

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Elaine Veloso Rocha Urias

Avaliação da eficácia do uso de filtros de leucócitos para retenção de

*L. (L.) infantum chagasi*

Montes Claros

2016

Elaine Veloso Rocha Urias

Avaliação da eficácia do uso de filtros de leucócitos para retenção de *L. (L.) infantum chagasi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho

Montes Claros

2016

U76a           Urias, Elaine Veloso Rocha.  
                Avaliação da eficácia do uso de filtros de leucócitos para retenção de *L. (L.) infantum chagasi* [manuscrito] / Elaine Veloso Rocha Urias. – 2016.  
                66 f. : il.

                Inclui bibliografia.

                Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes,

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde /PPGCS, 2016.

                Orientador: Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho.

                1. Filtros de leucócitos. 2. Transfusão. 3. Leishmaniose visceral. I. Carvalho, Sílvio Fernando Guimarães de. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS - UNIMONTES

Reitor: João dos Reis Canela

Vice-reitor: Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Virgílio Gomes Mesquita

Coordenadora de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres Lafetá de Almeida

Coordenadora de Iniciação Científica: Afrânio Faria de Melo Júnior

Coordenadora de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Hercílio Martelli Júnior

Coordenador de Pós-graduação Lato-sensu: Maria de Fátima Rocha Maia

Coordenador de Pós-graduação Stricto sensu: Maria de Fátima Rocha Maia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Marise Fagundes Silveira

Coordenador adjunto: Luiz Fernando Rezende



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



CANDIDATO: ELAINE VELOSO ROCHA URIAS

TÍTULO DO TRABALHO: "Avaliação da eficácia do uso de filtros de leucócitos para retenção de L.(L.) infantum chagasi".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças.

BANCA (TITULARES)

PROF. DR. SILVIO FERNANDO GUIMARÃES DE CARVALHO ORIENTADOR/PRESIDENTE


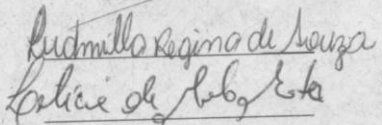
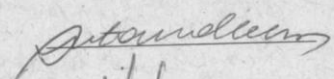
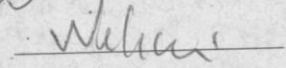
PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. LUDMILA REGINA DE SOUZA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. LETÍCIA DE MELO MOTA

PROF. DR. ANTÔNIO PRATES CALDEIRA

PROF. DR. JOÃO FELÍCIO RODRIGUES NETO

ASSINATURAS

BANCA (SUPLENTES)

PROF. DR. AGOSTINHO GONÇALVES VIANA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ROSEANE DURÃES CALDEIRA

ASSINATURAS

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

APROVADO(A)

[ ] REPROVADO(A)

Dedico este trabalho a meus pais, Vicente e Walquíria, pelo apoio, amor incondicional e incansável. Aos meus irmãos, por sonharem os meus sonhos e pelo caloroso incentivo.

Dedico a Ronaldo e aos meus filhos, Caroline, Ronaldinho e Clara, que me ensinam cada dia mais a beleza de ter uma família e a grandeza de amar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, conhecedor da minha mente e coração, que luta comigo e não desiste, apesar de saber das minhas fraquezas.

Ao professor Dr. Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho, pelo exemplo de ética e simplicidade, por compartilhar sua experiência e estimular a concretização deste trabalho.

Ao Dr. Agostinho Gonçalves Viana e à professora Dra. Walderez Ornelas Dutra, pelo interesse e colaboração que possibilitaram a realização dos testes na UFMG.

Aos colegas Leandro de Freitas Teles, Tânia de Cássia Moreira Soares e Jamille Fernandes Lula, pela presteza e dedicação singulares, que nos permitiram concluir esta etapa.

Ao Dr. Hélio Moraes, por desafiar e incentivar a busca do conhecimento.

À Universidade Estadual de Montes Claros, na pessoa dos professores Dr. João Felício Rodrigues Neto e Antônio Prates Caldeira, pelo dinamismo em prol do desenvolvimento de pesquisas na instituição.

A todos os colegas e professores do doutorado, pelo convívio enriquecedor e aprendizado compartilhado.

Às funcionárias do PPGCS, Kátia e Do Carmo, pela organização e apoio que dedicam aos alunos e ao programa.

À direção e demais colegas da Fundação Hemominas, pela cooperação e contínuo incentivo. Agradecimento especial a Flávia Givisiez e Nataly Silva, pela inestimável contribuição.

A Raquel Veloso de Mendonça, pela dedicação e apoio cruciais para a conclusão deste trabalho.

A toda grande família e família Urias Mendonça, por semearem amor e compreensão na minha vida. Meu especial agradecimento a meu esposo e filhos que, diariamente, me apoiam e fortalecem para seguir lutando e vencendo etapas.

Agradecimento a FAPEMIG pelas bolsas BIP 00135/13 e 00188/14 concedidas ao orientador Dr. Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho.

*“A sabedoria é um tesouro inesgotável para a humanidade; com ela pode-se ter pensamentos dignos dos dons que recebemos. Deus é o guia da sabedoria e também quem corrige os sábios. Em suas mãos estamos nós e nossas palavras, assim como a habilidade, o conhecimento de tudo que existe, a estrutura do mundo, o começo, meio e fim dos tempos, as mudanças das estações, a natureza dos animais, a fúria das feras, a força dos espíritos e os pensamentos dos homens, a variedade das plantas e propriedades das raízes. Está em tudo o que é oculto e em tudo o que se vê. A verdadeira sabedoria está no cumprimento dos projetos de Deus”.*

*Sabedoria 7, 14-22*



## RESUMO

Filtros de leucócitos têm sido indicados em hemoterapia para prevenir reações febris não hemolíticas, aloimunização a antígenos leucocitários humanos, doença do enxerto-versus-hospedeiro, refratariedade plaquetária, efeitos imunomoduladores e para evitar transmissão de citomegalovírus (CMV). A capacidade de retenção de outros vírus, bactérias e parasitos tem sido descrita. Este estudo teve o objetivo de verificar a eficácia de filtros de leucócitos para retenção de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Vinte alíquotas de sangue total, derivadas de bolsas de sangue com volume insuficiente para uso transfusional, foram utilizadas na pesquisa, após liberação sorológica pelos testes de triagem do banco de sangue. A infecção do sangue foi realizada na proporção aproximada de 5 parasitos/monócitos. A presença de parasitos no sangue infectado e mantido em meio de cultura Schneider por 14 dias foi confirmada por métodos diretos de cultura e análise de esfregaços corados com May Grunwald - Giemsa, em amostras coletadas antes e após a filtração do sangue através de filtros Bio R 01 plus da marca Fresenius. A análise estatística foi feita no SPSS para Windows versão 19.0; realizados testes T, considerado nível de significância menor que 0,05 e verificada concordância entre observadores, através do Kappa. A contagem média de promastigotas na cultura antes da filtração foi de 70.500 parasitos/mL e após filtração reduziu para 19.500, demonstrando redução estatisticamente significativa ( $p=0,002$ ). Na análise dos esfregaços, raros parasitos foram identificados após filtração e houve 80% de concordância entre os observadores. O estudo demonstrou a capacidade de filtros de leucócitos para reter *Leishmanias*.

**Palavras-chave:** Filtros de leucócitos. Transfusão. Leishmaniose visceral.

## ABSTRACT

Leukocyte filters have been indicated in hemotherapy to prevent non-hemolytic febrile reactions, alloimmunization to human leukocyte antigens, chronic graft-versus-host disease, platelet refractoriness, immunomodulatory effects and to prevent transmission of cytomegalovirus (CMV ). The retention capacity has been described for other viruses, bacteria and parasites. This study aimed to verify the effectiveness of leukocyte filters for retention of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Twenty aliquots of whole blood derived from blood bags with insufficient volume for transfusion use were used in the research, after serologic release by blood bank screening tests. The blood infection was performed at a ratio of 5 parasites / monocytes. The presence of parasites in the infected blood and maintained in Schneider medium culture for 14 days was confirmed by direct culture methods and analysis smears stained with May Grunwald - Giemsa on samples collected before and after blood filtration with filter Bio R01 plus Fresenius mark. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows version 19.0; performed T tests, considered a significance level lower than 0.05 and checked inter observer agreement by Kappa. The average score of promastigotes in culture before filtration was 70,500 parasites / mL and after filtration was reduced to 19,500, a statistically significant reduction ( $p = 0.002$ ). In the analysis of smears, rare parasites were identified after filtration and there was 80% agreement among observers. The study found leukocyte filters benefit for leishmania retention.

Keywords: Leukocyte filters. Transfusion. Visceral leishmaniasis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Filtro de Leucócitos _____	23
Tabela 1- História da Filtração de Sangue _____	25
Tabela 2 - Implantação da deleucotização universal _____	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
RIFI	Imunofluorescência Indireta
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
CMV	Citomegalovírus
RBC	Concentrado de Hemácias
IPA	Índice Parasitário Anual
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
HTLV	Vírus Linfotrópico de células T Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
HLA	Antígeno de Histocompatibilidade Humana
RFNH	Reação Febril não Hemolítica
GVHD	Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
RN	Recém-nascido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
TRALI	Injúria pulmonar aguda relacionada à transfusão

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Leishmaniose Visceral .....	15
2.2 Leishmaniose Visceral e Transfusão de Sangue .....	18
2.3 Propriedades dos leucócitos no sangue .....	21
2.4 Mecanismos de remoção dos leucócitos do sangue .....	21
2.4.1 Filtros de leucócitos .....	23
3 OBJETIVOS .....	28
3.1 Objetivo Geral .....	28
3.2 Objetivos Específicos .....	28
4 PRODUTOS .....	29
4.1 Artigo 1: Leukocyte filters : a review of the mechanisms and applications in hemotherapy.....	30
4.2 Artigo 2: Evaluation of the effectiveness of the use of leukocyte filters for retaining L. (L.) infantum chagasi. ....	44
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS .....	57
ANEXOS .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é considerada a mais negligenciada dentre todas as doenças tropicais no mundo. Cerca de 90% dos casos estão concentrados no Brasil, Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul. Trata-se de doença grave, com alta taxa de letalidade e representa a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias no mundo (1).

Na década de 1990, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV no Brasil ocorriam na região nordeste (2). Com a expansão da doença, os estados do Pará e Tocantins (região norte), Mato Grosso do Sul (região centro oeste), Minas Gerais e São Paulo (região sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas do país. Nos últimos anos, a letalidade da LV no Brasil apresentou aumento gradativo, passando de 3,6% no ano de 1994 para 5,5% em 2005. Em 2013, foram notificados 3.253 casos e, destes, cerca de 10% evoluíram para o óbito. O estado de Minas Gerais registrou 282 casos de LV neste mesmo ano (3, 4).

Nas áreas endêmicas, aproximadamente uma em cada dezoito pessoas infectadas desenvolve a doença clássica (2). Entretanto, a maioria apresenta doença subclínica, que pode permanecer oligossintomática ou completamente assintomática (5, 6).

Infecção por leishmania em indivíduos assintomáticos tem sido estudada em vários países. Na França, foi verificada a ocorrência de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em hemocultura proveniente de doadores assintomáticos. O risco transfusional foi considerado baixo devido ao processo de leucodepleção realizado rotineiramente naquele país (7). Na Itália, ao testar doadores de sangue, poucos casos de positividade foram detectados no ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (RIFI) e reação em cadeia de polimerase (PCR) (8, 9). Na Espanha, em 122 indivíduos, foi verificada positividade para *L. (L.) infantum chagasi*, através do ELISA (2,6%), Western Blotting (7,6%), PCR (22,1%) e hemocultura de três doadores (10). Também na Espanha foi realizada leucodepleção do sangue de treze doadores que haviam apresentado PCR positiva. Ao repetir a PCR, após o procedimento, todos se tornaram negativos para este teste (11).

No Brasil, na área endêmica de Natal/RN, foi encontrado Elisa positivo em 9% dos candidatos a doação de sangue (12). Enquanto em Montes Claros, Minas Gerais, a prevalência de imunofluorescência indireta (RIFI) positiva foi de 5,5%. Reação cruzada entre chagas e

LV está documentada na literatura, porém, neste estudo, apenas dois apresentaram sorologia positiva para Chagas (13).

Apesar de não estar estabelecido o real risco de transmissão desta infecção, em alguns trabalhos a transfusão é apontada como responsável, porém, na maior parte deles, não fica descartada a possível via clássica de transmissão vetorial (14-21). Algumas pesquisas também têm demonstrado a sobrevivência de *Leishmanias* em sangue infectado experimentalmente e mantido nas mesmas condições de armazenamento dos hemocomponentes nos bancos de sangue (21, 22). Está em andamento um estudo multicêntrico no Brasil intitulado “Avaliação do Risco de transmissão de *L.(L.)infantum chagasi* em áreas endêmicas de leishmaniose visceral” cujos centros participantes são Uberaba-MG, Montes Claros-MG, Teresina-PI, Sobral-CE, Fortaleza-CE. Este estudo pretende dimensionar o real risco transfusional.

A filtração do sangue (leucodepleção) tem sido citada, em poucos estudos, como um procedimento capaz de remover *Plasmodium falciparum* (23), reduzir o risco de transmissão de príons infectados em Doença de Creutzfeldt - Jakob (24), e reduzir *Leishmania* em produtos de sangue infectado (21). Segundo Cardo, a filtração do sangue resultou em redução significativa de formas promastigotas desse parasito em amostras infectadas (21).

Outro método para eliminar *Leishmania* estudado foi a utilização de riboflavina e luz ultravioleta, ficando demonstrada significativa redução em hemocomponentes assim tratados (25).

A utilização de filtros de leucócitos está preconizada no país para situações específicas que visam minimizar os riscos de intercorrências transfusionais, sendo indicada para prevenir reação febril não hemolítica, profilaxia de aloimunização leucocitária em pacientes a serem politransfundidos e para evitar infecção pelo citomegalovírus (CMV) (26-29).

Após a remoção de leucócitos pelos filtros, espera-se encontrar uma contagem final de leucócitos inferior a  $5 \times 10^6$ . Na fundação Hemominas, a leucodepleção tem reduzido 99,99% dos leucócitos presentes no sangue, o que resulta em contagem final inferior a  $1,0 \times 10^6$ . A filtração do sangue pode ser feita logo após a coleta (filtros de bancada) ou no momento da transfusão (filtros de beira de leito) (27).

Apesar da seleção rigorosa dos doadores, a transfusão de sangue alogênico está associada a reações adversas e algumas destas complicações são atribuídas à presença de leucócitos no sangue (30). Atualmente, são realizados nos bancos de sangue brasileiros testes sorológicos para chagas, hepatites B e C, sífilis, vírus linfotrópico de células T humano (HTLV), vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Em áreas endêmicas de malária, existe a recomendação de realizar testes para malária e medidas para prevenir CMV em situações específicas (27, 28).

Ao considerar o risco de transmissão transfusional da leishmaniose visceral descrito na literatura, a viabilidade do parasito aos métodos de obtenção e armazenamento das bolsas de sangue (22), o fato da leucodepleção universal (em todos os hemocomponentes produzidos)(31) e/ou tratamento fotoquímico (32) não serem procedimentos de rotina em nosso país, avaliar uma possível alternativa para prevenção motivou a realização deste estudo.

