

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

DIEGO LINS GUEDES

**ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL EM PACIENTES CONVIVENDO COM HIV**

RECIFE
2021

DIEGO LINS GUEDES

**ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL EM PACIENTES CONVIVENDO COM HIV**

Tese apresentada ao Doutorado em
Biotecnologia e Biociências em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Zulma Maria de Medeiros

Coorientadora:

Prof.^a Dr.^a Valéria Pereira Hernandes

Recife

2021

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- G922c Guedes, Diego Lins.
Aspectos clínicos, imunológicos e transmissão da leishmaniose visceral em pacientes convivendo com HIV / Diego Lins Guedes. — Recife: [s.n.], 2021.
120 p. : 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) –Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021..
Orientadora: Zulma Maria de Medeiros;
coorientadora: Valéria Pereira Hernandez.
1. Leishmaniose visceral - transmissão. 2. Infecções por HIV - complicações. 3. Infecções por HIV - imunologia. 4. Leishmaniose visceral - complicações. 5. Coinfecção. 6. Biomarcadores. 7. Citocinas. 8. Citometria de Fluxo - métodos. 9. Brasil - epidemiologia. I. Medeiros, Zulma Maria de. II. Hernandez, Valéria Pereira. III. Título.

DIEGO LINS GUEDES

**ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL EM PACIENTES CONVIVENDO COM HIV**

Tese apresentada ao Doutorado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Data da aprovação: 02/07/2021

Banca Examinadora

Dr.^a Zulma Maria de Medeiros

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr.^a Milena de Paiva Cavalcanti

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Christian Robson de Souza Reis

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Marcelo Zaldini Hernandez

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael de Freitas e Silva

Universidade de Pernambuco

À minha esposa, Régia, e à minha filha, Tainá, por todo o apoio e compreensão durante esses quatro anos de doutorado – quatro anos de vida de Tainá.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Zulma Medeiros e Valéria Pereira, que de forma tranquila e profissional me guiaram durante este doutorado. Também a José Angelo Lindoso pelo suporte e orientação.

A todas as pessoas que fazem parte dos departamentos de parasitologia e de imunologia do Instituto Aggeu Magalhães, por todo o apoio. Em especial agradeço a: Amanda Vieira, Amanda Xavier, Beatriz Coutinho, Carolina Brelaz, Elis Dionísio, Gilberto Nunes, Mércia Cunha, Pablo Cantalice, Rafael Freitas, Rhaíssa Ramos, Wagner Tenório e Walter Lins – fundamentais em todos os momentos. E ao próprio Instituto Aggeu Magalhães por todo o apoio e pelo financiamento da pesquisa e das publicações.

A Johan van Griensven, por me receber como pesquisador visitante no Instituto de Medicina Tropical (ITM) em Antuérpia, Bélgica, e a todo o seu grupo pelo acolhimento e pelos conhecimentos compartilhados: Achilleas Tsoumanis, Julia Pollmann, Lieselotte Cnops, Saskia van Henten e Wim Adriansen. Agradeço também a todas as pessoas do ITM Antuérpia pelo acolhimento e pelas oportunidades que essa experiência proporcionou para o crescimento pessoal e profissional. E ainda à CAPES, pela oportunidade através da bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

Às amigas e amigos que ganhei durante meu período na Bélgica, e que tanto me apoiaram durante minha estadia por lá, em especial a Ana Chopo, Ana Ibarra-Meneses, Anne Hauner, Claudia Strambini, Deema Meshal, Jef Vanhamel, Nisse Marien e Tine D'haeyere. Ao amigo Josias Andrade, fundamental para que isso acontecesse (além de todo o apoio e conselhos), e à amiga Camila Leonel, por todo o apoio durante essa jornada.

Aos colegas em Petrolina, onde parte da pesquisa foi realizada, em especial a Alda Justo, Rodrigo Carmo e Samuel Ricarte, pelas suas fundamentais contribuições na coleta de dados para este projeto.

À todas as pessoas afetadas pela leishmaniose visceral, que confiaram e aceitaram participar deste estudo. Espero poder retribuí-las e contribuir para uma melhor prevenção, melhor diagnóstico e melhor tratamento, e para um futuro controle e eliminação dessa doença.

GUEDES, Diego Lins. **Aspectos clínicos, imunológicos e transmissão da leishmaniose visceral em pacientes convivendo com HIV**. 2021. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

A LV é a forma das leishmanioses mais associadas à infecção pelo HIV. O diagnóstico da LV em pessoas com HIV é dificultado, com maior frequência de resultados falso-negativos. Marcadores biológicos podem ter grande utilidade, com potencial para prever reativações da LV, guiar profilaxia pós-tratamento, ou ainda avaliar resposta terapêutica. Para o controle da LV é determinante a identificação dos casos de coinfeção LV-HIV em uma área endêmica, além da identificação de outros potenciais meios de transmissão. Dessa maneira, idealizamos este projeto de pesquisa em etapas: 1) discussão sobre a via sexual como potencial risco para transmissão da LV; 2) identificação de casos de LV em pessoas com HIV em uma área endêmica; 3) avaliação da citometria de fluxo como ferramenta complementar para o diagnóstico da LV em HIV positivos; e 4) análise de citocinas nos coinfectados LV-HIV. Identificamos a via sexual como potencial meio de transmissão em humanos, sendo já confirmada em animais como cães. A prevalência encontrada da coinfeção LV-HIV assintomática foi de 9,11% (44/483). A citometria de fluxo mostrou boa sensibilidade para diagnóstico da LV em HIV positivos (sendo superior inclusive a métodos sorológicos utilizados na prática clínica), e se mostrando uma potencial ferramenta diagnóstica nessa população. No grupo LV-HIV sintomático encontramos níveis aumentados de IL-17A e de IL-6. Não houve diferença nos níveis das citocinas avaliadas entre indivíduos LV-HIV assintomáticos e os controles saudáveis. São necessários estudos de seguimento desses pacientes coinfectados para que esses resultados possam ser melhor avaliados e correlacionados com achados clínicos, tratamento e desfecho.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; HIV; coinfeção.

GUEDES, Diego Lins. **Clinical and immunological aspects, and transmission of visceral leishmaniasis in patients living with HIV.** 2021. Thesis (PhD program of Biosciences and Biotechnology in Health) – Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz, Recife, 2021.

