal e, à semelhança do que se verificou nos restantes países Europeus, estarmos agora a assistir a alterações dos padrões epidemiológicos da LV neste grupo.

Por último, de ressaltar o grande esforço da comunidade veterinária no controlo da doença nos animais, com o desenvolvimento de planos de prevenção, rastreio e tratamento precoce da infecção. Estas medidas, ao evitarem a disseminação da doença no principal hospedeiro do parasita, contrariam a sua propagação através do vetor e conseqüente infecção humana.

Apesar de não ser possível extrapolar resultados para a região da Cova da Beira com base na amostra deste estudo de conveniência, estes não apoiam um possível crescimento da prevalência por *L.infantum* nos seres humanos desta região, ao contrário do que as informações iniciais fariam prever. A escassez de dados referentes à seropositividade para *L.infantum* justifica a pertinência deste estudo exploratório, sendo que os resultados obtidos vêm realçar a necessidade de estudos futuros mais aprofundados, com ampliação das amostras.

5 Conclusões

Dados recentes demonstram um aumento da prevalência de Leishmaniose canina bem como da atividade do vetor e, portanto, um aumento expectável do número de casos de infeção humana. Sendo Portugal uma área endémica para o parasita e, no caso da Cova da Beira, reunir todas as condições ideais para a disseminação do mesmo, era de esperar um aumento do número de casos de infeção humana e, portanto, a sua deteção neste estudo exploratório. No entanto, surpreendentemente, tal não se verificou nos 229 indivíduos analisados deste estudo, o que aponta para uma prevalência estimada inferior ao número de testes negativos sobre a população em estudo, ou seja, em proporção será provavelmente inferior a 0,43%.

São várias as hipóteses apontadas para justificar estes dados: por um lado, o controlo da infeção do HIV com a terapêutica HAART pode neste momento estar a ser benéfica para os doentes HIV positivos e, à semelhança do que se verificou nos restantes países Europeus, estarmos agora a assistir a um declínio da co-infeção HIV - *L.infantum*. Por outro, a melhoria da qualidade de vida da população a que se tem assistido nas últimas décadas pode estar a contribuir para uma diminuição do número de casos de imunossupressão e, consequentemente, para uma maior capacidade de combater eficazmente a infeção. Também o controlo da disseminação da endemia nos animais, por parte dos veterinários, poderá estar a ter um papel eficaz no controlo da propagação da infeção.

Apesar de não ser possível extrapolar resultados para a região da Cova da Beira com base na amostra deste estudo de conveniência, estes não apoiam um possível crescimento da prevalência por *L.infantum* nos seres humanos desta região. Os resultados obtidos vêm assim reforçar a necessidade da realização de mais estudos futuros nesta população.

6 Referências Bibliográficas

1. Eehalt U, Schunk M, Jensenius M, Van Genderen PJJ, Gkrania-Klotsas E, Chappuis F, et al. Leishmaniasis acquired by travellers to endemic regions in Europe: A EuroTravNet multi-centre study. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2014;12(2):167-72.
2. Ravel C, Cortes S, Pralong F, Morio F, Dedet JP, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*. 2006;36(13):1383-8.
3. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 2000;30(12-13):1269-81.
4. Stockdale L, Newton R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013;7(6):e2278. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002278>
5. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* [Internet]. 2009;136(14):1915. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182009991156
6. WHO Expert Committee. Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 22-26 March 2010 [Internet]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf
7. Maia C, Nunes M, Marques M, Henriques S, Rolão N, Campino L. Experimental Parasitology In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. *Experimental Parasitology*. 2013;36-41.
8. Campino L, Maia C. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*. 2010;23(5):859-64.
9. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Island, Spain) by different diagnostic methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;98:102-10.
10. Campino L, Cortes S, Pires R, Oskam L, Abranches P. Detection of *Leishmania* in

immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(5):396-8.

11. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* [Internet]. 2007;149(3-4):139-46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401707003597>
12. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology* [Internet]. 2011;181(1):23-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570192>
13. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 2004;57(04):1-88.
14. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* [Internet]. 2008;24(7):324-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514028>
15. Paradies P, Capelli G, Cafarchia C, Caprariis D, Sasanelli M, Otranto D. Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy. *J Vet Med B 53, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 2006;53(6):295-8.
16. Bourdoiseau G, Denerolle P. Traitement de la leishmaniose canine : actualités. *Revue de Médecine Vétérinaire (Toulouse)* [Internet]. 2000;151(5):395-400. Available from: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Traitement+de+la+leishmaniose+canine+:+actualit?s+*+?#0
17. Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux J-A., Santos-Gomes G, Alves-Pires C, et al. Leishmaniasis in Portugal: Enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*. 2006;11(11):1708-14.
18. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology* [Internet]. 2012;28(12):531-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>
19. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and

approaches to disease control. *Int J Parasitol* [Internet]. 2005;35(11-12):1169-80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751905002420>

20. Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, et al. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2010;236(11):1192-8.
21. Roze M. Canine Leishmaniasis : an update. 1999;23(2):4-19.
22. Gradoni L, Soteriadou K, Louzir H, Dakkak A, Toz SO, Jaffe C, et al. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Tropical Medicine and International Health*. 2008;13(10):1272-6.
23. Gallego LS. LEISHMANIOSIS, Una revisión actualizada. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica S.L.; 2013.
24. López XR, Corrales GM, Rodríguez AS, Estrada-Pena A, Cardoso L, et al. Leishmaniose Canina Y Felina En Españã Y Portugal. Merial Laboratorios S.A.; 2015.
25. Corrales GM, Gallego LS. Enfermedades Vectoriais del Perro Y del Gato. Madrid: Acalanthis; 2011.
26. Gutiérrez MM, Gutiérrez JA, Símon MT, Gómez AD, Bernal GD, Prieto AG, Duato EG, Corrales GM, Fernández IS. *Immunology And Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica S.L.; 2013.

7 Anexos

Anexo 1

Consentimento Livre e Informado.

Sónia Daniela Carneiro Moreira, aluna do curso de Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde da UBI a realizar um trabalho de investigação subordinado ao tema “Avaliação do grau de exposição do ser humano ao agente zoonótico *Leishmania infantum*”, vem solicitar a sua colaboração neste estudo. Informo que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo CHCB, EPE; informo ainda que a sua privacidade será respeitada, todos os dados recolhidos serão confidenciais e não serão fornecidas quaisquer compensações.

Objetivo do trabalho de investigação:

Avaliar o grau de exposição de seres humanos ao parasita em causa, através da deteção de anticorpos séricos específicos anti-*Leishmania* e de DNA de *Leishmania* em amostras de sangue.

Critérios de inclusão: Qualquer doente que se dirija ao Laboratório do CHCB, residente na sub-região da Cova da Beira

Critérios de exclusão: Que sejam portadores conhecidos do agente em estudo

Procedimentos necessários: resposta a um breve questionário

Risco / Benefício da sua participação: Não existe qualquer tipo de risco nem benefício

Duração da participação no estudo: 3 meses

Nº aproximado de participantes: 200

Consentimento Informado - Aluno / Investigador

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

* Entregou esta informação;

* Explicou o propósito deste trabalho;

*Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo participante ou representante legal.

Nome do Aluno / Investigador (Legível)

Assinatura do Aluno / Investigador

___/___/___
Data

Consentimento Informado - Participante

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- * O Sr. (a) leu e compreendeu todas as informações desta declaração e teve tempo para as ponderar;
- * Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente;
- * Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao aluno/investigador uma explicação, tendo este esclarecido todas as dúvidas;
- * O Sr. (a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Participante (Legível)

Representante Legal

(Assinatura do Participante ou Representante
Legal)

___ / ___ / ___
Data

Anexo 2

Questionário Anónimo.

QUESTIONÁRIO ANÓNIMO

| |
|---|
| 1. Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino † <input type="checkbox"/> Feminino † |
| 2. Data de nascimento: _____ (DD/MM/AA) |
| 3. Localidade de residência: _____ |
| 4. Meio Rural ou urbano? _____ |
| 5. Freguesia: _____ |
| 6. Tem cães em casa ou no quintal? <input type="checkbox"/> Sim † <input type="checkbox"/> Não † |
| 7. Tem gatos em casa ou no quintal? <input type="checkbox"/> Sim † <input type="checkbox"/> Não † |
| 8. Convive habitualmente com estes animais? <input type="checkbox"/> Sim † <input type="checkbox"/> Não † |

Obrigado pela sua colaboração.

AMOSTRAS

| |
|---|
| Número de série da amostra de sangue (apenas para efeitos deste estudo): _____ |
| Amostra de soro † <input type="checkbox"/> Amostra de sangue em EDTA † <input type="checkbox"/> |
| Data da recolha das amostras: _____ (DD/MM/AA) |