A capacidade de retenção de *Leishmanias* através da filtração de sangue infectado com *L. (L.) infantum chagasi* foi investigada, na perspectiva de estabelecer o benefício deste procedimento como medida preventiva da transmissão transfusional deste parasito.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral possui extensa distribuição, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas, onde também é denominada Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou Calazar Neotropical. Na América Latina, 90% dos casos ocorrem no Brasil (33).

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* que se divide em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. O primeiro inclui as principais espécies causadoras da leishmaniose visceral. A *L. (L.) infantum chagasi* é a espécie que com maior frequência causa calazar na América do Sul, onde ocorrem casos humanos da doença (34-36).

Alguns pesquisadores consideram a *L. (L.) chagasi* bastante semelhante à *L. (L.) infantum* e questionam sua classificação separada. Entretanto, foram evidenciadas diferenças entre as espécies quanto à antigenicidade e estrutura molecular. Em 2002, foi proposta a denominação de *L. (L.) infantum chagasi*, mas ainda não há acordo entre os pesquisadores (35, 36).

A leishmaniose visceral (LV) constitui um grave problema de saúde pública nas diversas regiões do Brasil. Em razão de envolver reservatórios silvestres e urbanos, o controle exige grande mobilização por parte das autoridades e da população atingida. Observa-se, nos últimos anos, uma mudança importante na distribuição epidemiológica da doença, com um reforço ao caráter urbano (2).

Dentre os fatores de risco apontados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) associados à ocorrência de novos casos, destacam-se as alterações ambientais, como migrações humanas intensas, urbanização, desmatamento, além dos fatores individuais, como HIV e desnutrição (2).

Os protozoários trypanosomatídeos do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, e se apresentam de duas formas, sendo a flagelada ou promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e a forma aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados. No Brasil, a *L. (L.) infantum chagasi*, pertencente ao complexo *Leishmania donovani*, é a espécie comumente isolada em pacientes com leishmaniose visceral (37).

A transmissão é realizada por insetos flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquiras, birigui, dentre outros. As espécies a ela relacionadas são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Os flebotomíneos possuem atividade crepuscular e noturna, ficando durante o dia em repouso em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores (37).

O ciclo biológico do flebotomíneo ocorre no ambiente terrestre e passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (forma alada). Ele se desenvolve em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica. O desenvolvimento do ovo à fase adulta ocorre em cerca de 30 dias. Estas formas abrigam-se em anexos peri domiciliares, principalmente em abrigos de animais domésticos (37).

Somente as fêmeas se alimentam de sangue, necessário para o desenvolvimento dos ovos, o que justifica o fato de sugarem uma ampla variedade de animais vertebrados. Tanto o macho quanto a fêmea tendem a não se afastar muito de seus criadouros ou locais de abrigo, podendo se deslocar até cerca de um quilômetro, com a expressiva maioria não indo além dos 250 metros. O tempo de vida médio da fêmea é estimado em 20 dias (38).

Na área urbana, o cão é o principal reservatório do parasito e sua ocorrência tem precedido os casos em humanos. A infecção canina é mais prevalente que a humana. A existência de animais silvestres funcionando como reservatórios foi demonstrada em raposas e marsupiais. Porém, até o momento, não foi possível dimensionar a importância destes na manutenção da doença nas áreas endêmicas urbanas (39, 40).

O uso de medicamentos utilizados para o tratamento de casos humanos não é autorizado para tratamento canino. A forma de controle, preconizada em Portaria Ministerial e embasada pela Legislação vigente, é a eutanásia do cão sororreagente para leishmaniose, o que, embora possa parecer uma medida drástica, deve ser orientada e esclarecida à população, tendo em vista o risco de transmissão de uma doença grave para os humanos na área, caso o cão infectado permaneça vivo (33).

Relata-se, ainda, a existência, na rede privada de assistência aos animais, de uma vacina anti-leishmaniose visceral canina, cujo fabricante afirma conferir proteção para a doença estimada em 76%. Porém, tal vacina se encontra em estudo pelo Governo Federal, e ainda não é recomendada para uso em saúde pública (33).

A transmissão para o homem ocorre através da picada dos vetores infectados pela *L.(L) infantum chagasi*. (33). As vias congênita e acidental são consideradas formas raras de transmissão de pouca importância epidemiológica (2).

O período de incubação da LV é marcado por reação inflamatória intensa, na tentativa de conter o crescimento do parasito nas células do sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço e medula óssea. No homem, o período de incubação é de 10 dias a 24 meses, com média de 2-6 meses. No cão, varia de 3 meses a vários anos, com média de 3-7 meses (2).

O amplo espectro clínico da doença, que se apresenta desde infecção assintomática até forma grave e muitas vezes fatal, reflete o balanço entre a multiplicação do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro. Nos casos em que a LV se manifesta, ocorre hepatoesplenomegalia, diminuição de células sanguíneas e imunossupressão (41).

Em relação aos indivíduos infectados, apenas uma pequena parcela desenvolve a doença. As crianças e idosos são os mais susceptíveis (2). Com o surgimento da Aids, na vigência de imunossupressão (contagem de CD4 inferior a 200), foi demonstrada evolução para quadro clínico da doença em indivíduos anteriormente assintomáticos para o Calazar (41).

São características clínicas da LV: febre de longa duração, astenia, adinamia, anemia, hepatoesplenomegalia e perda de peso. As principais complicações relacionadas são infecciosas e hemorrágicas. Apresenta alta letalidade, sobretudo em indivíduos não tratados (mais de 90% de óbito) (38) em crianças desnutridas e portadores do HIV (33, 42).

O diagnóstico específico para leishmaniose é realizado através de métodos parasitológicos, sorológicos e de biologia molecular (2). O método parasitológico é o padrão ouro, que verifica a forma amastigota do parasito, preferencialmente na medula óssea, com a pesquisa em outros locais (linfonodos e baço) reservada para casos específicos. A punção esplênica, apesar de altamente sensível (90 a 95%), deve ser evitada e, apenas excepcionalmente, se indicada, realizada em centro cirúrgico, por conferir maior risco de complicações. O isolamento em meio de cultura tem sido também utilizado(43).

A amplificação do DNA do parasita pelo método de PCR, constitui nova perspectiva no diagnóstico da LV, alcançando sensibilidade de 94%. Porém, tem sido utilizada particularmente para pesquisas científicas (2).

Os métodos imunológicos verificam a presença de anticorpos anti-leishmania, sendo os mais utilizados o RIFI e o ELISA. Alguns estudos demonstram sensibilidade pelo RIFI de 84,6 até 100% e especificidade de 81 a 82,9%, sendo considerados positivos títulos  $> 1:80$ . Para o método ELISA, a sensibilidade variou de 92 a 100% e especificidade de 77 a 78,9%. Uma das principais limitações do RIFI é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (44, 45).

Outra possibilidade em estudo pelo Ministério da Saúde é a realização de teste imunocromatográfico, conhecido como teste rápido (2). Esse teste (Kalazar detect®) utiliza a proteína recombinante (rK39) e a presença de anticorpos contra ela indica doença em atividade. A sensibilidade deste método em indivíduos com LV comprovada foi de 97% e a especificidade de 100%, em estudo realizado em Montes Claros- Minas Gerais (44).

Em 2008, outro estudo avaliou a performance do teste imunocromatográfico rápido IT - LEISH® (Diamed), que também utiliza a proteína recombinante K 39, tendo demonstrado sensibilidade de 93% e especificidade de 97%, o que confirmou sua importante contribuição para o diagnóstico da doença no Brasil (45).

Sobre o tratamento, o Ministério da Saúde (MS) preconiza o uso do Antimonial Pentavalente, como primeira escolha, ou a Anfotericina B, que é a única opção para gestantes e indicada em situações que contraindicam o uso do Antimonial Pentavalente. Os critérios indicativos de cura se baseiam em ganho de peso, melhora do estado geral, desaparecimento da febre (em geral entre o segundo e quinto dia), redução da hepatoesplenomegalia, melhora dos parâmetros hematológicos, normalização das proteínas séricas. Não sendo preconizado exame parasitológico para controle de cura (2).

A LV é uma doença de notificação compulsória que requer vigilância entomológica, de casos humanos e caninos (43).

## 2.2 - TRANSFUSÃO DE SANGUE E LEISHMANIOSE VISCERAL

O risco de infecção por parasito associado à transfusão depende dos seguintes fatores: prevalência da infecção, ocorrência de parasitemia, capacidade de sobrevivência dos parasitos armazenados no sangue e imunocompetência do receptor (23). Os testes de rotina de doadores de sangue no Brasil, em geral, não incluem testes para parasitos. Tem sido preconizado em áreas endêmicas teste para malária (28).

Em hospedeiros humanos infectados e assintomáticos, a maioria das *Leishmanias* reside dentro das células reticuloendoteliais e não circula livremente no sangue. No momento da coleta de sangue, estes organismos podem estar presentes no interior de monócitos infectados dos doadores. Após armazenamento a 4° C, permanecem dentro dos leucócitos durante algum tempo, mas podem, eventualmente, emergir como amastigotas livres (11, 46).

A sobrevivência deste parasito no processamento e armazenamento do sangue foi demonstrada experimentalmente. Estudo *in vitro* com a forma amastigota intracelular de leishmania, verificou que o parasito sobreviveu em monócitos por 30 dias a 4°C, e durante cinco dias a 24°C. Além disto, sobreviveu em monócitos por 25 dias no concentrado de hemácias mantido a 4°C, cinco dias em concentrado de plaquetas mantido a 24°C, 35 dias em hemácias congeladas com glicerol e durante 30 dias no sangue total. Pesquisa realizada com leishmania demonstrou dados de sobrevivência comparáveis. O parasito sobreviveu por 15 dias em sangue total. Estes achados reforçam a necessidade de maiores estudos sobre o risco potencial de transmissão transfusional da doença (21, 22).

Scarlata *et al.* avaliaram a prevalência da infecção por leishmania em 1449 doadores de sangue na Sicília, Itália. Avaliados pelo método RIFI anti-leishmania, foi verificada 0,75% (onze) de positividade. Ao realizar PCR dos participantes RIFI positivos, o DNA de leishmania foi detectado em quatro. Em outra região da Itália, não foi detectada qualquer amostra positiva para anticorpos anti leishmania infantum por ELISA. Esses dados confirmam que o risco de transmissão transfusional parece ser variável entre áreas endêmicas e não-endêmicas da Sicília (9).

A infecção por leishmania foi considerada altamente prevalente em doadores de sangue das Ilhas Baleares. De acordo com pesquisadores desta região, o uso de filtros de leucócitos parece remover parasitos de unidades de concentrados de hemácias eficientemente (11).

Na França, Fichoux analisou 565 doadores e detectou sorologia positiva para leishmania em setenta e seis indivíduos (7,5%); destes, nove (11%) apresentaram PCR positiva para *L. (L.) infantum chagasi* e dois tiveram cultura positiva (7).

Em 1997, estudo brasileiro realizado em Natal (RN) constatou positividade para leishmania pelo ensaio ELISA em 9% de 1194 doadores voluntários de sangue. Ao estudar pacientes politransfundidos em hemodiálise foi também demonstrada associação significativa ( $\chi^2$  8.567,

$p < 0.005$ ) entre transfusão sanguínea e sorologia positiva para leishmaniose nestes pacientes; porém, a transmissão por picada do flebotômico não foi descartada (12).

Na literatura atual, existem poucos casos publicados, cuja forma de transmissão da leishmaniose foi provavelmente a transfusão. Em regiões endêmicas, sempre se atribui ao vetor, via clássica de transmissão desta doença. A evolução muitas vezes silenciosa da LV em indivíduos imunocompetentes receptores de sangue, dificulta a associação com transfusão. A transmissão de leishmania spp através de transfusão é um evento, embora possivelmente subestimado, provavelmente raro (46).

Na China, em 1948, duas crianças adquiriram a LV depois de receberem injeções de sangue da mãe que teve diagnóstico de calazar dias depois da doação (14). Na Índia, criança de 7 meses recebeu transfusão de sangue de tio que faleceu 3 meses depois, tendo sido constatado diagnóstico de LV após a morte. Esta criança apresentou leishmaniose visceral 8 meses depois, a mãe do menor tinha sorologia negativa (19).

Posteriormente, a transmissão transfusional de leishmaniose foi considerada provável em pacientes de países não endêmicos, como Bélgica, Alemanha e Inglaterra. Também foram descritos casos de leishmaniose visceral em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos e que receberam transfusão. Em um caso descrito na Grécia, idosa submetida a colecistectomia, que recebeu transfusão de sangue, apresentou a doença e foi constatada sorologia positiva do doador em investigação posterior (15-20, 47, 48).

Não existe definição do melhor método laboratorial aplicável para estudo em infectados assintomáticos, o que dificulta a perspectiva de incluir um método de identificação na triagem clínica de doadores (49, 50).

Alguns recursos vêm sendo testados para prevenir o provável risco de leishmaniose adquirida por transfusão. Em muitos experimentos, a concentração de parasitos utilizados para infectar é muito mais elevada do que seria de se esperar no plasma e, portanto, a eficácia da riboflavina e luz ultravioleta foi demonstrada mediante a presença de mais que 100 milhões de organismos, o que permite inferir que seria eficaz após o armazenamento do sangue (51).

Em outro estudo, a riboflavina associada a luz ultravioleta produziu uma redução de 5,4 log de leishmania em concentrado de plaquetas contaminado com promastigotas metacíclicas de

leishmania, e o crescimento deste parasito não foi observado em qualquer diluição em suspensões de hemácias(25).

Outro recurso citado em poucos trabalhos é a eliminação do parasita por filtração dos hemocomponentes. Cardo e colaboradores infectaram e armazenaram sangue em condições habituais de banco de sangue e demonstraram que o processo de leucodepleção resultou em redução substancial de organismos livres e intracelulares (52).

### 2.3- EFEITOS DOS LEUCÓCITOS TRANSFUNDIDOS

Os leucócitos têm a capacidade de distinguir células do próprio indivíduo e células alogênicas em relação aos antígenos de leucócitos humanos (HLA), que estão presentes na membrana celular de cada pessoa. Durante a transfusão de sangue alogênico, grande número de leucócitos de doadores é infundido no receptor e estes são reconhecidos como células estranhas pelo sistema imunológico, o que pode causar reações adversas. Incluem reações febris não hemolíticas transfusionais (FNHTR), refratariedade à transfusão de plaquetas, doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD), imunomodulação e transmissão de agentes infecciosos (30).

A constatação de que os leucócitos alogênicos e os seus produtos podem ter atividades biológicas adversas promove uma pressão crescente para a redução do teor de leucócitos, a fim de minimizar a ocorrência desses efeitos. Por outro lado, os efeitos imunossupressores produzidos pela infusão de leucócitos alogênicos podem ser benéficos para alguns pacientes, ou seja, para a manutenção de aloenxertos de rim, possivelmente reduzindo a taxa de recidivas em pacientes com doenças inflamatórias dos intestinos, e na melhoria do aborto espontâneo recorrente (30, 53).