ABSTRACT

VL is the form of leishmaniasis most associated with HIV infection. When in coinfection with HIV, VL is more severe, with a lower cure rate and with a higher relapses rate when compared to cases in HIV-negative patients. The diagnosis of VL in HIV-positive individuals is also difficult, with a higher frequency of false-negative results. Biological markers might be useful, potentially predicting VL reactivations, guiding post-treatment prophylaxis, or even assessing therapeutic response. To detect VL-HIV coinfection cases in a VL endemic area, to identify other possible means of transmission, and to search new diagnostic tools are crucial aiming the control of VL. Thus, we designed this project in some stages: 1) discussion about the potential risk of sexual transmission of VL; 2) identification of VL cases in HIV-positive individuals in an endemic area; 3) evaluation of flow cytometry as a complementary tool for the diagnosis of VL in HIV-positive individuals; and 4) cytokine analysis in VL-HIV coinfecting individuals. We identified sexual intercourse as a potential way of transmission of VL in humans, which has already been confirmed in animals such as dogs. We found a prevalence of 9.11% (44/483) of asymptomatic VL-HIV coinfection cases. Flow cytometry has shown good sensitivity for diagnosing VL in HIV-positive patients (being superior to serological methods used in clinical practice), and proving to be a potential diagnostic tool in this population. In the symptomatic VL-HIV group we found increased levels of IL-17A and IL-6. There was no difference in cytokine levels evaluated between asymptomatic, VL-HIV and healthy controls. Follow-up studies of coinfecting patients are necessary. Thereby, these results can be better evaluated and correlated with clinical findings, treatment options and outcome.

Keywords: visceral leishmaniasis; HIV; coinfection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema gráfico do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> nas Américas.....	18
Figura 2 - Distribuição mundial de casos de LV no ano de 2018.....	19
Figura 3 - Distribuição dos casos de LV no mundo, por espécie.....	20
Figura 4 - Casos de LV entre 2010 e 2019 em Pernambuco por macrorregião de residência.....	21
Figura 5 - Número estimado de pessoas com HIV no ano de 2016 por região da OMS.....	22
Figura 6 - Casos de coinfeção LV-HIV em Pernambuco entre 2010 e 2019 por macrorregião de residência.....	26
Figura 7 - Algumas das citocinas envolvidas na imunopatogênese da LV-HIV.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC	Antes da era comum
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation</i> Linfócito T CD4+
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFAT	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase
IP-10	Proteína-10 induzida por interferon gama
ITS	Região espaçadora interna transcrita ribossômica
ITS-1	Espaçador interno transcrito 1
JAK	Janus tirosina cinase
kDNA	DNA repetitivo do cinetoplasto
LV	Leishmaniose visceral
MIG	Monocina induzida por interferon gama
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

NK	Células <i>natural killers</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVHIV	Pessoa vivendo com o vírus da imunodeficiência humana
rK39-ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática rK39
rK39-ICT	Teste rápido imunocromatográfico rK39
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAE	Serviço de Assistência Especializada em HIV/AIDS
SINAN	Sistema nacional de agravos de notificação
SSU rRNA	RNA ribossômico de subunidade pequena
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	Terapia antirretroviral
TGF- β	Fator de crescimento beta
Th	T <i>helper</i>
TLR	Receptor <i>toll like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Leishmaniose visceral	16
2.1.1 Agente etiológico e vetor	17
2.1.2 Epidemiologia	18
2.2 HIV / AIDS	21
2.2.1 Resposta imune na infecção pelo HIV.....	23
2.3 Coinfecção LV-HIV.....	24
2.3.1 Apresentação clínica e classificação da LV em PVHIV	26
2.3.2 Diagnóstico laboratorial da LV em PVHIV	27
2.3.2.1 Exames imunológicos.....	27
2.3.2.2 Exames moleculares	30
2.3.2.3 Exame parasitológico	31
2.3.3 Tratamento da LV em PVHIV	32
2.3.4 Imunopatogênese da coinfecção LV-HIV	34
3 JUSTIFICATIVA.....	40
4 OBJETIVO GERAL.....	41
4.1 Objetivos específicos.....	41
5 MÉTODO.....	42
5.1 Referente ao objetivo específico A.....	42
5.2 Referente ao objetivo específico B.....	42
5.2.1 Desenho do estudo.....	42
5.2.2 Local do estudo	42
5.2.3 População e amostra.....	42
5.2.4 Protocolo de investigação de Leishmaniose Visceral.....	43
5.2.4.1 Avaliação epidemiológica	43
5.2.4.2 Avaliação clínica.....	43
5.2.4.3 Avaliação laboratorial	44

5.2.4.4 Diagnóstico laboratorial de LV.....	44
5.2.5 Análise estatística dos dados	47
5.3 Referente ao objetivo específico C	47
5.3.1 Desenho, local, população e amostra	47
5.3.2 Protocolo de pesquisa	48
5.3.2.1 Diagnóstico da LV.....	48
5.3.2.2 Teste de imunofluorescência indireta (IFAT).....	48
5.3.2.3 ELISA.....	49
5.3.2.4 Citometria de fluxo.....	49
5.3.3 Análise estatística.....	50
5.4 Referente ao objetivo específico D	51
5.4.1 Desenho, local, população e amostra	51
5.4.2 Protocolo de avaliação laboratorial.....	51
5.4.3 Análise estatística dos dados	52
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	53
7 ARTIGOS	54
7.1 Artigo 1: Sexual transmission of visceral leishmaniasis: a neglected story.....	55
7.2. Artigo 2: Asymptomatic Leishmania infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco, Brazil.....	59
7.3 Artigo 3: A flow cytometry-based serological assay to detect visceral leishmaniasis in HIV-infected patients	71
7.4 Artigo 4: Comparison of cytokine profile of symptomatic and asymptomatic HIV-Leishmania coinfecting individuals from a VL-endemic area	80
8 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICE A – TCLE (Objetivo B).....	112
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO (Objetivo B)	114
APÊNDICE C – TCLE (Objetivo D).....	118

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica das leishmanioses mais associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CARVALHO et al., 2013). Causada pelos parasitas *Leishmania infantum* e *L. donovani*, a LV é classificada como uma doença oportunista (MARLIER et al., 1999). Pessoas vivendo com o HIV (PVHIV) residentes em áreas endêmicas para LV estão sob risco mais elevado para adquirir essa doença quando comparadas àquelas negativas para o HIV (ALVAR et al., 2008). Ressalta-se ainda o risco de pior prognóstico da LV nos casos de coinfeção com o HIV (ALVAR et al., 2008; FAUCHER; PIARROUX, 2011).

Quando não diagnosticada e tratada, a LV é fatal (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Ainda que exista uma variedade de testes diagnósticos, esses são limitados. Por isso é recomendada a associação de testes, objetivando o aumento na sensibilidade do diagnóstico (COTA et al., 2013b). Especialmente nas PVHIV, o diagnóstico da LV é dificultado pelo impacto que o vírus exerce na resposta imune delas e pela característica do parasita de permanecer de forma intracelular – e em muitos casos infectando órgãos não típicos, como intestino e pulmões (DIRO et al., 2015a). Isso se reflete também em aumento no risco de letalidade nessas pessoas coinfectadas com LV e HIV devido ao atraso no diagnóstico (DRIEMEIER et al., 2015).

Outra consequência do não diagnóstico de LV nas PVHIV é o potencial desses indivíduos coinfectados passarem a carregar os parasitas de forma “silenciosa”, facilitando a manutenção do ciclo de transmissão da LV onde residem (MOLINA et al., 2020). Em outras palavras, as PVHIV coinfectadas com LV podem algumas vezes se manterem assintomáticas, porém apresentando parasitas circulantes em níveis infectantes para o inseto vetor. Esse é um dos fatores que poderiam dificultar o sucesso de programas de eliminação da LV, principalmente em seus estágios finais. Dessa forma, a testagem para LV nas PVHIV é determinante para a identificação de casos assintomáticos/latentes de LV e deveria ser rotina nos serviços de saúde, especialmente nas áreas endêmicas para LV. Ainda outra preocupação em relação ao controle e eliminação da LV é sobre as vias de transmissão da doença. Além da maneira mais conhecida, através da picada de insetos vetores (flebotomos), discute-se o risco da transmissão vertical e ainda através de transfusões sanguíneas. Um

outro potencial meio de transmissão, através de relações sexuais, deveria receber também atenção.

A identificação de portadores assintomáticos de LV entre PVHIV, entretanto, não é suficiente para o controle e a erradicação da LV, e pode pouco impactar na economia de recursos financeiros em saúde e na redução da letalidade. Por outro lado, a pesquisa por marcadores biológicos que funcionem como preditores de reativação de LV latente, por marcadores que sinalizem riscos de maior gravidade e pior prognóstico na LV ativa, e por marcadores que possam guiar de forma segura os critérios de alta hospitalar e de profilaxia secundária, poderiam ser determinantes. Teríamos então: 1) o benefício individual, com redução de morbimortalidade e letalidade; e 2) o benefício coletivo, com menor custo à saúde pública (menos internamentos ou menor tempo de hospitalização, menor uso de medicamentos e menor risco para efeitos adversos).

Tanto a *Leishmania* quando o HIV, ao infectarem células dendríticas e macrófagos, impactam negativamente o processamento e na apresentação de antígenos. Essa relação entre os dois patógenos, descrita como simbiótica, altera a resposta imunomodulatória favorecendo a replicação de ambos (OKWOR; UZONNA, 2013). Nos coinfectados LV-HIV são observados índices mais baixos de cura da LV e maiores taxas de reativação e de letalidade da LV quando comparados aos indivíduos HIV-negativos (CASADO et al., 2015). Para que haja o controle da infecção pela *Leishmania*, o hospedeiro depende de uma pronta resposta imune celular, principalmente das células T (ADRIAENSEN et al., 2018; IBARRA-MENESES et al., 2016). Por outro lado, a infecção pelo HIV leva uma importante redução nessa resposta – mais especificamente pela destruição de linfócitos T CD4+ (VIDYA VIJAYAN et al., 2017). Esse comportamento justifica a classificação da LV como uma infecção oportunista.

Até o momento não há consenso sobre biomarcadores que possam predizer de forma segura a evolução dos casos de LV (cura, óbito, latência etc). Citocinas, moléculas produzidas por linfócitos e que atuam na resposta imune e na inflamação, são alguns dos marcadores estudados para essa finalidade. E essa foi a nossa opção para este projeto de pesquisa, com a dosagem de níveis séricos de algumas citocinas em casos de coinfeção LV-HIV.

Este projeto de doutorado foi executado em quatro etapas. Na primeira, discutimos, através de uma revisão narrativa, a possibilidade da transmissão da LV por via sexual. Na segunda, realizamos um estudo de transversal para identificar casos de coinfeção LV-HIV através da testagem para LV em pessoas HIV-positivas acompanhadas em um ambulatório especializado para o atendimento de casos de HIV no município de Petrolina, Pernambuco, estimando assim a prevalência na área de estudo. Na terceira etapa avaliamos o uso da citometria de fluxo para o diagnóstico da LV em pessoas com HIV a partir da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* nesses pacientes. Por fim, a partir dos casos identificados de coinfeção LV-HIV procedemos à dosagem de algumas citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17, comparando os níveis dessas citocinas com entre sintomáticos e assintomáticos.

Esperamos, assim, contribuir com conhecimento sobre novas formas de transmissão, possíveis novas ferramentas para diagnóstico, além de contribuir com dados epidemiológicos e laboratoriais relacionados à coinfeção LV-HIV em Pernambuco. Com isso, poder auxiliar políticas públicas que visam o controle e erradicação da LV neste estado, e ser o início para novos projetos de pesquisa nessa área.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Dividimos a revisão de literatura em três partes, trazendo separadamente a leishmaniose visceral, em seguida o HIV, e por último a coinfeção leishmaniose visceral e HIV.

2.1 Leishmaniose visceral

As leishmanioses são algumas das doenças mais antigas que se tem registro. O gênero *Leishmania* provavelmente evoluiu na era mesozoica (252-66 milhões de anos atrás) antes do rompimento do supercontinente Pangeia. O primeiro fóssil de um parasita similar à *Leishmania* foi encontrado em uma fêmea de uma extinta espécie de flebótomo (*Palaeomyia burmitis*) preservada em âmbar e datado de 100 milhões de anos (STEVERDING, 2017).

É relatada infecção por *Leishmania donovani* no Egito Antigo por volta do ano 2.000 antes da era comum (AEC). Ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial de *Leishmania* foi encontrado através de um estudo paleoparasitológico em múmias egípcias de uma tumba da época do Médio Império, localizadas a oeste da cidade de Tebas. Através de sequenciamento genético foi possível identificar que se tratava de *Leishmania donovani* (AKHOUNDI et al., 2016). A leishmaniose também é mencionada no Papiro Ebers, um dos tratados médicos mais antigos e importantes que se conhece, escrito no Egito antigo e datado do ano de 1.500 AEC (STEVERDING, 2017).

Não existem relatos confiáveis de descrição da LV anterior ao século XIX. O primeiro surto da doença foi descrito no ano de 1824 e ocorreu na Índia, em uma localidade próxima a Bengal (GIBSON, 1983). Relatada como *kala-azar*, termo hindi cunhado no final do século XIX e que significa “febre preta” (ou ainda “febre fatal”, pois *kala* também tem esse significado em hindi) por conta da coloração acinzentada da pele de pessoas acometidas pela doença (SAKKAS; GARTZONIKA; LEVIDIOTOU, 2016; STEVERDING, 2017).