### 2.4 - MÉTODOS DE REMOÇÃO DE LEUCÓCITOS DO SANGUE

Uma variedade de técnicas tem sido desenvolvida para preparar os componentes de sangue pobres em leucócitos. Embora existam muitas variações metodológicas e combinações destas técnicas, cinco métodos básicos podem ser utilizados: centrifugação diferencial, sedimentação, lavagem da célula, congelamento e descongelamento, e filtração (54, 55).

A Centrifugação diferencial foi a primeira e ainda é uma das técnicas mais utilizadas para a redução de leucócitos no sangue. Nesse método, através da retirada da camada leucoplaquetária (*buffy coat*), cerca de 70% a 90% dos leucócitos pode ser removida, com a

perda de 10% a 40% de células vermelhas. Trata-se de procedimento simples e passível de utilização em larga escala (54).

A sedimentação espontânea das hemácias, isto é, sem o uso de centrifugação, pode ser melhorada pela adição de agentes que promovem a formação de agregados de glóbulos vermelhos, conhecida como formação *rouleaux*. Após a sedimentação, o sobrenadante e o creme leucocitário podem ser removidos, resultando na depleção de mais de 80% dos leucócitos. A perda de células vermelhas do sangue é muito baixa em comparação com outros métodos (54).

A lavagem de glóbulos vermelhos combina centrifugação diferencial e diluição contínua das células, utilizando solução salina isotônica. Dependendo das condições do processo, as lavagens também podem remover 70% a 95% dos leucócitos a partir de sangue total, ao passo que a perda de células vermelhas do sangue é de aproximadamente 15% (54).

O método de congelação foi desenvolvido originalmente para a preservação a longo prazo de células vermelhas do sangue, particularmente hemácias raras. Para protegê-las contra a congelação, um agente crioprotetor, por exemplo, glicerol, avidamente absorvido pelas células vermelhas do sangue, é adicionado ao sangue. Por congelação, os cristais de gelo que se rompem nas membranas das células durante o descongelamento são formados nos leucócitos (54). A lavagem subsequente ao procedimento remove o glicerol e o estroma rico em leucócitos. Com este método, mais de 95% dos leucócitos são, geralmente, removidos, ao passo que a perda de células vermelhas do sangue é inferior a 10%. No entanto, várias dificuldades logísticas, a exigência de instalações caras para o congelamento e armazenamento das células, a disponibilidade limitada de produtos necessários para esta rotina, o período de validade curto devido à manipulação de sistema aberto, dificultam a utilização deste método na maioria dos serviços (54).

Embora os termos leucorredução e leucodepleção sejam usados na literatura alternativamente, cabe esclarecer que a leucorredução implica na remoção de leucócitos pelo método de remoção bruto, enquanto a leucodepleção é realizada a partir da utilização de filtros específicos. A filtração, como meio para a remoção de leucócitos a partir do sangue, vem sendo cada vez mais utilizada. A remoção de agregados de sangue para evitar a embolia foi realizada com a utilização de filtros de microagregados. Porém, observou-se que estes filtros



removiam 95% do número total de leucócitos em uma unidade de sangue, enquanto a perda de células vermelhas do sangue era inferior a 10% (55).

Hoje em dia, a filtração de leucócitos é o método mais comum utilizado para preparar sangue pobre em leucócitos. O processo é simples, rápido, clinicamente eficaz e não requer equipamento caro (55).

Os filtros de leucócitos, atualmente mais utilizados, são os de terceira geração (figura 1) que proporcionam remoção de 99,9% dos leucócitos. Além disso, o processo não ocorre com manipulação de sistema aberto, sendo mantida a vida útil dos produtos. Estes filtros, constituídos em geral de fibras de poliéster, possuem poros de diâmetros variáveis, em geral de 5 a 50  $\mu\text{m}$  (54).

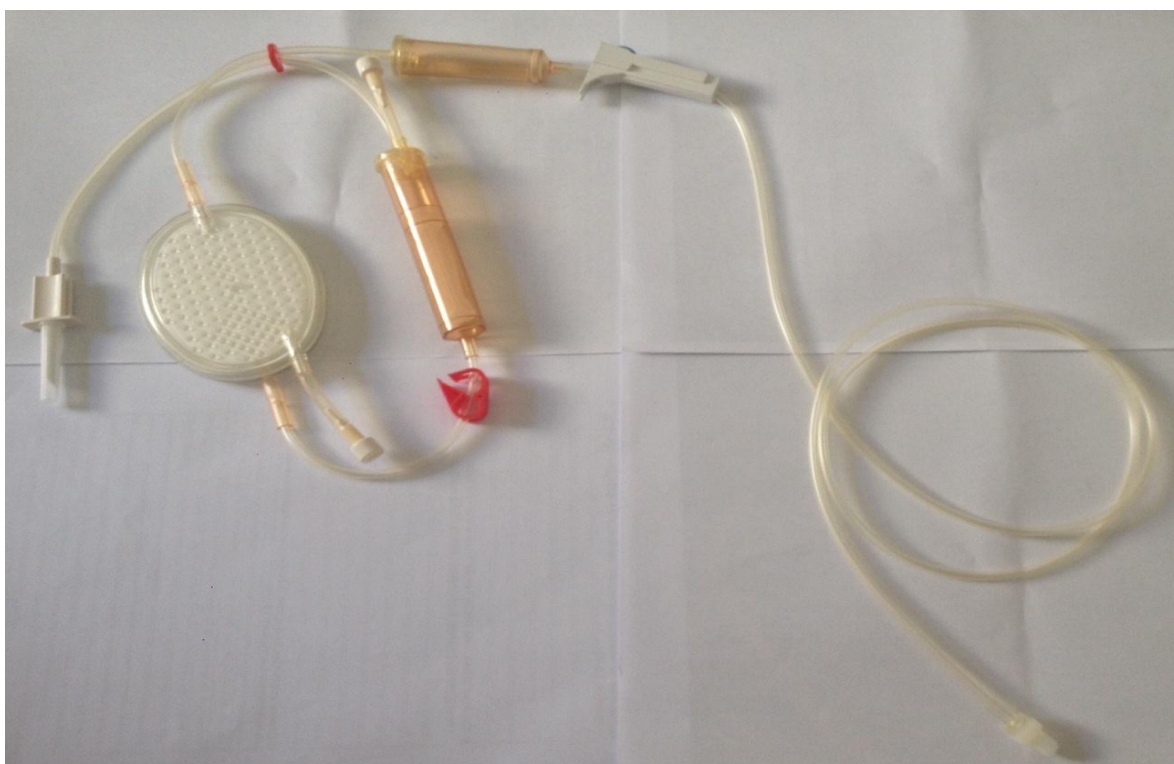


Figura 1: Filtro de leucócitos

#### 2.4.1 - FILTROS DE LEUCÓCITOS

##### HISTÓRICO E MECANISMOS DE FILTRAÇÃO

O conceito de remoção de leucócitos a partir do sangue foi introduzido por Fleming no início de 1920. Fleming utilizou coluna com lã de algodão para preparar pequenas quantidades de sangue pobres em leucócitos. Em 1948, as inovações na tecnologia de plásticos permitiram

Carl Walter projetar recipientes descartáveis que facilitaram a produção de componentes e o uso de conjuntos de administração de plástico contendo filtros de tela para coágulo. Nos anos seguintes, foi desenvolvida uma série de filtros de diferentes materiais, até que, em 1962, Greenwalt *et al* relatou método de filtração para uso em banco de sangue. Diante da estocagem do sangue, a formação de agregados e coágulos exigia o aprimoramento de métodos de filtração, a fim de evitar a infusão de partículas capazes de promover fenômenos embólicos (31).

Na década de 1960, foram introduzidos os primeiros filtros de coágulos (clot screen) capazes de reter estas partículas maiores que 170  $\mu\text{m}$  consideradas nocivas. Em estudos posteriores, foi estabelecido efeito indesejável atribuído a partículas ainda menores, particularmente para o pulmão e o cérebro (56). O filtro de remoção de leucócitos original continha lã de algodão estéril como agente de filtragem e foi projetado por Diepenhost, em 1972 (31, 54).

Em Nova York, Russel Patterson considerou que o déficit neurológico observado após circulação extracorpórea em by-pass coronário poderia ser associado a microembolos reinfundidos (31). Diante desta observação, filtros de poliéster de 40  $\mu\text{m}$  foram fabricados e passaram a ser padronizados nos EUA. Outros avanços foram introduzidos em filtros utilizados em circulação extra corpórea. A utilização do recurso de filtração tornou-se popular em centros cirúrgicos e para transfusão maciça, porém, sua aplicação para todas as transfusões ainda não estava estabelecida (31).

Na década de 1980, com o avanço da tecnologia, foram produzidos filtros de acetato de celulose de primeira geração, cuja eficiência para remoção de leucócitos atingia 98%. Os filtros de segunda geração removem cerca de 3 log, com constatada eficácia para evitar RFNH (10). Os atuais filtros de leucócitos (terceira geração) muito eficazes na preparação de sangue pobre em leucócitos, possuem capacidade de remoção superior a 99,9% dos leucócitos (>3 log) inicialmente presentes no sangue doado, depleção significativa suficiente para atender às normas de qualidade exigidas para os dias atuais (tabela 1) (30). Ainda se vislumbra o desenvolvimento de novos filtros cada vez mais eficazes, o que exige detalhada compreensão dos mecanismos de remoção de leucócitos (31, 54, 55).

Tabela 1- História da Filtração de Sangue

Marco histórico	Data
Introdução da tela de coágulo (170µm) na prática clínica	1939
Complementos de remoção de filtro de microagregados (40µm)	1974
Rotação, resfriamento e filtro usados para confirmar as suspeitas de que a origem das reações de febre eram leucócitos agregados	1980
Introdução de filtros de redução de leucócitos para maior redução RFNH	1987
Filtros de redução de leucócitos para redução das complicações infecciosas em pacientes cirúrgicos	1992
Filtro de redução de leucócitos para atenuar a transmissão por transfusão de infecção por citomegalovirus	1995
Efetividade do filtro de redução de leucócitos para refratariedade plaquetária secundária à aloimunização	1997
Leucoredução universal endossada por unanimidade pelo Comitê Consultivo de Produtos Derivados do Sangue da FDA-EUA	1998
Implementação da “redução universal de leucócitos” inicia-se em diversos países	1998

Fonte: Wortham,2003

Os processos de filtração são geralmente divididos em três categorias: a superfície de filtração, a filtração do bolo e a filtração em profundidade. A filtração de leucócitos a partir do sangue pode ser considerada como um processo de filtração em profundidade. Estes filtros possuem poros que permitem a retenção de células individuais e aumentam a capacidade de adsorção (55-57).

Os mecanismos exatos pelos quais os filtros removem leucócitos de componentes do sangue são incertos, mas, provavelmente, representam uma combinação de ambos os processos físicos e biológicos, cujas contribuições para remoção de leucócitos são interdependentes. Dois principais mecanismos estão envolvidos: o aprisionamento mecânico (peneiramento), dependente do tamanho dos poros e da deformabilidade das células, e o aprisionamento físico-químico (ou aderência) (56, 57).

O tamanho do poro do filtro determina a eficiência do peneiramento, enquanto a adesão permite a retenção mesmo de partículas menores que o poro (57, 58).

A adesão específica pode ser promovida pelo uso de ligantes seletivos reconhecidos pelos receptores de células, principalmente as integrinas. No entanto, este conceito largamente desenvolvido no campo da engenharia de tecidos, ainda não é plenamente aplicado na produção de filtros industriais, apesar de demonstrado em estudos laboratoriais (54, 55, 58).

Algumas propriedades das diversas células como o diâmetro, densidade, deformabilidade e adesividade são essenciais para o sucesso do processo de filtração, sem promover retenção importante do fluxo do sangue, o que inviabilizaria a utilização desta excelente técnica (55).

## MOMENTO DA LEUCOFILTRAÇÃO

A leucodepleção do sangue pode ser feita no momento da coleta e processamento, pós processamento (dentro do banco de sangue), ou pós armazenamento (beira do leito). Cada um tem as suas próprias vantagens e desvantagens. No entanto, a leucodepleção pré-armazenamento é, atualmente, o modo mais amplamente aceito.

A filtração do sangue em beira de leito (bed side) pode ser feita de forma seletiva em grupos de pacientes recomendados para utilização de componentes sanguíneos com redução de leucócitos. No entanto, parece não ser tão eficaz na diminuição dos efeitos adversos, como a leucodepleção pré-armazenamento (54, 60,61)

Portanto, para evitar ou diminuir a frequência de reações transfusionais de hemácias e plaquetas, a leucodepleção deve, idealmente, ser realizada durante a produção do hemocomponente ou até 48 horas depois, momento em que os leucócitos ainda estão íntegros e não houve liberação de interleucinas no sangue, também capazes de gerar reações adversas (54, 59-61).

## APLICAÇÕES ATUAIS DOS FILTROS DE LEUCÓCITOS

Para prevenir efeitos indesejáveis provocados pela infusão de leucócitos alogênicos, estudo demonstrou que o nível de redução necessário para evitar RFNH é superior a 90%, transmissão de alguns agentes infecciosos 99,9%, aloimunização plaquetária 99,9% e, para evitar imunomodulação, este percentual não é conhecido (30).

A leucodepleção universal tem sido o termo utilizado para definir a prática de utilizar tecnologia de redução de leucócitos em 100% dos hemocomponentes produzidos. Alguns países adotam esta política com o fim de melhorar a segurança do processo transfusional. O Canadá foi o primeiro a implementar inicialmente a leucorredução para filtração de plaquetas, em 1988 e, a seguir, em 1999, para todos os hemocomponentes. Em 1998, a França instituiu a leucodepleção universal e, posteriormente, vários países acataram esta política de segurança (tabela 2). Nos EUA, em novembro de 2001, a leucodepleção era praticada em 70% dos hemocomponentes produzidos (31).

Tabela 2. Implantação da leucodepleção universal por data

<b>Pais</b>	<b>Data</b>
Canadá	1998
França	Abril de 1998
Áustria	Janeiro de 1999
Eire (Irlanda do Sul)	Janeiro de 1999
Gales	Agosto de 1999
Escócia	Agosto de 1999
Suíça	Setembro de 1999
Inglaterra	Outubro de 1999
Irlanda do Norte	Outubro de 1999
Malta	Janeiro de 2001
Espanha (Portugal)	Maio de 2001
Alemanha	Outubro de 2001
Catar	Janeiro de 2002
Holanda	Janeiro de 2002
Noruega	Janeiro de 2002
Finlândia	Novembro de 2002

Fonte: Wortham, 2003 (Modificada)

No Brasil, a legislação atual (27, 28) define como obrigatória a leucodepleção, visando evitar CMV quando não for realizada a sorologia para CMV nos seguintes casos: pacientes submetidos a transplante de células progenitoras e órgãos que apresentem sorologia negativa; recém nascidos, filhos de mãe com sorologia negativa ou desconhecida e que tenham peso inferior a 1,200g e transfusão intrauterina (28).

As recomendações estabelecidas no Guia para uso de hemocomponentes do Ministério da Saúde de 2015 incluem: hemoglobinopatias, anemias hemolíticas hereditárias, antecedentes de duas ou mais reações febris não hemolíticas (RFNH), síndromes de imunodeficiência congênita, candidatos a transplante de medula óssea, anemia aplástica, leucemia mielóide aguda, doenças hematológicas graves até esclarecimento diagnóstico, portadores de doença plaquetária com necessidade frequente de transfusão, prevenção de CMV nas condições previstas na legislação e ainda para gestantes com sorologia negativa ou desconhecida para CMV e pacientes HIV positivos que apresentem sorologia negativa para esse vírus (26).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 - Objetivo geral:

Avaliar a eficácia do uso de filtros de leucócitos para retenção de *L. (L.) infantum chagasi*.

#### 3.2 - Objetivos específicos:

- Verificar a presença de leishmanias em cultura do sangue periférico infectado e filtrado com filtros de leucócitos de bancada.
- Comparar os esfregaços de sangue periférico infectados com leishmanias antes e após filtração com filtros de leucócitos de bancada.

#### 4- PRODUTOS

- 4.1- Artigo I: Leukocyte filters : a review of the mechanisms and applications in hemotherapy  
Periódico pretendido: Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
- 4.2- Artigo II: Evaluation of the effectiveness of the use of leukocyte filters for retaining *L. (L.) infantum chagasi*.  
Periódico pretendido: Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

### 3.1 Article I

## **Leukocyte filters: a review of the mechanisms and applications in hemotherapy.**

### ABSTRACT

There is consistent evidence of transfusion reactions related to the presence of leukocytes in hemocomponents. The use of leukocyte filters as transfusion safety measure has been recommended in several clinical situations. This present work aimed to understand the mechanisms and leukocyte filter applications in hemotherapy. The Medicus Medline Index database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)) was used for the selection of the articles. Those articles which dealt with the mechanisms, current applications and effectiveness of filters to avoid adverse reactions were included. The articles on studies of filtered cells, other types of filtering and those published more than 30 years ago were excluded. National legislation related to the theme was also consulted. This review permitted to understand the filtration mechanisms and the leukocyte filter performance to prevent nonhemolytic febrile reactions (FNHTR) alloimmunization to human leukocyte antigen (HLA), platelet refractoriness, graft-versus-host disease (GVHD), immunomodulatory effects, acute lung injury related to transfusion (TRALI) and to retain some pathogens. It points to the need for further discussion on the implementation of universal leukodepletion.

**Keywords:** Leukocyte filters. Adverse effects and Transfusion. Filtration mechanisms.

### INTRODUCTION

The leukodepletion performed through specific filters to remove leukocyte from hemocomponents has been applied more and more as a preventive measure of transfusion complications. A whole blood unit contains about 2 to  $3 \times 10^9$  leukocytes, while the Brazilian legislation determines that leucodepleted components should contain less than  $5 \times 10^6$ , which means the reduction of 99% of leucocytes after the filtration of blood (1, 2).

Since the early sixties, blood banks and industries have sought strategies to reduce transfusion risks. In Brazil, laboratory screening tests for Chagas disease, hepatitis B and C, human T-cell lymphotropic virus (HTLV), HIV, syphilis, besides *plasmodium falciparum* research in endemic areas of malaria and preventive measures in specific situations for cytomegalovirus, are systematic procedures (2, 3).

Major advances in the performance of serological tests and the institution of nucleic acid test (NAT) for the human immunodeficiency virus (HIV), B and C hepatitis were introduced in



the routine as a means of reducing the immune window (2).

Besides infectious risks, immediate reactions may be highlighted such as febrile non-hemolytic reaction (FNHTR), allergic, acute hemolytic reactions, acute respiratory failure related to transfusion (TRALI), bacterial contamination and volume overload (TACO). Care in the pre, during and post transfusion acts are fundamental to minimize these risks, currently less controlled than the infectious risks (2,4-6).

The use of special hemocomponents indicated in practice for high-risk patients as immunosuppressed who benefit by irradiated components, multiple transfusions and/or alloimmunization that should receive phenotyped red blood cells in proven IGA deficiency that indicates washed red blood cells are some of the conditions that require additional care. The use of leucodepleted hemocomponents currently used in specific situations in Brazil will be the discussion focus of this work (2, 3).

This article aimed to understand the mechanisms and leukocyte filter applications in hemotherapy.

## **METHODOLOGY**

This article review adopted as initial criteria of selection the query to the Index Medicus Medline ([www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)) through its search system and the use of the keywords "Leukocyte filters", "Adverse effects and Transfusion" and "Filtration mechanisms". And other related associations as "leukocyte filters and hemotherapy", "hemocomponents", "hemocomponent filtering", "leucodepletion" were also analyzed. The selection sought to reach articles in English and Portuguese published in the last 30 years. A careful analysis of selected articles including those which presented information on the mechanisms and leukocyte filter applications in hemotherapy was performed. Articles directed to filtered cells' studies and other types of filtration were excluded from the study. Thus, a total of 35 articles and national legislations related to the theme were analyzed.

## **DISCUSSION**

During allogeneic blood transfusion, the patient receives a large number of the donor's

leukocytes and these cells are recognized as strange cells by the immune system of the recipient, which can result in adverse reactions (5, 6).

The main complications related to the presence of leukocytes in the blood are non-hemolytic febrile transfusion reactions (FNHTR) alloimmunization to human leukocyte antigens (HLA), platelet refractoriness, graft-versus-host disease (GVHD) and immunomodulatory effects. The transmission of infectious agents may also be associated with agents such as cytomegalovirus (CMV), human T lymphotropic virus (HTLV-I / II), and Epstein-Barr virus (EBV) as well as other viruses and parasites (6).

The mechanisms which are known to be involved in the physiopathology of FNHR are immunological (antileukocyte antibodies), transference of inflammatory cytokines and destruction of incompatible donor platelets per receptor antibodies.

The alloimmunization to leukocyte antigens, although related to platelet refractoriness in 20 to 50% of cases of multiple random donor platelets transfusion is not the sole determinant for the occurrence of unsatisfactory recovery of infused platelets. Factors such as alloimmunization against specific antigens of platelets, incompatible ABO platelets, drugs, fever, sepsis, disseminated intravascular coagulation (DIC), splenomegaly, platelet glycoprotein changes (Ib and IIb / IIIa) during storage, they are also related to platelet refractoriness (5).

Transfusion-related GVHD occurs due to the presence of cytotoxic T lymphocytes and Natural Killer cells viable in infused allogeneic hemocomponents, which can act directly or through the release of TNF-alpha, TNF-beta and IL-I. The aggression provoked in the receiver, particularly in immunosuppressed patients may have a fatal outcome. In the presence of infection by herpes and cytomegalovirus immunological changes may also occur and this fact is associated with greater propensity for GVHD (5).

Another undesirable effect of leukocytes discussed in the literature is the increased incidence of postoperative infections documented in cardiac surgery; however, factors such as age, previous cardiac surgery, type of surgery and platelet counts during preoperative phase related to higher mortality interfere with the actual analysis of the effect of leukocytes in these patients (6, 7).

On the other hand, therapeutic granulocyte transfusion may be beneficial in patients with neutropenia ( $<500$  neutrophils /  $\text{mm}^3$ ) and documented infection is not responsive to therapy for at least 24h to 48h, in a reverse scenario myeloid hypoplasia.

### **Leukocyte Filters**

The fact that allogeneic leukocytes may promote adverse biological activities justifies the increasing pressure to reduce the content of white blood cells (5, 6, 8).

Although there is no definition of the number of threshold leukocytes below which these effects are negligible, however, a reduction of 100 to 1000 times (2 to 3 log) provided by leukocyte filters available on the market, has demonstrated decrease in the frequency of many adverse reactions (5).

In order to prevent undesirable effects caused by the infusion of allogeneic leukocytes, studies demonstrated that the level of necessary reduction to avoid FNHTR is less than 90%, transmission of some infectious agents 99.9% and platelet alloimmunization 99.9% and to avoid immunomodulation, this percentage is not known (5).

The filtration as a means to remove blood leukocytes has become routine practice after the development of microaggregate filters. These filters typically remove more than 95% of the total number of leukocytes in a unit of blood and the loss of red blood cells is less than 10%. Nowadays, filtration of leukocytes is the most common method used to prepare blood poor in leukocytes. The process is simple, fast, clinically effective and does not require expensive equipment. Furthermore, it does not require open handling system which preserves the life of the product (6, 9).

Other authors report the importance of detailed studies of the costs of universal leukodepletion. They consider that this analysis is complex due to the difficulty in dimension long-term morbidity that can be attributed to transfusion. However, they claim that filter indications should be reserved for situations where consistent evidence determine this indication because the competition for resources for health that have numerous serious and precarious attention problems affect this situation (6). However, one cannot neglect the

knowledge of the great benefits of this procedure to avoid adverse reactions related to transfusion, besides not causing impact in the blood supply.

The first filters (first generation) developed with the aim of reducing leukocytes present in the blood to be transfused had the capacity to hold approximately 1 log of white blood cells. With the development of a technique "centrifuge, cool, filter", the second generation filters arose promoting retention of about 3 log with verified efficacy to prevent FNHTR (10). Other clinical applications of filtration stimulated the development of research to improve filters' performance, currently of the third generation which removes more than 99.9% (> 3 log) of leukocytes originally present in the donated blood. These filters, polyester generally, have pores ranging from 5 to 50 micrometers and are able to meet current hemocomponents' quality standards (Table 1) (1, 10-12).

### **Filtering Mechanisms**

Filters have small pores which allow the retention of individual cells and increase adsorption capacity. Two main mechanisms are involved: the mechanical entrapment (sieving), dependent on the size of the pores and of deformability of cells and physical-chemical entrapment or adhesion (1, 6, 9, 13).

Different factors may be responsible for nonspecific adherence of white cells to surfaces, such as chemical characteristics, charge and surface morphology (porosity, roughness). When there is adherence, the action of mechanical forces (gravity, the fluid flow pressure) is not necessarily a requirement to retain the particles in the filter, in addition to the adhesion that permits the retention of particles smaller than the pore size. The filters have several layers with different diameters pores which permit depth filtration. The filter pore size then determines the sieving of particles larger than 30  $\mu\text{m}$  being the adhesion and depth filtration responsible for retaining particles smaller than 1  $\mu\text{m}$ . Particles of size between 1 and 30  $\mu\text{m}$  are retained by the simultaneous action of both processes (1, 9, 14).

The filter surface charge can be adjusted by the coating of the filter material with methacrylate polymers to create a strong positive charge and hence to increase the adhesion surface (9, 15).

Some properties (Table 2) of the diverse cells such as diameter, density, deformability and adhesiveness are essential for the filtration success(1).

Many of the obtained results with the use of removed leukocyte filters are desirable. However, the cost-effectiveness must be analyzed considering that it is impractical in many countries, while others have already adopted the leucodepletion of all hemocomponents (universal) (6-9, 11, 16).

### **Moment of filtration**

The blood filtration may be made at the time of collection, processing and post processing of blood, or at the moment of transfusion. However, the pre-storage leucodepletion is currently the most widely accepted way. The advantages of this method compared to the post-storage, are the following (1, 4, 6, 17):

- Minor accumulation of leukocyte cytokines during storage which ensures greater efficiency in preventing non-hemolytic transfusion reactions;
- It minimizes HLA alloimmunization risk in multiple transfusion patients, since it removes leukocytes intact during filtration. The filtration during transfusion (BED SIDE), allows the passage of leukocytes fragments and may alloimmunize the receptors;
- It minimizes the risk of lymphotropic virus transmission which, with the degradation of leukocytes and the release of intracellular organisms after 72 hours of storage, is no longer retained.

In Brazil, leukodepletion with bench filters for concentrated erythrocytes has often been held up to 48 hours after collection, while for platelets it is often performed at bedside. The hemocomponents produced by apheresis already go through the reduction of leukocytes during processing.

Universal leukodepletion (100 % of the produced components) has been a transfusional security policy adopted by some countries in the world. Canada was the first to initially deploy the filter platelets, in 1988 and in 1999 for all the hemocomponents. France, also in 1988, instituted this procedure, later instituted in Austria, Ireland, Wales, Scotland, Switzerland, North of England, Ireland, Malta, Spain, Portugal, Germany, Qatar, the Netherlands, Norway and Finland. In the US, in November 2001, the universal leukodepletion was practiced by 70% of produced hemocomponents ( 6, 11 ) .

## Recommendations on the use of leukocyte filters in Brazil

The use of leukocyte filters has been recommended for hemoglobinopathies, hereditary hemolytic anemia, history of two or more febrile not hemolytic reactions, congenital immunodeficiency syndrome, candidates for bone marrow transplantation, aplastic anemia, acute myeloid leukemia, severe oncohematological disease till the right diagnosis, platelet disease patients with frequent transfusion need. For the prevention of CMV, filtration has been indicated in the following conditions: HIV-positive patients with negative serology for CMV; candidate for organ and bone marrow transplantation if the donor and recipient are negative for CMV; intrauterine transfusion, pregnant with nonreactive serology or unknown to CMV, premature newborn and of low birth weight (1,200g); newborns (NB) whose mothers have negative CMV or unknown serology. The effectiveness of leukocyte filters is equivalent to the realization of serology for the prevention of CMV (2).

### Other leukocyte filter applications

- Virus Transmission Prevention

It has long been recognized that allogeneic leukocytes from the donor blood are responsible for the virus transmission, such as cytomegalovirus (CMV), human T-lymphotropic virus (HTLV), or Epstein-Barr virus (EBV) (14, 15, 18, 19) .

O citomegalovírus, HTLV-I and HTLV-II are only transmitted by cellular products' transfusion, if the universal leukodepletion were adopted, the viruses would be removed by filtration, blood testing to these potential contaminants not being necessary (6).

Serologic testing of cytomegalovirus in blood banks is recommended for individuals who underwent stem cell and organ transplantation with no positive serology for CMV, newborn children of mothers CMV negative or unknown serology and who have weight lower than 1.200g and for intrauterine transfusion, but leukodepletion cellular components can replace this serology (2).

On the opposite, for HTLV, serological screening has been routinely made for all donors (2) which makes the use of leukocyte filters deprecated for this purpose.

- Bacteria transmission prevention

Current studies indicate that a significant percentage of healthy blood donors carry *Chlamydia pneumoniae* in their blood. The clinical significance of these results is unknown; however, the eradication of these bacteria was verified in leucodepleted units through real-time PCR and immunoblotting tests that identified bacteria trapped in the filter mesh. This finding contributes to greater safety of transfusions; however, such method may not be completely sufficient to eliminate the pathogen (20).

- Prion transmission prevention

Prions are infectious proteins related to a variety of progressive and fatal neurodegenerative diseases collectively referred to as transmissible spongiform encephalopathies (TSE ) (6, 21, 22 ).

Contamination of leukocytes in the blood also raises risk of abnormal protein prion transmission, probable causative agent of the new variant Creutzfeldt-Jakob disease (CJD ) (21, 22).

The leukodepletion reduces up to 42 % of infectivity associated with the infectious prion. Modifications of the specific affinity to prion surface have been developed to increase the filtering efficiency for this end (10, 21).