2.1.1 Agente etiológico e vetor

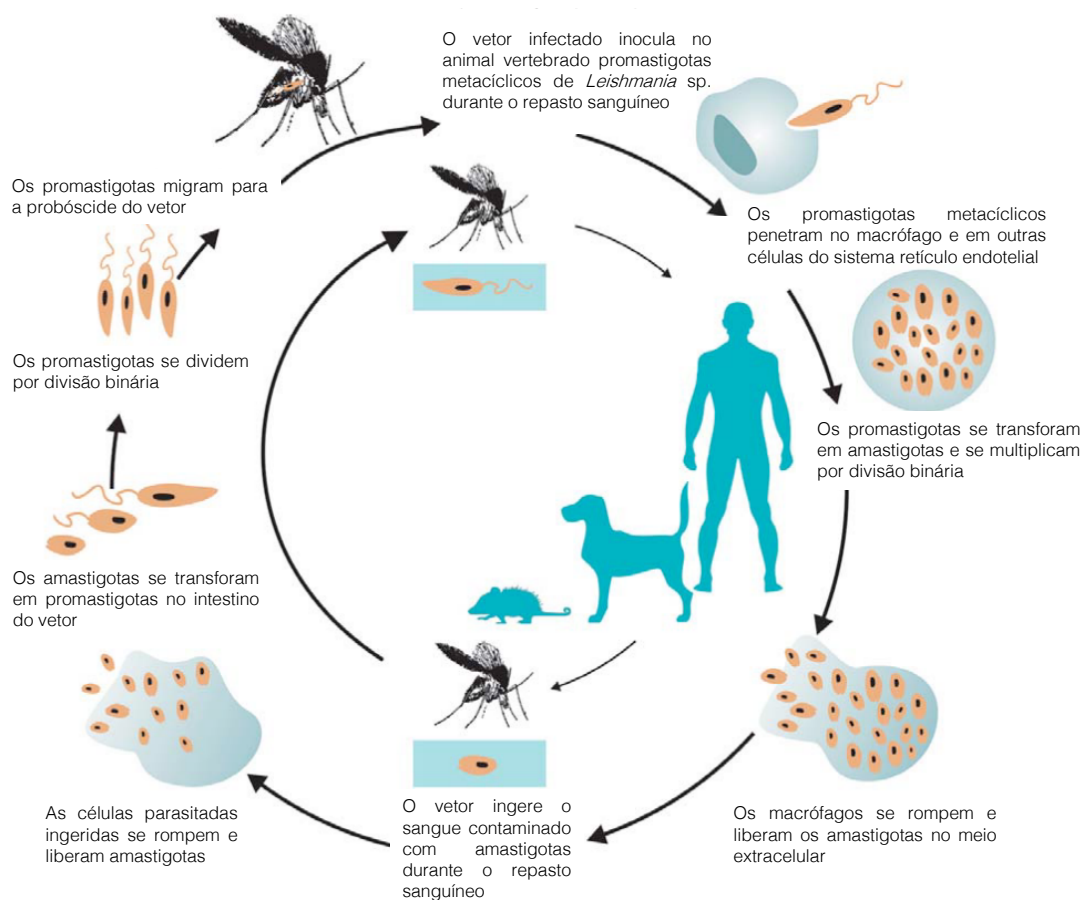
O parasita *Leishmania* pertence ao reino protista. Tem como classe a *Kinetoplastida*, subclasse *Metakinetoplastina*. É da ordem *Trypanosomatida*, da família *Trypanosomatidae* e subfamília *Leishmaniinae*, chegando ao gênero *Leishmania*. As espécies de *Leishmania* são heteroxênicas – ou seja, são capazes de colonizar dois hospedeiros. Eles vivem nos fagócitos do sistema retículo-endotelial de mamíferos e no trato intestinal de flebotomíneos (AKHOUNDI et al., 2016). O gênero *Leishmania* possui alguns subgêneros, sendo o *Viannia* e o *Leishmania*, os quais parasitam mamíferos, os de maior importância na saúde pública uma vez que são os agentes causadores da leishmaniose cutânea e da leishmaniose visceral em humanos e em outros animais (CUPOLILLO et al., 2000).

As espécies de *Leishmania* de mamíferos exibem uma distribuição mundial. Elas estão presentes em áreas tropicais e subtropicais, incluindo América do Norte, Central e do Sul. Também estão presentes em localidades que margeiam o Mar Mediterrâneo, Sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central e Sudeste da Ásia, além do subcontinente indiano e África (AKHOUNDI et al., 2016).

A *Leishmania* spp apresenta duas formas evolutivas principais: a amastigota e a promastigota. No inseto vetor o parasita é encontrado em sua forma promastigota, infectante para os mamíferos. Durante o repasto sanguíneo de fêmeas do flebótomo, as formas promastigotas são inoculadas e, no organismo do hospedeiro final, infectam principalmente macrófagos. Nessas células, passam à forma amastigota e passam a se multiplicar por divisão simples (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019). O esquema gráfico do ciclo de vida da *Leishmania* pode ser visto na figura 1.

A LV é causada por parasitas do gênero *Leishmania* (BURZA et al., 2018). No Brasil, a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* é o principal agente etiológico. Alguns casos de visceralização a partir da doença cutânea causada por outras espécies, como a *Leishmania amazonenses*, também são relatados (THAKUR et al., 2018; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Figura 1 - Esquema gráfico do ciclo de vida da *Leishmania* nas Américas.



Fonte: Adaptado da Organização Pan-Americana da Saúde (2019)

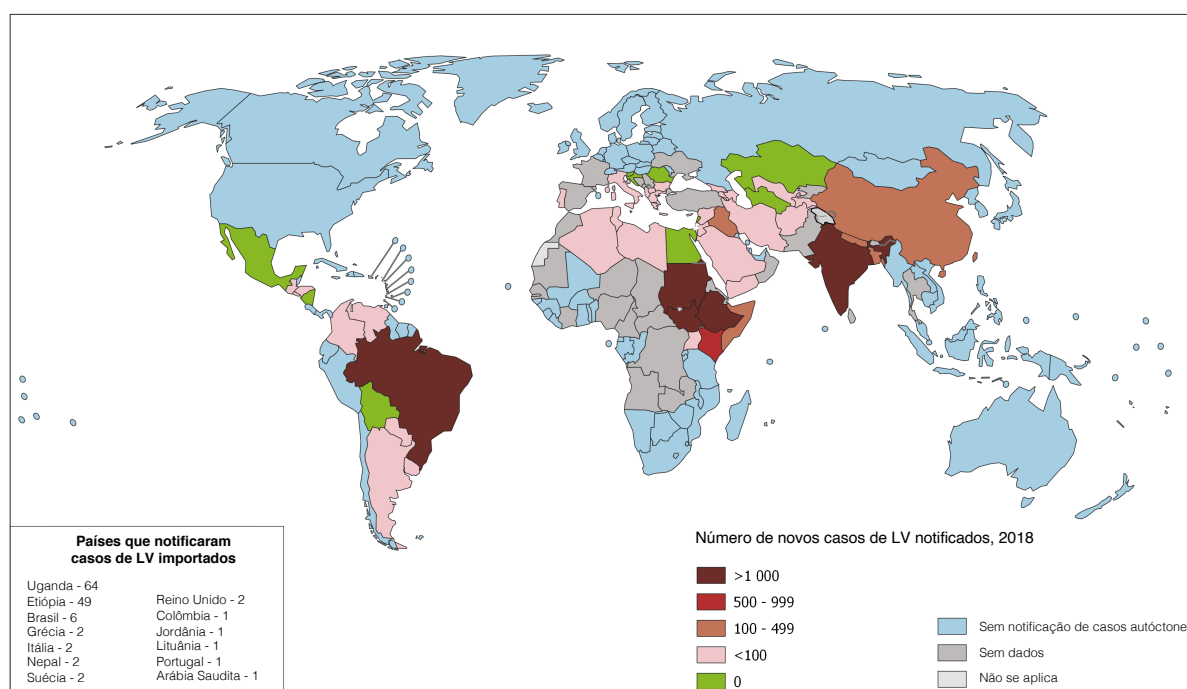
O principal vetor da *L. infantum* em nossa região é o inseto flebotomo *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005) – discute-se ainda o papel de outras espécies vetores no ciclo de transmissão da *L. infantum*, como a *Lutzomyia migonei* (COSTA, P. et al., 2013). A transmissão entre pessoas também pode ocorrer entre usuários de drogas injetáveis por agulhas contaminadas, sendo esta uma via importante em alguns países europeus (MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2003). Além dessa, existe a preocupação sobre a possibilidade de transmissão através de transfusões de sangue (FRANÇA et al., 2018; MICHEL et al., 2011; SILVA et al., 2020).