Some countries in Europe and the UK had the universal leukodepletion implemented under this transfusion risk (11). In Brazil, clinical screening donors eliminates people who were diagnosed with CJD, family history of CJD, significant stay in the UK or Republic of Ireland after 1980, who have received growth hormone or other pituitary origin not recombinant drugs, use of bovine insulin, corneal transplantation or biological material to dural base and who have received transfusions of hemocomponents in the United Kingdom after 1980 (11).

- Parasite transmission prevention

The risk of infection by the parasite associated with transfusion is mainly determined by the

following factors: the prevalence of infection, the capacity of survivability of parasites stored in the blood and the immune competence of the recipient (23).

There was an inexplicable decrease in the incidence of malaria transmitted by transfusion in recent years. This fact parallels the increased use of leukocyte filters, besides the measures adopted by the blood policy, as in Brazil that has well established disability criteria for the clinical trial and in endemic area, where tests are done for plasmodium detection or plasmodial antigens (2, 23).

There are studies which provide evidence that the leukocyte reduction filters are effective to reduce the number of parasites in the infected blood such as *Trypanosoma cruzi* and this effectiveness depends in part on the concentration of parasites in the artificially infected blood (24, 25).

Fabron Junior evaluated *Trypanosoma cruzi* retention mechanisms by leukocyte filters. Concentrated samples of red blood cells and platelets (CP) were infected with the parasite and then filtered to measure the removal capacity, showing the reduction of approximately 3 log . An analysis of the filter fibers demonstrated that *T. cruzi* parasites were removed by direct adherence to the filter fibers, suggesting a biological mechanism, probably mediated by the surface proteins of the parasite (24) .

The serology for Chagas' disease research is part of the routine of blood banks, which is the reason why the use of filters is not recommended for this purpose (2).

The prevalence of positive serology for leishmaniasis in asymptomatic individuals including blood donors has been observed in endemic areas (26-31).

There are few cases in the literature pointing to transfusion as a likely cause of transmission of this disease (27, 32-36). There are not recommended tests in blood banks for this purpose. In Brazil, sick individuals or who have had kalaazar are definitely unsuitable as blood donors.

Cardo (2006) demonstrated the feasibility of *Leishmania* in intentionally contaminated blood, processed and stored under conditions prevailing in blood banks. Cardo also found a substantial reduction of this parasite after filtration using bedside filters (26).



- TRALI Prevention

Acute lung injury related to transfusion (TRALI) has been associated to passive transfusions of anti leukocyte antibodies from the donor which react with alloantigen on the receptors' leukocytes. This potentially fatal complication occurs most frequently by multiparous blood donation. The use of leukocyte filters has also been described as a way to mitigate this risk (5, 37).

## CONCLUSION

The understanding of filtration mechanisms by mechanical and physical chemical actions (adhesion) besides proven efficiency in several clinical conditions and to retain some pathogens requires reflection on numerous other possible applications that can add transfusion safety.

Researches to improve increasingly leukocyte filter performance, which already have excellent efficacy and that reduce costs can also be an advantage for the implementation of universal leukodepletion, a measure that needs to be considered in the face of strong evidence on the benefits of hemocomponents filtration.

## REFERENCES

1. Bruil A, Beugeling T, Feijen J, van Aken WG. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfus Med Rev.* 1995;9(2):145-66.
2. Brasil. Ministério da Saude [Internet]. Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013. Diário oficial da união N°2212013. p. 106. [citado 20 Nov 2015] Disponível em: [http://www.hemominas.mg.gov.br/images/doacao\\_sangue/portaria\\_2712\\_de\\_12\\_novembro\\_2013.pdf](http://www.hemominas.mg.gov.br/images/doacao_sangue/portaria_2712_de_12_novembro_2013.pdf).
3. Brasil. Agência Nacional de Vigilância sanitária Internet . Resolução da diretoria colegiada nº 34. 2014. [citado 22 Nov 2015] Acessado em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0fae1580484d56a5a53aa5bdc15bfe28/RDC\\_34\\_11\\_06\\_2014.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0fae1580484d56a5a53aa5bdc15bfe28/RDC_34_11_06_2014.pdf?MOD=AJPERES)
4. Wang RR, Triulzi DJ, Qu L. Effects of prestorage vs poststorage leukoreduction on the rate of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelets. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(2):255-9.
5. Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA. Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood.* 1994;84(6):1703-21.
6. Dzik S, Aubuchon J, Jeffries L, Kleinman S, Manno C, Murphy MF, et al. Leukocyte reduction of blood components: public policy and new technology. *Transfus Med Rev.* 2000;14(1):34-52.

7. McQuilten ZK, Andrianopoulos N, van de Watering L, Aubron C, Phillips L, Bellomo R, et al. Introduction of universal prestorage leukodepletion of blood components, and outcomes in transfused cardiac surgery patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;150(1):216-22.
8. Williamson LM, Stainsby D, Jones H, Love E, Chapman CE, Navarrete C, et al. The impact of universal leukodepletion of the blood supply on hemovigilance reports of posttransfusion purpura and transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion.* 2007;47(8):1455-67.
9. Sharma RR, Marwaha N. Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries. *Asian J Transfus Ssc.* 2010;4(1):3-8.
10. Gregori L, McCombie N, Palmer D, Birch P, Sowemimo-Coker SO, Giulivi A, et al. Effectiveness of leucoreduction for removal of infectivity of transmissible spongiform encephalopathies from blood. *Lancet.* 2004;364(9433):529-31.
11. Wortham ST, Ortolano GA, Wenz B. A brief history of blood filtration: clot screens, microaggregate removal, and leukocyte reduction. *Transfus Med Rev.* 2003;17(3):216-22.
12. Dzik S. Leukodepletion blood filters: filter design and mechanisms of leukocyte removal. *Transfus Med Rev.* 1993;7(2):65-77.
13. Gerard E, Bessy E, Salvagnini C, Rerat V, Momtaz M, Hénard G. Surface modifications of polypropylene membranes used for blood filtration. *Polymer.* 2011;52(5):1223-33.
14. Shapiro MJ. To filter blood or universal leukoreduction: what is the answer? *Crit Care.* 2004;8 Suppl 2:S27-30.
15. Pietersz RN, van der Meer PF, Seghatchian MJ. Update on leucocyte depletion of blood components by filtration. *Transfus Sci.* 1998;19(4):321-8.
16. Masse M. Universal leukoreduction of cellular and plasma components: process control and performance of the leukoreduction process. *Transfus Clin Biol.* 2001;8(3):297-302.
17. Muylle L, Peetermans ME. Effect of prestorage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates. *Vox Sang.* 1994;66(1):14-7.
18. Gilbert GL, Hayes K, Hudson IL, James J. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal Cytomegalovirus Infection Study Group. *Lancet.* 1989;1(8649):1228-31.
19. Hillyer CD, Emmens RK, Zago-Novaretti M, Berkman EM. Methods for the reduction of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection: filtration versus the use of seronegative donor units. *Transfusion.* 1994;34(10):929-34.
20. Ikejima H, Friedman H, Leparac GF, Yamamoto Y. Depletion of resident *Chlamydia pneumoniae* through leukoreduction by filtration of blood for transfusion. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4580-4.
21. Sowemimo-Coker SO, Pesci S, Andrade F, Kim A, Kasczak RB, Kasczak RJ, et al. Pall leukotrap affinity prion-reduction filter removes exogenous infectious prions and endogenous infectivity from red cell concentrates. *Vox Sang.* 2006;90(4):265-75.
22. Cervia JS, Sowemimo-Coker SO, Ortolano GA, Wilkins K, Schaffer J, Wortham ST. An overview of prion biology and the role of blood filtration in reducing the risk of transfusion-transmitted variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Transfus Med Rev.* 2006;20(3):190-206.
23. Cardo LJ, Salata J, Wilder D. Removal of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells from whole blood by leukoreduction filters. *Transfusion.* 2009;49(2):337-46.
24. Fabron Junior A, Bordin JO, Moraes-Souza H, FreyMuller E, Lages-Silva E. Removal of *Trypanosoma cruzi* by white cell-reduction filters: an electronmicroscopic study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(3):223-7.

25. Moraes-Souza H, Bordin JO, Bardossy L, MacPherson DW, Blajchman MA. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease: efficacy of white cell-reduction filters in removing *Trypanosoma cruzi* from infected blood. *Transfusion*. 1995;35(9):723-6.
26. Cardo LJ, Salata J, Harman R, Mendez J, Weina PJ. Leukodepletion filters reduce *Leishmania* in blood products when used at collection or at the bedside. *Transfusion*. 2006;46(6):896-902.
27. Cardo LJ. *Leishmania*: risk to the blood supply. *Transfusion*. 2006;46(9):1641-5.
28. Colomba C, Saporito L, Polara VF, Barone T, Corrao A, Titone L. Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy). *Transfus Apher Sci*. 2005;33(3):311-4.
29. Riera C, Fisa R, Udina M, Gallego M, Portus M. 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*. 2004;98(2):102-10.
30. Riera C, Fisa R, Lopez-Chejade P, Serra T, Girona E, Jimenez M, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion*. 2008;48(7):1383-9.
31. Scarlata F, Vitale F, Saporito L, Reale S, Vecchi VL, Giordano S, et al. Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(4):394-6.
32. Mathur P, Samantaray JC. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. *Transfus Med*. 2004;14(4):319-21.
33. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Cascio A. Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? *Travel Med Infect Dis*. 2014;12(6 Pt A):617-27.
34. Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol*. 2006;24(3):165-70.
35. Bogdan C, Schonian G, Banuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, et al. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Clin Infect Dis*. 2001;32(2):302-6.
36. Cohen C, Corazza F, De Mol P, Bresseur D. Leishmaniasis acquired in Belgium. *Lancet*. 1991;338(8759):128.
37. Silliman CC, Kelher MR, Khan SY, LaSarre M, West FB, Land KJ, et al. Experimental prestorage filtration removes antibodies and decreases lipids in RBC supernatants mitigating TRALI in vivo. *Blood*. 2014;123(22):3488-95.

Table 1 Currently accepted standards for leucodepleted blood components

	<b>Erythrocyte blood Components</b>	<b>Random platelets</b>
American Association of Blood Bank (U.S)	<5x10 <sup>6</sup> Leukocyte / U Loss of less than 15 % of red blood cells	<8,3x10 <sup>5</sup> Leukocytes/U
European Council criteria	<1x10 <sup>6</sup> Leukocytes /U (Hb> 40/U)	<2,0x10 <sup>5</sup> Leukocytes /U
Criteria of the General Head of Services from India	<5x10 <sup>6</sup> Leukocytes /U Loss of no more than 10 % of erythrocytes	<8,3x10 <sup>5</sup> Leukocytes /U
Ordinance 2712/2013 (Brazil)	<5x10 <sup>6</sup> Leukocytes /U	<8,3x10 <sup>5</sup> Leukocytes /U

Source: Sharma, 2010 (Modified)

Table 2 Concentrations e physical properties of blood cells.

Types of Cells	Concentration ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Density ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Diameter ( $\mu$ )	Deformation Capacity	Adhesiveness
Erythrocytes	4.000.000-6.000.000	1,090-1,110	7-8	High	Low
platelets	150.000-400.000	1,054-1,062	2-3	Low	High
granulocytes	2.000-6.000	1,080-1,084	5-8	Little high	Little high
lymphocytes	1.500-4.000	1,060-1,072	4-8	Normal	Normal
monocytes	200-800	1,055-1,062	4-10	Normal	High

Source: Bruil, 1995

### 3.2 Article II

## **Evaluation of the effectiveness of the use of leukocyte filters for retaining *L. (L.) infantum chagasi*.**

### ABSTRACT

Leukocyte filters have been indicated in hemotherapy to prevent febrile non-hemolytic reactions (FNHTR), alloimmunization to human leukocyte antigens, chronic graft-versus-host disease (GVHD), platelet refractoriness and immunomodulatory effects. They also have been found to prevent transmission of cytomegalovirus (CMV), human T lymphotropic virus (HTLV), *Epstein-Barr* virus (EBV), as well as bacteria and parasites. This study aimed to evaluate the efficacy of leukocyte filters for the retention of *L. (L.) infantum chagasi*. Twenty aliquots of whole blood were used in the research. The blood infection was performed at a ratio of 5 parasites/monocyte. The presence of parasites in the infected blood and maintained in the Schneider culture for 14 days was confirmed through culturing and analysis of smears stained with May Grunwald – Giemsa, on samples collected before and after blood filtration. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows version 19.0; performed T tests, considered a significance level lower than 0.05 and checked agreement between observations, through Kappa. The average score of promastigotes in culture before filtration was 70,500 parasites/mL and, after filtration, 19,500, showing significant statistically reduction ( $p=0.002$ ). In the analysis of smears, rare parasites were identified after filtration. The study identified leukocyte filters capacity for the retention of *leishmania*.

**Keywords:** Leukocyte filters. Transfusion. Visceral leishmaniasis.

### INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is considered one of the most neglected tropical diseases in the world, with 90% of the cases concentrated in Brazil, Bangladesh, Ethiopia, India, Sudan and South Sudan. It is a serious disease with a high fatality rate; in 2013, 10% of the cases registered in Brazil evolved to death (1, 2).

In endemic areas, approximately one in eighteen people infected develops the classic disease many evolve asymptomatic. The host immune response is crucial in this evolution (3, 4).

The prevalence of *leishmania* infection in asymptomatic blood donors has been documented in several countries (5-8). In Brazil, the endemic region of Natal (RN), about 9% of researched blood donors tested positive for the Elisa method. In Montes Claros (MG), was obtained 5.5% of positivity in the indirect immunofluorescence reaction for *L. (L.) infantum chagasi* in candidates for blood donation (9, 10).

Some studies indicate transfusion as probable way of VL transmission; however, it is not discarded the possibility trough vector (11-17). Survival of amastigotes in intentionally infected blood products and stored under the usual conditions of the blood banks reinforces the need to clarify this risk. Currently, there is not a strategy directed to preventing LV transmission by way of transfusion. *Leishmania* is an obligate intracellular parasite that occasionally may be present in the peripheral blood and infect monocytes (12, 17).

Current Leukocyte filters are capable of retaining 99.99% of the leukocytes present in the blood products. The blood filtration (leukodepletion) is recommended in Brazil to prevent FNHTR, alloimmunization HLA, GVHD, platelet refractoriness, immunomodulatory effects. The most consistent utilization for elimination of pathogens has been to prevent transmission of cytomegalovirus; its ability to retain HTLV and *Epstein-Barr* virus is also documented in the literature. Other applications such as retention of bacteria, *Trypanosoma*, *Leishmania* and infectious prions have been cited in a few studies and should be established (18-20).

This study aimed to evaluate the efficacy of leukocyte filters for the retention of *L. (L.) infantum chagasi*.

## METHODOLOGY

Was held an experimental study, quantitative, which collection and processing of the samples occurred in the period from March to June 2015, in the Hemominas Foundation, in the Biology of the Cell Interactions laboratory of the Institute of Biological Sciences (ICB) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and in the University Teaching Hospital Clemente Farias of the State University of Montes Claros (UNIMONTES). Were included in the study blood bags with insufficient volume for transfusional that would be discarded. Exclusion criteria established were: volume lower blood bag volume lower than 150 ml, positive blood bank serology, lipemic aspect, the presence of any drilling, leak or apparent clots. Before selecting the sample, it was made the filter validation that would be used in

research and prepared the = cultivation of the necessary parasites for continuation of the other stages of this work as described below.