2.1.2 Epidemiologia

A LV é uma doença de distribuição mundial, sendo endêmica em mais de 60 países. Entretanto, mais de 90% do número de casos de LV no mundo estão em

apenas sete países, que são: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (BURZA et al., 2018). Por ano, cerca de 20 mil casos de LV ocorrem em todo o mundo (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020). O mapa da Organização Mundial da Saúde (OMS) com a distribuição geral da LV no mundo pode ser visto na figura 2. A distribuição global de casos de LV por espécie do parasita pode ser vista na figura 3.

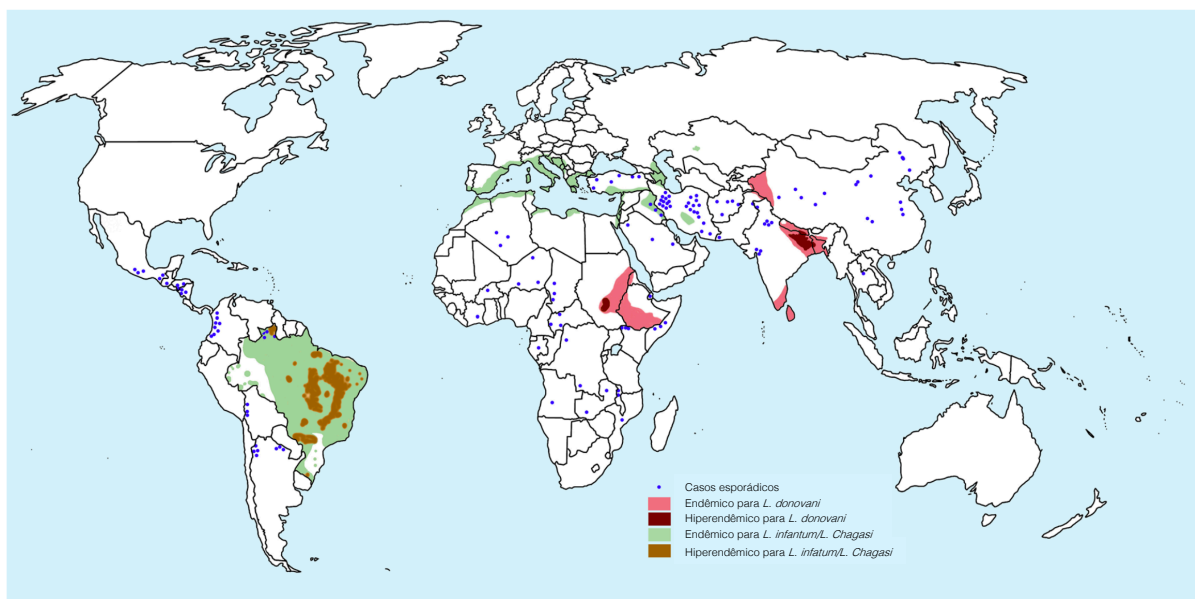
Figura 2 - Distribuição mundial de casos de LV no ano de 2018



Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2019).

Nas Américas, a LV provavelmente foi trazida junto com colonizadores durante a ocupação europeia no século XVI através de animais infectados (LIMA et al., 2018; MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000). A partir daí tornou-se endêmica, sendo relatada inicialmente como doença de localidades semiáridas e rurais (LIMA et al., 2018), e posteriormente expandindo-se para áreas urbanas (COTA et al., 2014; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; LIMA et al., 2013).

Figura 3 - Distribuição dos casos de LV no mundo, por espécie



Fonte: Adaptado de Sundar e Singh (2018).

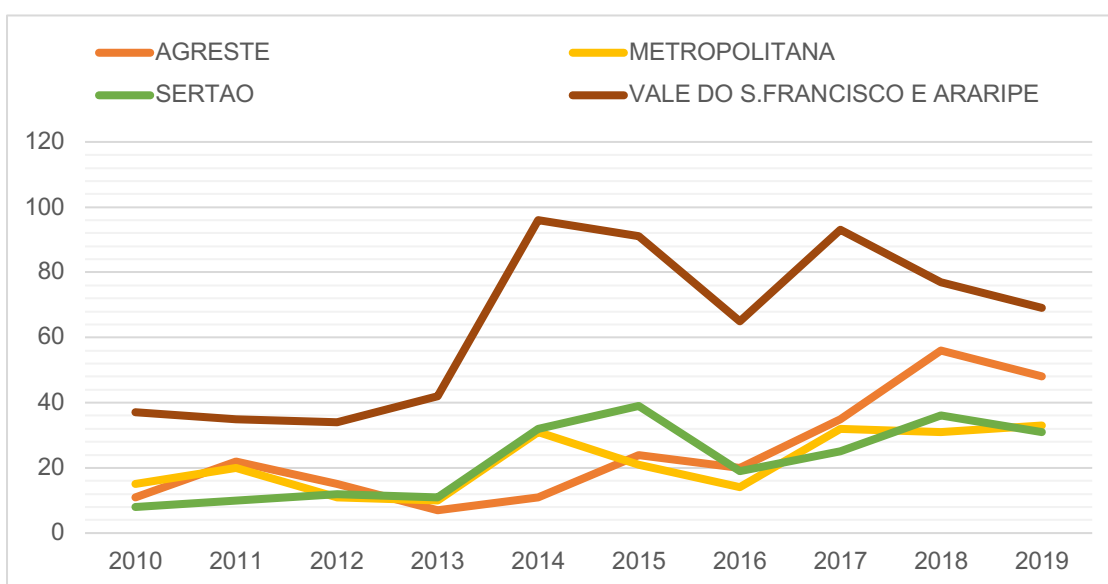
Reconhecida no Brasil primeiramente no ano de 1932, a LV desde então passou por mudanças em suas características demográficas e epidemiológicas. Um estudo a partir do Rio Grande do Norte (LIMA et al., 2018), observando o período entre os anos de 1990 a 2014, reporta o aumento da LV em áreas urbanas, reafirmando esse fenômeno. São fatores que podem ter contribuído para essa urbanização da LV: 1) migração de pessoas de áreas rurais endêmicas para áreas urbanas; 2) adaptação do vetor a ambientes peridomésticos; e 3) transporte de cães infectados para áreas urbanas durante as migrações humanas. Ainda, fenômenos climáticos, como por exemplo *El Niño* e *La Niña*, os quais, através da influência nas chuvas e na humidade, altera a densidade dos insetos vetores alterando, assim, a incidência da LV. Outra mudança demográfica na LV, citada por esse estudo norte-rio-grandense, foi a queda na incidência de casos em crianças e aumento no número de casos em adultos. Importante ainda é a observação de que a LV é mais frequentemente observada em pessoas que habitam áreas de pobreza (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