This study was approved by the Ethics Committee in Research of Hemominas Foundation, through Brazil Platform, under No. 62668.

#### Filter Validation

To check the effectiveness of leukocyte retention by the filter bench marks Fresenius Kabi 01 plus was performed filtering procedure of whole blood low volume (<than 300 ml). The procedure lasted two minutes; the filter retained 35 mL of blood and decreased of 99.96% of the leukocytes of the tested sample. The leukocytes counting was performed in an automatic counter in the initial sample and, after filtration, in the Nageotte chamber. The procedure was performed in the Hemominas Foundation.

#### Selection of whole blood bags

After checking the amount of blood that was retained in the filter, for better procedures standardization of the study, it was defined 40 mL as standard volume of each bag. In the period from 03/2015 to 04/2015, low-volume bags and negative blood bank screening serology were fractionated in sterile connection, to obtain the standard volume until complete the number of 20 aliquots. Ten bags passed through the infection procedure and ten were uninfected, they were used as control samples.

#### Separation of the cell population

In one ml of whole blood is estimated to contain  $1 \times 10^6$  cells. Monocytes represent about 5% of the cellular population, thus it is believed that in each mL of blood are approximately  $0,5 \times 10^5$  monocytes. Therefore, in 40 mL blood bag, it is estimated the presence of  $20 \times 10^5$  monocytes. The presence of monocytes (target cells for infection) in the samples was crucial for the continuation of research, because of *Leishmania* is an obligate intracellular parasite monocytic phagocytic system. To verify if the time between the blood collection and processing would not make unviable the material, due to the destruction of monocytes, the samples were read on the cytometer flow (FACSCanto II Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA) after 72h and 96h of storage and was observed the presence of monocytes.

#### Cultivation of parasites and infection



To make the blood infection, it was carried out the cultivation of parasites. The parasites used in the experiments were from the species *L. (L.) Infantum chagasi*, cultivated in the Schneider culture (Sigma-Aldrich) and maintained in hothouse of biochemical oxygen demand (BOD) (Tecnal) at  $\pm 24^{\circ}\text{C}$  until get to the infective metacyclic stage, ie, from the 6th day of culture. Frequent raises were made until the obtainment of the parasites number required for *in vitro* infection. The number of parasites present in the culture flask was counted in hemocytometer through optical light microscope.

The infection procedure was performed, according to the ratio of five parasites/monocyte totaling  $1 \times 10^7$  parasites per bag of 40mL. Later, infected blood bags and the control samples were kept in overnight culture, humid hothouse, with 5%  $\text{CO}_2$ .

### Filtration

After the cultures were kept overnight, it was continued with the filtration process of whole blood through the leukocytes filter for bench RBCs , BIO R01 plus from the brand Fresenius Kabi. These filters are made of polyester fibers and have pores whose diameter ranges from 5 to 50  $\mu\text{m}$  in diameter. The average time for filtration of each bag was 2 minutes; an aliquot was withdrawn from the blood samples before and after the filtration for analysis of the infection. Two mL of the filtered blood were placed in equal volume in the Schneider culture and maintained in an hothouse BOD for 14 days.

### Infection analysis before and after filtration

The 10 samples infected by *L. (L.) infantum chagasi* and the control samples, in equal numbers, were evaluated by the method of culture, after culture in Schneider (Sigma-Aldrich) for 14 days. It was realized the counting of the number of parasites in the hemacytometer, before and after the filtration of the blood, through optical microscopy. To prevent red blood cells to preclude the best view of the parasites, it was made to the lysis of red blood cells with commercial lysis solution (BD) before counting in hemocytometer.

The separation of the cell population, parasite culture, infection, filtration and analysis of infected blood culture before and after the filtration procedures were performed in the ICB (UFMG).

Another method used for analysis of infection was the direct research of the parasite in slides prepared with swabs of the infected samples before and after filtration. The slides were

stained in May Grunwald - Giemsa and submitted to analysis by two observers hematologists at the State University of Montes Claros (UNIMONTES), through optical light microscopy, Nikon Eclipse E200 microscope. There were counted 100 fields with 100 time magnification and found positive samples that had the presence of at least one parasite.

## RESULTS

The cytometry flow documented the presence of monocytes in the 3 whole blood samples stored for 72h and 96h after collection (Figure 1). The maximum time recorded between the collection and the process of blood infection was 72h. It was also shown by the cytometric flow sharp reduction of the cell population (including monocytes) in the whole blood after filtration (Figure 2).

Before filtration, the counting by hemocytometer recorded on average  $70,500 \pm 37,524$  parasites/mL of infected blood and, after filtration, was reduced to  $19,500 \pm 14,033$  parasites/mL, a statistically significant reduction ( $p=0.02$ ) (Chart 1) .

Stained smears using the May Grunwald - Giemsa staining of infected samples before filtration process showed amastigotes structures in 10 samples for the first viewer and 9 samples for the second viewer. After filtration, the material was again stained and the smears examined by two hematologists observers. The first observer found rare amastigotes in the material examined by counting 100 fields through optical microscopy in five of the ten samples evaluated. The second observer considered the research positive in four samples. Both recorded the perception that it was necessary insistent search for the rare encounter of amastigotes in these materials after filtration. There was 80% agreement verified through the Kappa, between the results of these evaluators. The ten control samples (uninfected) had negative culture for *Leishmania* before and after filtration of blood.

## DISCUSSION

The interest of clarifying the value of leukodepletion as possible method to retain *Leishmania* stimulated this study that showed significant reduction of this parasite infected blood after filtration with high parasite load.

It has been discussed in a few papers in the literature the need to clarify the potential risk of transfusional transmission of VL. Findings of positive serology, molecular tests and/or culture positive for *Leishmania* in asymptomatic blood donors have been documented in Italy,

France, Spain, Brazil (5-9). Some cases of VL, probable transfusional transmission have also been reported in India, France, China, Greece, (11,15,16,21).

For the prevention of visceral leishmaniasis, current measures aimed the elimination of sick dogs and vectors have not been sufficient. The spread and severity of this neglected disease that deserves greater efforts to control it, determine the importance of researches that aim the reducing its prevalence in our environment. Thus, this work instigates reflection on other forms of transmission and prevention of this pathology.

The evolution to the classical disease after infection depends on the immune response of the recipient. Immunocompetent people often develop asymptomatic and in effect of immunosuppression, develop clinical signs. The presence of parasites in asymptomatic people for several years, reported in some papers, serves to alert possible silent transfusional transmission of *Leishmania* (3, 4).

The increased number of cases of VL in Iraq and Afghanistan, where American soldiers contracted the disease, motivated restriction of blood donation for one year for all US soldiers who have been in those countries. There is no consistent policy to prevent this way of transmission adopted in most countries of the world (12).

Brazilian law defines as mandatory the performance of high sensitivity laboratory tests in each donation to detect syphilis, Chagas, hepatitis B and C, HIV and HTLV 1 and 2. Measures for the prevention of malaria in endemic areas and CMV are also recommended. The measures provided for in relation to the VL in clinical screening of blood donors are the ultimate inability to donate blood or sick individuals who had kalazar, beyond the physical examination for donor exclusion and hepatomegaly and/or fever (18).

The use of leukocytes filter in Brazil is recommended to prevent FNHTR, prophylaxis of leukocyte alloimmunization in patients to receive multiple transfusions, prevention of CMV infection (18). The universal filtration of blood components has been a security policy adopted in some countries, however, it is wide discussion and has not been a practice in most of the world (22, 23). It's worth here the weighted reflection on the evidences of the benefits and the added costs that will absorb significant amount of the budget often reduced to numerous health issues still precarious. In the USA, a research published by members of AABB ponders the importance of better study of these costs (24). However, it can not disregard the evidence that some pathogens not screened in routine can mean risk to blood recipients and the filtration of the blood has been shown to reduce certain risks, such as CMV,

Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), HTLV, and little evidence recorded for efficacy for bacteria and parasites (24).

The significant reduction of *Leishmania* after filtration (bedside filters) of blood intentionally infected blood has been documented in the literature. This study also confirmed the survival of this parasite in concentrates unfiltered red blood cells stored in the refrigerator. In the plasma stored frozen, no *Leishmania* was verified after storage (25). In this study were infected low-volume blood bags, which would not be used for transfusion. Filtration was done with Bio R 01 plus Fresenius Kabi bench filters. There was a statistically significant reduction of parasites after filtration of the infected samples and control samples (uninfected) remained negative.

The exact mechanisms by which filters remove leukocytes from blood components represent a combination of physical and biological processes. The mechanical imprisonment (sieving) depends on the pore size and the cells deformability and allows the retention of particles larger than 30  $\mu\text{m}$ . The physicochemical imprisonment (or grip) removes particles smaller than 1  $\mu\text{m}$ . The retention of particles from 1 to 30  $\mu\text{m}$  is by joint action of the two mechanisms. The filters also have multiple layers of different pore diameters responsible for a depth filtration, which allows the blood components passage and effective retention of leukocytes present in the blood (26, 27). The ability to retain smaller particles than the pores was more attractive for execution of this project. The filters used in this study are from third generation, they have pore diameters from 5 to 50  $\mu\text{m}$  and effectiveness in retaining leukocytes of approximately 99.96%.

The implementation of other methods, such as serological screening, in addition to high cost and lack of better technical definition for screening in asymptomatic, interfere in a direct way in the blood storage, which can compromise compliance with the transfusion demands. The performance of PCR as a screening method, in addition to high cost, can result in positive by the presence of the parasite fragments, what does not mean risk of progression to disease.

One of the limits of this study is the high parasitic load used to ensure infection of the blood and allow for analysis of *Leishmania* retention capacity. It is not expected to find parasitaemia in usual infected asymptomatic. Through chronic carrier state with low parasitic load will be able to infect a blood receiver? Will be sufficiently retention capacity of *Leishmania* demonstrated by leukocytes filter through low parasitaemia?

It stress, so that the use of leucocyte filter, beyond being beneficial to avoid adverse reactions is a method that preserves the original validity of blood components and does not disrupt the blood storage.

## CONCLUSION

Further studies to determine the real risk of VL transmission will be decisive to indicate the need to implement transfusion measures security for this purpose.

The leukocyte filter capacity to retain *leishmania* was demonstrated by measuring significant reduction of this parasite after blood filtration with high parasite load.

## REFERENCE

1. WHO. Leishmaniasis Situation and trends. 2015 [cited 2015 05 nov]; Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
2. BRASIL. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013 [cited 2015 05 nov]; Available from: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>.
3. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 2014;6:147-154.
4. Badaro R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1989. Rev Soc Bras Med Trop. 1988;21(4):159-64.
5. Colomba C, Saporito L, Polara VF, Barone T, Corrao A, Titone L. Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy). Transf Apher Sci. 2005;33(3):311-4.
6. Scarlata F, Vitale F, Saporito L, Reale S, Vecchi VL, Giordano S, et al. Asymptomatic *Leishmania infantum*/chagasi infection in blood donors of western Sicily. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102(4):394-6.
7. Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aueuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1953-7.
8. Riera C, Fisa R, Udina M, Gallego M, Portus M. 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. 2004;98(2):102-10.
9. Luz KG, da Silva VO, Gomes EM, Machado FC, Araujo MA, Fonseca HE, et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. Am J Trop Med Hyg. 1997;57(2):168-71.
10. Urias EVR, Carvalho SFG, Oliveira CL, Carvalho MdLM, Teles LF, Rodrigues MC, et al. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Rev Bras. Hematol. e Hemoter. 2009;31(5):348-54.
11. Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. Indian J Med Microbiol. 2006;24(3):165-70.
12. Cardo LJ. *Leishmania*: risk to the blood supply. Transfusion. 2006;46(9):1641-5.
13. Mathur P, Samantaray JC. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. Transfus Med. 2004;14(4):319-21.

14. Bogdan C., Schowan G, Bafius AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, et al. Visceral Leishmaniasis in a German Child Who Had Never Entered a Known Endemic Area: Case Report and Review of the Literature. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001; 32(2): 302-6
15. Cayla A, Perrot R, Marques, Leyrat. A case of kala azar caused by blood transfusion in an 8-month old infant; presence of Leishmania in the blood; recovery. *Arch Fr Pediatr*. 1957;14(7):732-4.
16. Chung HL, Chow KK, Lu JP. The first two cases of transfusion Kala-azar. *Clin Med J*. 1948;66:325-26.
17. Grogl M, Daugirda JL, Hoover DL, Magill AJ, Berman JD. Survivability and infectivity of viscerotropic Leishmania tropica from Operation Desert Storm participants in human blood products maintained under blood bank conditions. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(3):308-15.
18. Brasil. Ministério da Saude [Internet]. Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013. Diário oficial da união Nº2212013. p. 106. [citado 20 Nov 2015] Disponível em: [http://www.hemominas.mg.gov.br/images/doacao\\_sangue/portaria\\_2712\\_de\\_12\\_novembro\\_2013.pdf](http://www.hemominas.mg.gov.br/images/doacao_sangue/portaria_2712_de_12_novembro_2013.pdf).
19. Ikejima H, Friedman H, Leparc GF, Yamamoto Y. Depletion of resident Chlamydia pneumoniae through leukoreduction by filtration of blood for transfusion. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4580-4.
20. Gregori L, McCombie N, Palmer D, Birch P, Sowemimo-Coker SO, Giulivi A, et al. Effectiveness of leucoreduction for removal of infectivity of transmissible spongiform encephalopathies from blood. *Lancet*. 2004;364(9433):529-31.
21. Mpaka MA, Daniil Z, Kyriakou DS, Zakyntinos E. Septic shock due to visceral leishmaniasis, probably transmitted from blood transfusion. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3(6):479-83.
22. Sharma RR, Marwaha N. Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries. *Asian J Transfus Sci*. 2010;4(1):3-8.
23. Wortham ST, Ortolano GA, Wenz B. A brief history of blood filtration: clot screens, microaggregate removal, and leukocyte reduction. *Trans Med Rev*. 2003;17(3):216-22.
24. Dzik S, Aubuchon J, Jeffries L, Kleinman S, Manno C, Murphy MF, et al. Leukocyte reduction of blood components: public policy and new technology. *Transfus Med Rev*. 2000;14(1):34-52.
25. Cardo LJ, Salata J, Harman R, Mendez J, Weina PJ. Leukodepletion filters reduce Leishmania in blood products when used at collection or at the bedside. *Transfusion*. 2006;46(6):896-902.
26. Pietersz RN, van der Meer PF, Seghatchian MJ. Update on leucocyte depletion of blood components by filtration. *Transfus Sci*. 1998;19(4):321-8.
27. Bruil A, Beugeling T, Feijen J, van Aken WG. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfus Med Reviews*. 1995;9(2):145-66.

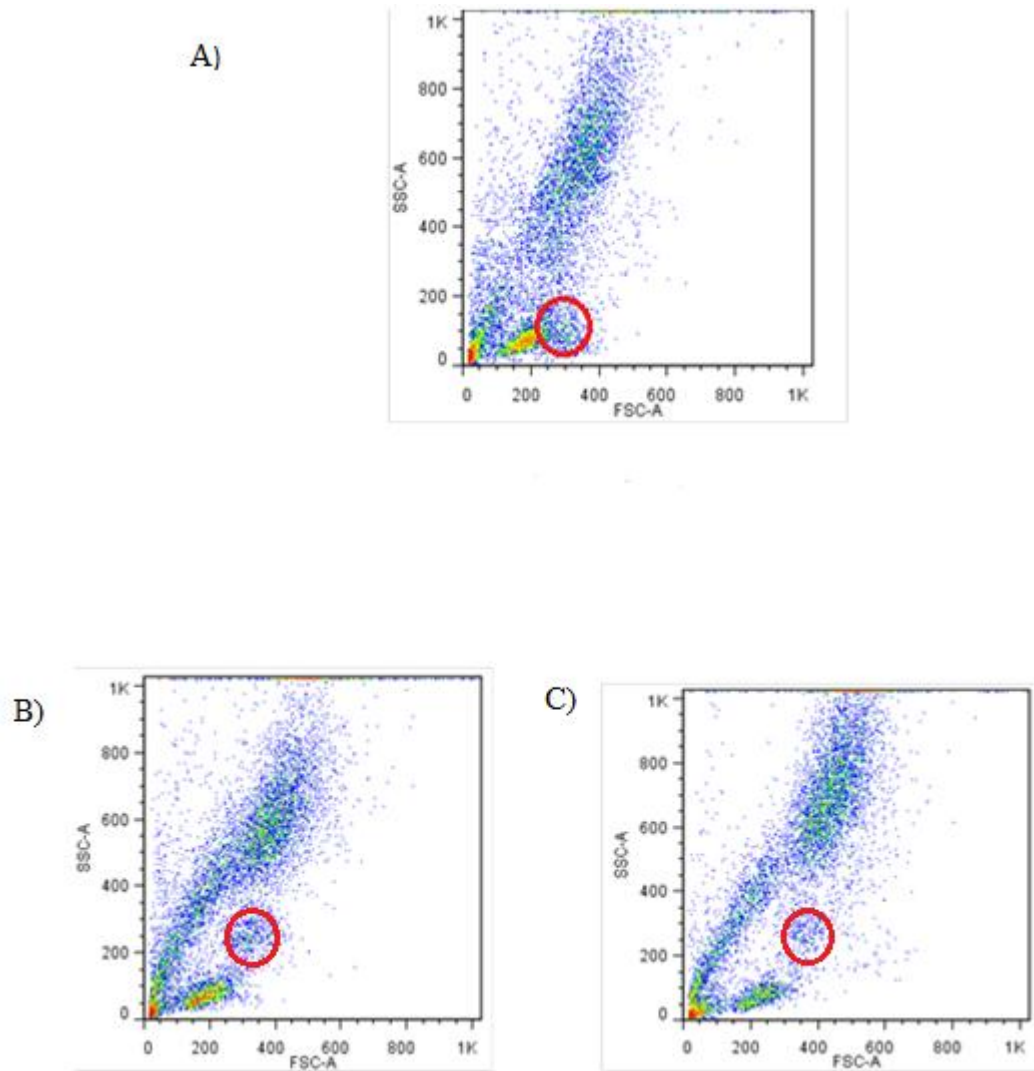


Figure 1. A) Cytometry flow of blood cells flow before filtration b) Sample refrigerated for 72 hours C) Sample refrigerated for 96 hours. A, B, C - Presence of monocytes marked area.

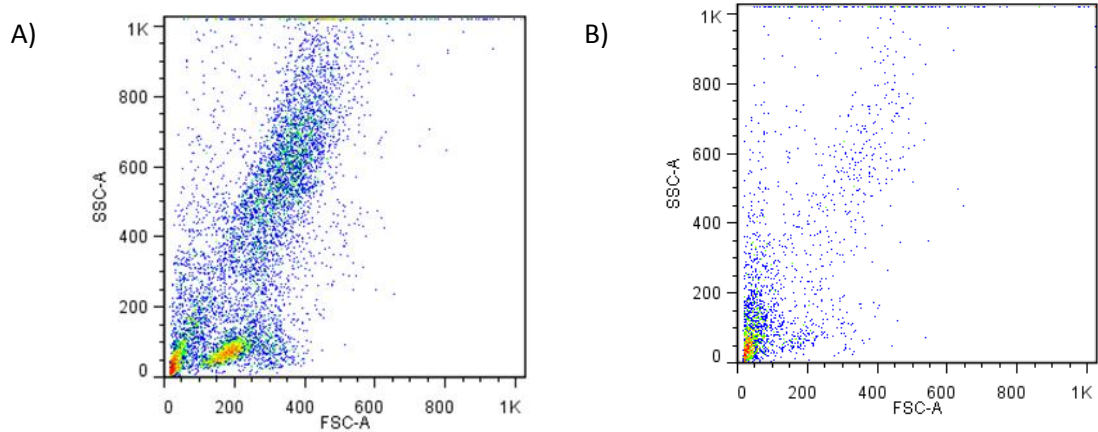
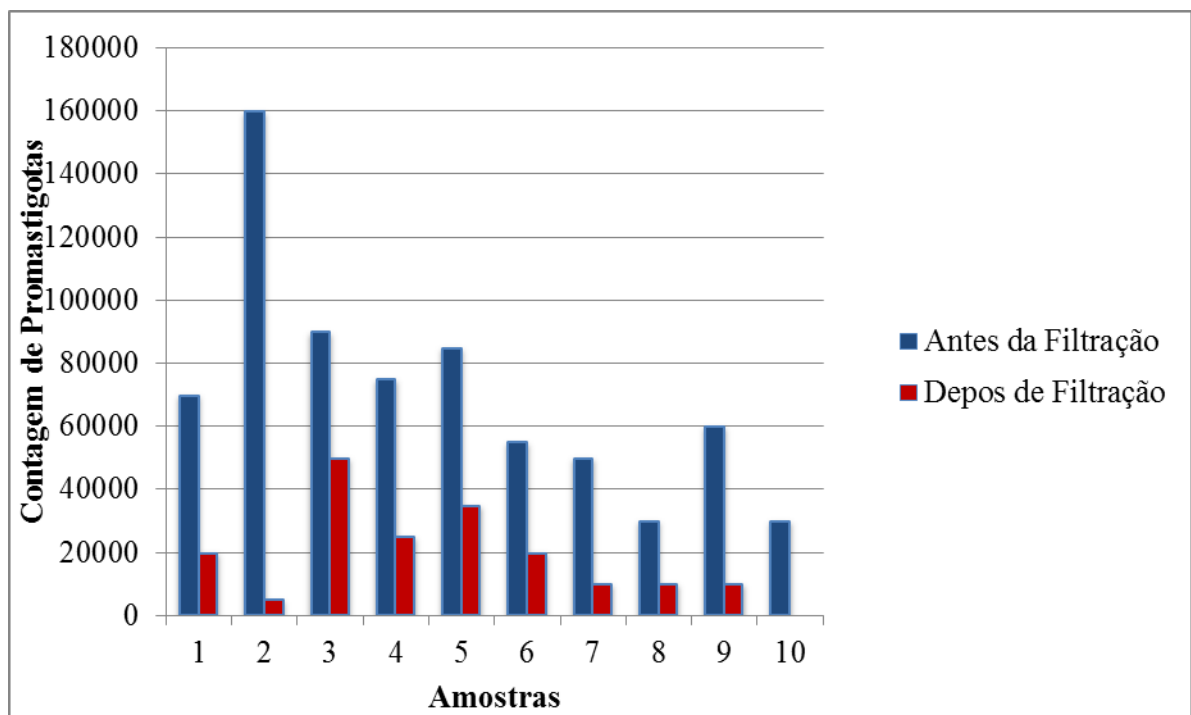


Figure 2. A) Cytometry flow shows the cell population of the whole blood sample prior to filtration B) Cell population with a significant reduction after filtration of whole blood.

Graph 1: Parasite count before and after filtration through hemocytometer of the infected samples





## 5- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Para a prevenção da leishmaniose visceral, as medidas atuais voltadas para a eliminação de cães doentes e dos vetores não têm sido suficientes. A disseminação e a gravidade desta doença negligenciada, que merece maiores esforços para seu controle, determinam a importância de pesquisas que visem reduzir a sua prevalência em nosso meio. Diante disso, este trabalho instiga reflexão sobre outras formas de transmissão e prevenção desta patologia.

Maiores estudos que determinem o risco real de transmissão de LV serão decisivos para subsidiar a política de segurança transfusional. A implantação de outros métodos, como triagem sorológica nos bancos de sangue e PCR além de alto custo, e falta de definição da melhor técnica para triagem em assintomáticos, interfere de maneira direta nos estoques de sangue, o que pode comprometer o atendimento às demandas transfusionais.

Apesar da significativa redução de *L.(L.) infantum chagasi* verificada após filtração, a atual geração de filtros não eliminou por completo este parasito mediante alta carga parasitária utilizada, neste estudo, para contaminar o sangue. Este achado estimula inovações para aprimorar a performance de filtros de leucócitos com o fim de reter diversos patógenos, inclusive leishmanias.

Não tem sido habitualmente demonstrada parasitemia em assintomáticos infectados e nem mesmo em doentes com leishmaniose. Este fato nos permite considerar que a significativa redução de leishmanias proporcionada pela filtração seja suficiente mediante baixa carga parasitária.

Decisões ponderadas sobre as vantagens da leucodepleção universal precisam estar aliadas a estudos dos custos agregados que irão absorver e que competirão com inúmeras questões de saúde ainda precárias. Porém, não se pode negligenciar o conhecimento dos grandes benefícios deste procedimento para evitar reações adversas relacionadas à transfusão, além de não impactar nos estoques de sangue.

Este estudo reforça a capacidade de filtros de leucócitos de reter *L.(L.) infantum chagasi* ao revelar significativa redução deste parasito após filtração de sangue contaminado.

## REFERÊNCIAS

1. WHO. Leishmaniasis Situation and trends. 2015 [citado 05 nov 2015]; Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [Internet]. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2006. 120 p. [citado 05 nov 2015] Disponível em [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_viscerar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerar.pdf)
3. Brasil. Ministério da saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013 [citado 05 nov 2015]; Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>.
4. Brasil. Ministério da saúde. Leishmaniose Visceral - Casos confirmados notificados no Sinan Net. 2004 [citado 05 nov 2015]; Disponível: [drt2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/leishvi/bases/leishvbrnet.def](http://drt2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/leishvi/bases/leishvbrnet.def).
5. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1986 Dec;154(6):1003-11.
6. Badaro R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1989. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988;21(4):159-64.
7. Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1953-7.
8. Colomba C, Saporito L, Polara VF, Barone T, Corrao A, Titone L. Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy). *Transfus Apher Sci.* 2005 Nov;33(3):311-4.
9. Scarlata F, Vitale F, Saporito L, Reale S, Vecchi VL, Giordano S, et al. Asymptomatic *Leishmania infantum*/chagasi infection in blood donors of western Sicily. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(4):394-6.
10. Riera C, Fisa R, Udina M, Gallego M, Portus M. 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.* 2004;98(2):102-10.
11. Riera C, Fisa R, Lopez-Chejade P, Serra T, Girona E, Jimenez M, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion.* 2008;48(7):1383-9.
12. Luz KG, da Silva VO, Gomes EM, Machado FC, Araujo MA, Fonseca HE, et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57(2):168-71.
13. Urias EVR, Carvalho SFG, Oliveira CL, Carvalho MdLM, Teles LF, Rodrigues MC, et al. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(5)
14. Chung HL, Chow KK, Lu JP. The first two cases of transfusion Kala-azar. *Clin Med J.* 1948;66:325-26.
15. Cayla A, Perrot R, Marques, Leyrat. A case of kala azar caused by blood transfusion in an 8-month old infant; presence of *Leishmania* in the blood; recovery. *Arch Fr Pediatr.* 1957;14(7):732-4.
16. Mathur P, Samantaray JC. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. *Transfus Med.* 2004;14(4):319-21.


17. Cohen C, Corazza F, De Mol P, Brasseur D. Leishmaniasis acquired in Belgium. *Lancet*. 1991;338(8759):128.
18. Mpaka MA, Daniil Z, Kyriakou DS, Zakyntinos E. Septic shock due to visceral leishmaniasis, probably transmitted from blood transfusion. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3(6):479-83.
19. Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol*. 2006;24(3):165-70.
20. Cummins D, Amin S, Halil O, Chiadini PL, Hewitt PE, Radley-Smith R. Visceral leishmaniasis after cardiac surgery. *Arch Dis Child*. 1995;72(3):235-6.
21. Cardo LJ. Leishmania: risk to the blood supply. *Transfusion*. 2006;46(9):1641-5.
22. Grogl M, Daugirda JL, Hoover DL, Magill AJ, Berman JD. Survivability and infectivity of viscerotropic *Leishmania tropica* from Operation Desert Storm participants in human blood products maintained under blood bank conditions. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(3):308-15.
23. Cardo LJ, Salata J, Wilder D. Removal of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells from whole blood by leukoreduction filters. *Transfusion*. 2009;49(2):337-46.
24. Cervia JS, Sowemimo-Coker SO, Ortolano GA, Wilkins K, Schaffer J, Wortham ST. An overview of prion biology and the role of blood filtration in reducing the risk of transfusion-transmitted variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Transfus Med Rev*. 2006;20(3):190-206.
25. Jimenez-Marco T, Riera C, Fisa R, Girona-Llobera E, Seden M, Goodrich RP, et al. The utility of pathogen inactivation technology: a real-life example of *Leishmania infantum* inactivation in platelets from a donor with an asymptomatic infection. *Blood Transfus*. 2012;10(4):536-41.
26. Brasil. Ministério da saúde. Guia para uso de hemocomponentes, 2015. [citado 18 Nov 2015] Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_uso\\_hemocomponentes\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_uso_hemocomponentes_2ed.pdf)
27. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada nº 34. 2014. [citado 22 Nov 2015] Acessado em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0fae1580484d56a5a53aa5bdc15bfe28/RDC\\_34\\_11\\_06\\_2014.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0fae1580484d56a5a53aa5bdc15bfe28/RDC_34_11_06_2014.pdf?MOD=AJPERES)
28. Brasil. Ministério da saúde. Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013. Diário oficial da união nº2212013. p. 106. [citado 20 Nov 2015] Disponível em: [http://www.hemominas.mg.gov.br/images/doacao\\_sangue/portaria\\_2712\\_de\\_12\\_novembro\\_2013.pdf](http://www.hemominas.mg.gov.br/images/doacao_sangue/portaria_2712_de_12_novembro_2013.pdf).
29. Estado de Minas Gerais. Secretaria do Estado de Saúde. Fundação Hemominas. Conduta para prática clínica hemoterapia. 2010. [citado 20 nov 2015] Disponível em <http://hemominas.mg.gov.br/publicacoes/file/251-hemoterapia-condutas-para-a-pratica-clinica>
30. Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA. Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood*. 1994;84(6):1703-21.
31. Wortham ST, Ortolano GA, Wenz B. A brief history of blood filtration: clot screens, microaggregate removal, and leukocyte reduction. *Transfus Med Rev*. 2003;17(3):216-22.
32. Eastman RT, Barrett LK, Dupuis K, Buckner FS, Van Voorhis WC. *Leishmania* inactivation in human pheresis platelets by a psoralen (amotosalen HCl) and long-wavelength ultraviolet irradiation. *Transfusion*. 2005;45(9):1459-63.
33. Estado de Santa Catarina. Secretaria de Estado da Saúde. Guia de orientação para vigilância de Leishmaniose visceral canina (LVC), 2013 [citado 23 nov 2015] Disponível em: [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia\\_Basico\\_de\\_Orientacao\\_Leishmaniose\\_Visceral\\_Canina.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_Leishmaniose_Visceral_Canina.pdf)