No continente americano, a LV está presente em 13 países. Porém 97% dos casos ocorre apenas em um país, o Brasil (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020). Anualmente são notificados entre 4.200 e 6.300 casos, distribuídos em todas as regiões brasileiras (BEZERRA et al., 2018). Entre os anos de 1990 até 2016 foram registrados quase 85 mil casos de LV no país, com uma taxa de letalidade

próxima a 8%. A região nordeste do Brasil é onde se encontram a maioria dessas pessoas infectadas (HARHAY et al., 2011; SOUSA-GOMES et al., 2008). Pernambuco é considerado um estado endêmico para LV (BEZERRA et al., 2018) e responde por 2,4% dos casos no Brasil, sendo o Vale do São Francisco a macrorregião pernambucana mais afetada (SOUSA; RAMALHO; DE MELO, 2018), com uma rápida expansão entre os municípios do estado (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Na figura 4 é possível ver informações do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) com o número de casos notificados entre 2010 e 2019 em Pernambuco por macrorregião de residência dos indivíduos afetados. Nota-se uma tendência de aumento dos casos nas regiões Agreste e Vale do São Francisco (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2020), locais para onde este estudo direciona a atenção.

Figura 4 - Casos de LV entre 2010 e 2019 em Pernambuco por macrorregião de residência



Fonte: Sistema Nacional de Agravos de Notificação (2020)

2.2 HIV / AIDS

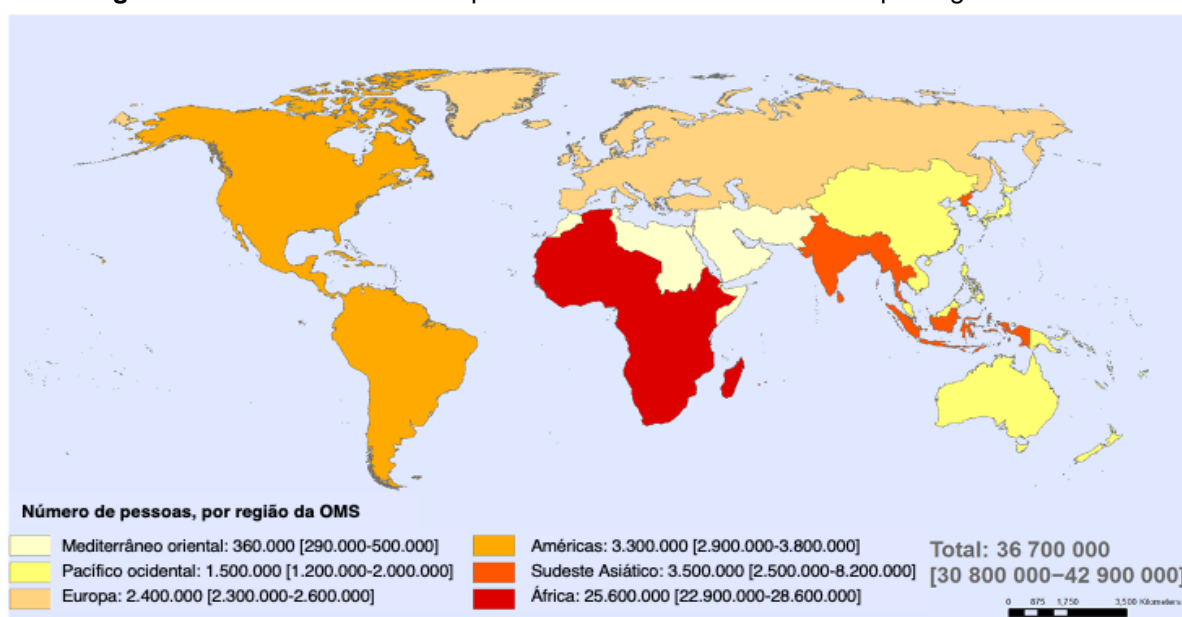
De acordo com o último relatório da OMS, publicado no ano de 2020, em 2019 38 milhões de pessoas viviam com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e 690 mil pessoas morreram por causas relacionadas à Síndrome de Imunodeficiência

Adquirida (AIDS) (PROGRAMA CONJUNTO DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE HIV/AIDS, 2020). No Brasil, do início de 1980 até junho de 2020, foram detectados pouco mais de um milhão de casos de AIDS. Somente no ano de 2019, foram notificados 41.919 novos casos de HIV no Brasil (14.778 no Nordeste) e 10.565 óbitos por AIDS (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE HIV E AIDS, 2020).

Entre os anos de 1980 e 2020 foram notificados em Pernambuco 37.674 casos de AIDS (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE HIV E AIDS, 2020). Nos primeiros dez anos da epidemia de AIDS, a maioria dos casos estavam localizados na região metropolitana do Recife. A partir da segunda metade da década de 1990 foi observado um aumento do número de casos no agreste e sertão do estado (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2012).

Em relação a casos de HIV (não-AIDS), no período de 2007 a 2020 foram notificados cerca de 342 mil casos no Brasil. Os casos da região nordeste corresponderam a 19% desse total. Na figura 5 vemos o mapa com a distribuição mundial de HIV de acordo com a OMS. No Brasil, muitas das pessoas com HIV são acompanhados em nível ambulatorial nos Serviços de Assistência Especializada (SAE), principalmente casos de maior complexidade (falhas de tratamento e coinfeções, por exemplo) (BRASIL, 2018).

Figura 5 - Número estimado de pessoas com HIV no ano de 2016 por região da OMS



Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2017).