34. Lainson R, Shaw JJ. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. *Ciênc. cult.* (São Paulo); 1992; 44: 94-106.
35. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006;101(5):577-9.
36. Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010;1(2):13-32.
37. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7:338-49.
38. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle Leishmaniose Visceral, 2014 [citado 15 nov 2015]; Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral\\_1edicao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf)
39. Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *Hospital*, 47: 75-87, 1985.
40. Sherlock IA. Há especificidade dos flebotomínios para as leishmanias? *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30:151-5.
41. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6:147-54. Epub 2014/05/17.
42. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV, 2011. [citado 20 nov 2015]; Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_recomendacoes\\_pacientes\\_leishmania.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_pacientes_leishmania.pdf)
43. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Bolso - Doenças infecciosas e parasitárias. 8ª Edição revista, 2010. [citado 20 nov 2015]; Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_infecciosas\\_parasitaria\\_guiabolso.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guiabolso.pdf)
44. Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(3):321-4.
45. Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN, et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol. Serv. Saude*. 2008;17:107-16.
46. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Cascio A. Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? *Travel Med Infect Dis*. 2014;12(6 Pt A):617-27.
47. Bogdan C, Schonian G, Banuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, et al. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Clin Infect Dis*. 2001;32(2):302-6.
48. Andre R, Brumpt L, Dreyfus B, Passelecq A, Jacob S. Cutaneous leishmaniasis, cutaneous-ganglionic leishmaniasis, and transfusional kala-azar]. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*. 1957;73(25-26):854-60.
49. Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, Antunes CM, et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(5):421-7.
50. Silva LA, Romero HD, Nogueira Nascentes GA, Costa RT, Rodrigues V, Prata A. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):261-6.

51. Cardo LJ, Salata J, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci.* 2007;37(2):131-7.
52. Cardo LJ, Salata J, Harman R, Mendez J, Weina PJ. Leukodepletion filters reduce *Leishmania* in blood products when used at collection or at the bedside. *Transfusion.* 2006;46(6):896-902.
53. Singh S, Kumar A. Leukocyte depletion for safe blood transfusion. *Biotechnol J.* 2009;4(8):1140-51.
54. Sharma RR, Marwaha N. Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries. *Asian J Transfus Sci.* 2010;4(1):3-8
55. Bruil A, Beugeling T, Feijen J, van Aken WG. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfus Med Rev.* 1995;9(2):145-66.
56. Dzik S. Leukodepletion blood filters: filter design and mechanisms of leukocyte removal. *Transfus Med Rev.* 1993;7(2):65-77.
57. Gérard E, Bessy E, Salvagnini C, Rerat V, Momtaz M, Hénard G. Surface modifications of polypropylene membranes used for blood filtration. *Polymer.* 2011;52(5):1223–33.
58. Pietersz RN, van der Meer PF, Seghatchian MJ. Update on leucocyte depletion of blood components by filtration. *Transfus Sci.* 1998;19(4):321-8.
59. Muylle L, Peetermans ME. Effect of prestorage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates. *Vox Sang.* 1994;66(1):14-7.
60. Muylle L, Wouters E, De Bock R, Peetermans ME. Reactions to platelet transfusion: the effect of the storage time of the concentrate. *Transfus Med.* 1992;2(4):289-93.
61. Wang RR, Triulzi DJ, Qu L. Effects of prestorage vs poststorage leukoreduction on the rate of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelets. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(2):255-9.

## ANEXOS

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética da Fundação Hemominas via Plataforma Brasil

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG 

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da eficácia do uso de filtro de leucócitos para retenção de leishmanias (leishmania) chagasi.

**Pesquisador:** elaine veloso rocha unias

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 27633314.8.0000.5118

**Instituição Proponente:** FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 620.668

**Data da Relatoria:** 03/04/2014

## Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de Doutorado enquadrado metodologicamente como estudo analítico, transversal e quantitativo no qual pretende-se mensurar qual a capacidade de retenção de leishmanias por filtros de leucócitos em sangue total de baixo volume que seria destinado ao descarte.

## Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia do uso de filtro de leucócitos para retenção de leishmania (leishmania) chagasi.

## Objetivo Secundário:

- Mensurar a capacidade de retenção de leishmanias presentes no sangue através do uso de filtros de leucócitos de bancada e de beira de leito.
- Avaliar os resultados moleculares e parasitológicos para LV nos produtos antes e após a filtração.
- Subsidiar definição política de segurança transfusional relacionada a transmissão de LL.chagasi

## Avaliação dos Riscos e Benefícios:

## Riscos

Dada a característica do desenho da pesquisa são reduzidas as implicações éticas no entanto deve-se pontuar a manipulação de material biológico de doadores de sangue.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 301

Bairro: Santa Hilgênia

CEP: 30.130-110

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)248-4537

Fax: (31)248-4500

E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

SIGED

Página 01 de 05



00023622 2321 2014

Ante abaixo o número do SIPRO

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG



Continuação do Parecer: 620.668

**Benefícios**

Esta pesquisa poderá futuramente subsidiar definição estratégica sobre a política de segurança transfusional relacionada a transmissão de I.I.chagasi.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa mostra-se cientificamente relevante com cronograma e execução plausíveis.

O protocolo propõe o uso de bolsas de sangue com sorologia negativa que por ventura já estariam destinadas ao descarte, assim sendo avalia-se como reduzidas as implicações éticas advindas do protocolo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foi apresentada justificativa para dispensa do TCLE.

**Recomendações:**

Recomenda-se a alteração dos critérios de exclusão retirando a informação de que bolsas com sorologia positiva serão retiradas do estudo, uma vez que somente bolsas com sorologia negativa serão disponibilizadas para o uso no protocolo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O protocolo de pesquisa assim como apresentado atende os requisitos éticos da Resolução 466/12 e pode ser considerado aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Alameda Ezequiel Dias, 321

**Bairro:** Santa Efigênia

**CEP:** 30.130-110

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)248-4587

**Fax:** (31)248-4600

**E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG



Continuação do Parecer: 620.668

BELO HORIZONTE, 22 de Abril de 2014

Assinado por:  
Felipe Carlos Brito de Souza  
(Coordenador)

Comitê de Ética em Pesquisa  
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321  
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (313)248-4587 Fax: (313)248-4600 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br



## ANEXO B – Orientação de iniciação científica



Belo Horizonte, 02 de março de 2015

## DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que **Elaine Veloso Rocha Urias** orientou o estudante Igor Alcântara Pereira no projeto de pesquisa "Avaliação da eficácia do uso de filtro de leucócitos para retenção de *Leishmania (leishmania) chagasi*", através de Bolsa de Iniciação Científica da FAPEMIG (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica), equivalente ao período de 01/03/2014 a 28/02/2015, com carga horária de 20 horas semanais.



Marina Lobato Martins  
Coordenadora - Comissão Interna do Programa PIBIC  
Fundação HEMOMINAS

## ANEXO C – Normas do periódico

### Information for authors

## Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

### Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

The **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, ISSN 1516 8484, the official scientific publication of the Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, Associazione Italo-Brasiliana di Ematologia and Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica aims to promote scientific development in Hematology, Transfusion Medicine and related areas. All manuscripts, after initial acceptance by the editors, will be sent for analysis by two peer reviewers. Anonymity is guaranteed throughout the evaluation process. When considered necessary, a list of modifications will be sent to authors to correct their work or justify their decision not to do so.

The responsibility for opinions expressed in articles is solely of the authors.

Manuscripts should not be submitted simultaneously to more than one journal. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Reproduction, in full or partial, translated into other languages requires prior permission of the editors.

The journal publishes the following sessions: Original Article, Special Article, Review Article, Updates in the Specialty, Case report, Letter to the Editor, Images in Clinical Hematology, Editorial, Scientific Comment and What is the Evidence. Other types of publications of interest in the area will be published at the discretion of the editors. All manuscripts must be submitted in English.

#### PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

##### General information

For any manuscript to be evaluated, it must be accompanied by the following documentation:

- Conflict of interest: Situations that may improperly influence the development or the conclusions of the work such as participation in drug- or equipment-producing companies cited or used in the work, as well as competitors of these companies should be mentioned. Financial assistance, payments received for consultancies, relationships related to employment, etc. are also considered sources of conflict.
- Approval of the study by a Research Ethics Committee recognized by the National Research Ethics Committee (CONEP);
- Articles that deal with clinical research involving human beings must include a statement in the Methods Section that all study participants signed an informed consent form. Authors should also confirm that the study was conducted

in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2008;

- For works involving animal experimentation, the authors should confirm in the Methods Section that the study followed the rules contained in the Ethical Code for Animal Experimentation of the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) [WHO Chronicle 1985; 39 (2): 51-6] and the principles of the Brazilian College of Animal experimentation - COBEA ([www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)). Authors must complete the Declaration - Statement of Human and Animal Rights.

All randomized controlled trials and clinical trials submitted for publication must be registered in a clinical trials database. This is a guideline of the International Clinical TrialRegistry Platform (ICTPR) of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). The instructions for the registry are available at <http://www.icmje.org/clintrialup.htm> and registration can be attained in the Clinical Trials Database of the National Library of Medicine available at <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.

##### Technical requirements

1. **Article identification:** a) A concise however informative title; b) Complete names of authors without abbreviations and their institutions; c) Department and official name of the institution(s) to which the work should be attributed; d) Name, full address including telephone and e-mail of corresponding author; e) financial support (if any).
2. **Abstract and keywords:** Abstract in English of not more than 250 words. For Original Articles this should be structured with background, method, main results and conclusion. For the other article types, the abstract need not be structured but should contain information illustrating the importance of the work. Specify up to five keywords, which define the theme of the paper. The keywords should be based on MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine available at: <http://www.sgponline.com.br/rbhh/sgp/naveg/mesh.asp>. For clinical trials, indicate the International Clinical Trials Registry Number below the summary.
3. **Manuscript content:** **a) Original Article:** Used to publish the results of scientific research, it must be original and should comprise the following: Introduction, Objective, Method, Results, Discussion, Conclusion and References. The work should not exceed 4000 words (including references), up to 6 authors, up to 7 tables, illustrations and photos and up to 30 references; **b) Special Article:** With the same structure as original articles, Original Articles are reclassified by the Editor depending on their importance; **c) Review Articles:** narrative reviews addressing an important issue in the specialty. These articles should not exceed 5000 words (including references), a maximum of 7 tables,

Figures and Photos and up to 60 references; **d) Update in the Specialty:** on a theme, method, treatment, etc. It must contain a brief history of the topic, its current state of knowledge and the reasons for the work; study methods (data sources, selection criteria), hypotheses, study lines, etc., criteria similar to review articles; **e) Case Report:** should have an introduction with a brief literature review, a description of the case showing significant results for the diagnosis and differential diagnoses (if any), discussion or comments and references. It should not exceed 1800 words, two tables, illustrations and photographs, up to four authors and ten references; **f) Letters to the Editor:** a maximum of 1000 words (including references), three authors, and two illustrations; **g) Images in Clinical Hematology:** Maximum 100 words, two images, three authors and three references; **h) Scientific comments:** will only be accepted by invitation of the editors.

4. **Acknowledgements:** Should be addressed to collaborators who deserve recognition, but whose participation does not justify their inclusion as an author such as technical assistants, as well as financial support received.

5. **References:** References should always be numbered in the order they appear in the text. The format must be based on the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" guidelines proposed by the International Committee of Medical Journal Editors and updated in 2009, as follows: the titles of journals should be abbreviated following the List of Journals Indexed in Index Medicus of the National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Cite the first six authors after which add the words et al.

#### Examples of references: Printed documents

- **Journals:** Padley DJ, Dietz AB, Gastineau DA. Sterility testing of hematopoietic progenitor cell products: a single-institution series of culture-positive rates and successful infusion of culture-positive products. *Transfusion*. 2007;47(4):636-43.
- **Books:** Chalmers J. Clinician's manual on blood pressure and stroke prevention. 3rd ed. London: Science Press; 2002. 70 p. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection Diagnosis and Management. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd Editorial Offices; 1997. 249 p.
- **Book chapters:** F. Reyes. Lymphocyte differentiation. In P Solal-Céligny, N Brousse, F Reyes, C Gisselbrecht, B Coiffier. Non-Hodgkin's Lymphomas. Paris: Éditions Frison-Roche; 1993. p.19-29.
- **Annals:** Souza AM, Vaz RS, Carvalho MB, Arai Y, Hamerschilak N. Prevalência de testes sorológicos relacionados à hepatites B e não-A, não-B em doadores de sangue. In: 19º Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia / 26º Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2003 Ago 6-9; São Paulo, 2003. Anais. p.103.

- **Theses:** Sandes AF. Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritrocitária, granulocítica e megacariótica em pacientes com síndromes mielodisplásicas [thesis]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009. 126p.

#### Electronic documents

- **Articles in Periodicals:** Almeida ID, Coitinho AS, Juckowsky CA, Schmalfuss T, Balsan AM, Röhsig LM. Controle de esterilidade de produtos de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico. *Rev Bras Hematol Hemoterap* [Internet] 2010 [cited 2010 Jun 10]; 32(1):23-8. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n1/aop03010.pdf>

- **Books:** Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. Clinical methods. The history, physical, and laboratory examinations. 3rd ed. [Internet]. Boston: Butterworths; 1990. [cited 2010 Jun 10]. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cm>

- **Illustrations and photos:** Must have a resolution of at least 1000 dpi. Color figures should be in CMYK and will be published in color only if essential and must be in TIFF, JPEG or CDR format. Do not send the figures within the text.

- **Tables:** should be numbered consecutively using Arabic numerals and cited in the text in numerical order. If the table requires special symbols, it should be sent as a high resolution image (1000 dpi) in TIFF or JPG format.

#### SUBMISSION

The submission of the manuscript must be via the website of the Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, (Journal of Hematology and Hemoterap) [www.rbhh.org](http://www.rbhh.org). A copyright transfer form (available on the website) must be completed and signed by all authors and sent to the editorial office e-mail [brazilbloodjournal@yahoo.com.br](mailto:brazilbloodjournal@yahoo.com.br). When a manuscript is accepted for publication, the author(s) will be requested to complete a conflict of interest form which must be sent to the editorial office. It is the responsibility of authors to obtain written permission to reproduce any previously published data included in the manuscript.

The editors can publish papers that do not exactly follow the instructions after careful evaluation always taking into account the interests of the readership.

#### Correspondence address:

Fernando Ferreira Costa

Editor in Chief

Rua Carlos Chagas, 480