2.2.1 Resposta imune na infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV se estabelece no organismo do hospedeiro como uma infecção crônica. Inicialmente, células T CD4+ na mucosa do hospedeiro são infectadas, ocorrendo uma queda considerável nos níveis dessas células (VIDYA VIJAYAN et al., 2017), e em seguida havendo início de uma resposta inata com macrófagos e demais linfócitos (MOGENSEN et al., 2010; SCAGNOLARI; ANTONELLI, 2018).

Uma das características importantes da infecção pelo HIV e progressão para a AIDS é a chamada ativação imune crônica, onde, além da destruição de células T CD4+, ocorre grande ativação do sistema imune com altas taxas de divisão das células T CD4+, T CD8+, *natural killers* e células B (VIDYA VIJAYAN et al., 2017). Essa ativação é caracterizada por altos níveis de citocinas pro-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e TGF- β . Outros marcadores, como a citocina anti-inflamatória IL-10, aparecem em altos níveis séricos durante a infecção aguda e podem estar associadas a rápida progressão para AIDS.

A produção de algumas citocinas é afetada durante a infecção pelo HIV, havendo, por exemplo, aumento do TNF e redução da IL-2. Com a redução dos níveis de IL-2, há impacto na regulação da resposta imune, uma vez que essa citocina está relacionada com o desenvolvimento das células Treg (HOANG; PAIARDINI, 2019; SOKOYA et al., 2017). IFN- γ é produzida como parte da resposta imune inata e, na presença dessa, pode também, por exemplo, haver redução dos níveis de células T. Os níveis de IL-4 também podem ter redução à medida que a infecção progride e o número de células responsáveis pela sua produção diminuem (SOUSA et al., 2001). Além disso, a infecção pelo HIV leva a perda substancial de células Th17 em mucosas, com consequente translocação microbiana – evidenciada por altos níveis plasmáticos de LPS e sCD14 (SOKOYA et al., 2017; VIDYA VIJAYAN et al., 2017).

Células Treg inibem a ativação das células T CD4+ e a replicação viral, reduzindo o impacto dessa ativação imune crônica (HASENKRUG; CHOUGNET; DITTMER, 2018; KARKHAH; JAVANIAN; EBRAHIMPOUR, 2018; SEDDIKI; BREZAR; DRAENERT, 2014). Apesar de as células Treg serem, à princípio, suscetíveis ao HIV, isso não é visto em pessoas infectadas, tendo essas células

funcionamento igual aos em pessoas HIV-negativas (HASENKRUG; CHOUGNET; DITTMER, 2018).

2.3 Coinfecção LV-HIV

A LV é a forma clínica das leishmanioses mais associada à infecção pelo HIV (CARVALHO et al., 2013), necessitando de atenção especial por levar a um pior prognóstico quando se apresenta como coinfecção (ALVAR et al., 2008; FAUCHER; PIARROUX, 2011).

Desde a descoberta do HIV, dois fenômenos vêm ocorrendo: o aumento no número de casos de LV em centros urbanos, e o avanço dos casos de HIV em áreas rurais. O surgimento da epidemia pelo HIV e da AIDS, na década de 1980, coincidiu com o início da disseminação dos casos de LV em áreas urbanas no Brasil (HARHAY et al., 2011). Já a LV, antes mais frequentemente observada em pessoas moradoras de áreas rurais, vem sendo diagnosticada em indivíduos residentes em centros urbanos (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). O encontro entre essas duas doenças no Brasil (ORSINI et al., 2012) e em alguns outros países (DESJEUX; ALVAR, 2003), naturalmente favoreceu a um aumento no número de casos de coinfecção LV-HIV em todo o mundo.

A prevalência da coinfecção LV-HIV varia de acordo com a região e com o método diagnóstico empregado (HIRVE et al., 2016). Outro fator também importante para a quantificação da prevalência é a notificação das doenças. Antes do ano de 2014, apenas os casos de AIDS eram notificados (BRASIL, 2014), impactando no conhecimento sobre a prevalência de HIV não-AIDS entre pessoas com diagnóstico de LV previamente a 2014. Além disso, na ficha de notificação de casos de LV existe o campo para identificação de caso de coinfecção com HIV, porém em apenas 65% das notificações essa informação está presente (SOUSA-GOMES; ROMERO; WERNECK, 2017).

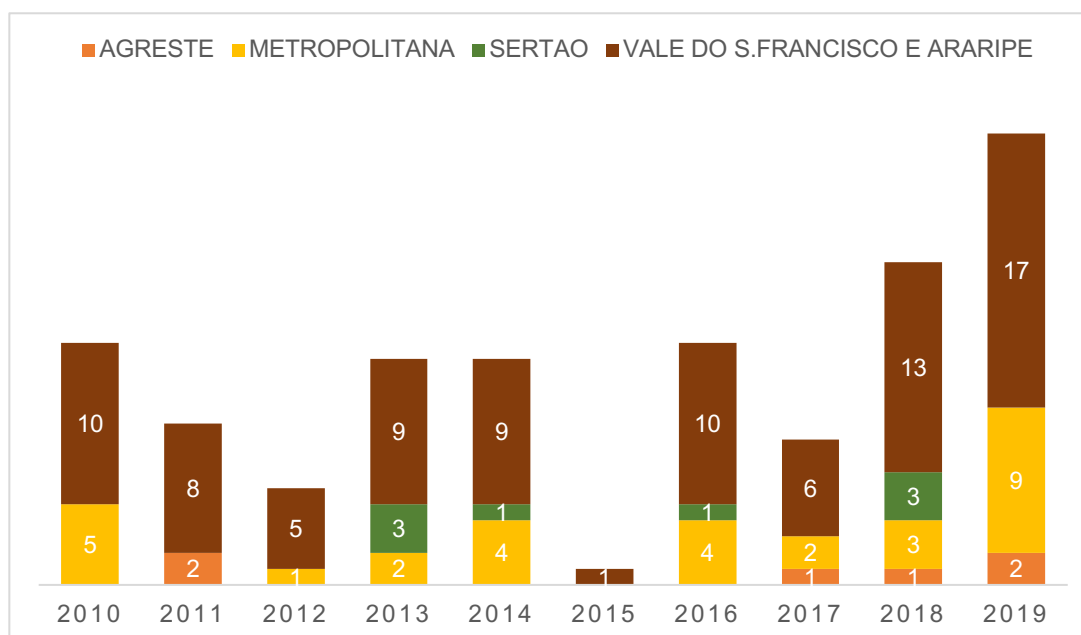
Para além dos problemas citados, a partir dos dados oficiais existentes, no Brasil, de maneira geral, a prevalência da coinfecção LV-HIV vem aumentando – de 0,75% em 2001, passando para 3,82% em 2010 (SOUSA-GOMES; ROMERO; WERNECK, 2017), a até 8,5% em 2012 (LINDOSO et al., 2014). Em Pernambuco, em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, e no qual o critério empregado

para definir coinfeção foi ter ao menos um teste positivo para LV, foi observada uma prevalência de 16,9% dessa coinfeção em PVHIV internadas em três hospitais de referência para doenças infecciosas no Recife (GUEDES et al., 2018). Em outros dois estudos semelhantes, onde a definição de caso de coinfeção LV-HIV também foi a presença de pelo menos um exame positivo para LV em PVHIV, foram observadas prevalências de 16% no Distrito Federal e 20,2% em Minas Gerais (CARRANZA-TAMAYO et al., 2009; ORSINI et al., 2012). Outros estudos em diferentes estados do Brasil reportam prevalências entre 4,5% a 48,4% (COUTINHO et al., 2017; CUNHA et al., 2020; MACHADO et al., 2021; SANTOS et al., 2019; VIANA et al., 2017).

Observando dados do SINAN sobre notificações de coinfeção LV-HIV em Pernambuco no período de 2010 a 2019 (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2020), nota-se um número baixo de casos (Figura 6). Presumimos que haja uma alta taxa de subnotificação da coinfeção LV-HIV, o que reforça a importância de estudos com busca ativa de casos em áreas endêmicas. Além disso, a casuística dependerá da origem das amostras investigadas: ambulatório, hospital, entre outros.

Associado a isso, os sintomas clássicos de LV (por exemplo febre, hepatomegalia, perda de peso) são menos frequentes nas pessoas coinfectadas com HIV quando comparadas àquelas afetadas apenas por LV, além de sintomas atípicos como dispneia e diarreia poderem estar presentes nos coinfectados (DAHER et al., 2009; FERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 1987; HENN et al., 2018). Ainda, quando em coinfeção com HIV, a LV pode se manifestar em localizações atípicas, como intestinos e pulmões (DIRO et al., 2015a). Por tudo isso, poderia haver um retardo no diagnóstico e conseqüentemente maior risco de pior prognóstico e maior letalidade (BRASIL, 2011).

Figura 6 - Casos de coinfeção LV-HIV em Pernambuco entre 2010 e 2019 por macrorregião de residência



Fonte: Sistema Nacional de Agravos de Notificação (2020)

2.3.1 Apresentação clínica e classificação da LV em PVHIV

Em relação à apresentação clínica da LV nas PVHIV, podemos utilizar uma classificação de casos assintomáticos ou sintomáticos, ou de casos ativos ou latentes. Definimos assintomática toda pessoa com ao menos um teste para LV positivo, porém não apresentando nenhum sintoma típico da LV (febre, palidez, perda de peso, hepatomegalia ou esplenomegalia). O sintomático, por sua vez, apresenta ao menos um teste para LV positivo e sintomas típicos (BRASIL, 2015). Entretanto essa apresentação clínica clássica da LV nem sempre é observada em pessoas que vivem com HIV (LIMA et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2011), fato esse responsável por um diagnóstico de LV mais tardio nas pessoas com HIV.

Para os casos ativos ou latentes, poderíamos usar a mesma classificação de sintomático para os casos ativos, e de assintomático para os casos latentes. Adicionalmente, a definição de latente poderia se aplicar em duas situações: das pessoas que foram infectadas e nunca desenvolveram a doença; e das pessoas que tiveram a doença ativa e foram tratadas, estando agora assintomáticas (HASKER et al., 2013; MOLINA et al., 2020).

Idealmente, o diagnóstico de um caso ativo de LV seria a detecção do parasita em medula óssea (BRASIL, 2015). Principalmente nas PVHIV com AIDS, nas quais sintomas como febre e perda de peso são comuns (também por outras infecções oportunistas) (BRASIL, 2018), para qualquer outro teste positivo para LV que não o parasitológico haveria o risco de um falso diagnóstico de LV ativa, o que poderia expor essas pessoas a tratamentos desnecessários e ao atraso no diagnóstico de alguma outra doença. Além disso, o exame para detecção dos parasitas (aspirado de medula óssea) é um teste mais invasivo, doloroso e que demanda pessoal especializado para a coleta e leitura do material. Por isso, a busca por marcadores mais sensíveis, específicos e menos invasivos é determinante para um diagnóstico rápido e um tratamento seguro.

Além dessas formas previamente comentadas, a particular condição de portador assintomático é atualmente uma das preocupações principalmente em localidades com programas de controle e erradicação da LV, uma vez que essas pessoas poderiam atuar como carregadores silenciosos do parasita *Leishmania* spp, mantendo o ciclo ainda ativo na localidade (MOLINA et al., 2020).

2.3.2 Diagnóstico laboratorial da LV em PVHIV

Para o diagnóstico da LV, existem os testes imunológicos (detecção de anticorpos ou antígeno), moleculares ou parasitológicos.

2.3.2.1 Exames imunológicos

Exames imunológicos para detecção de anticorpos ou de antígenos podem apresentar bons resultados desde que sejam complementares a uma bem fundamentada suspeita clínica de LV (BANGERT et al., 2018). São testes simples, não invasivos e na população geral apresentam boa sensibilidade (ABASS et al., 2015; COTA et al., 2012). Os testes sorológicos são métodos indiretos para detectar anticorpos anti-*Leishmania* aplicados no contexto do diagnóstico da LV. Entretanto, em imunocomprometidos, os testes sorológicos tendem a ser menos sensíveis (COTA et al., 2013b). Com a finalidade de aumentar a sensibilidade e a especificidade dos testes diagnósticos para LV em humanos, muitas moléculas foram purificadas para a obtenção de proteínas recombinantes específicas do gênero *Leishmania* como, por

exemplo, glicoproteínas de membrana (gp63, gp72, gp70), rK39, rK26, SLA, Rgpb, H2A, H2B, Rlack, rP20, rPSA-2 e A2 (BADARÓ et al., 1996; CARVALHO et al., 2002), além de mais recentemente a rLiHyS (DIAS et al., 2018).

No Brasil, o teste imunocromatográfico rK39 (rK39-ICT) tem sido muito utilizado, sendo também disponível nos laboratórios públicos estaduais a imunofluorescência indireta (IFAT) (BRASIL, 2015). O rK39 é um teste derivado de um epítopo imunodominante presente em uma proteína relacionada ao cinetoplasto (uma organela presente em alguns protozoários, incluindo a *Leishmania*) e que é altamente conservada entre as espécies de *Leishmania* viscerotrópicas (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*) (MNIQUIL et al., 2018). Pode ser encontrado no formato de ensaio de imunoabsorção enzimática (rK39-ELISA) ou no formato de teste rápido – o acima mencionado rK39-ICT. Baseiam-se na detecção de anticorpos, sendo descritos como um testes com altas sensibilidade e especificidade (VAISH et al., 2012).

Normalmente o teste rK39 é realizado a partir de soro, porém há autores que relatam o uso de urina e saliva para o mesmo teste (MOHAPATRA; SAMANTARAY; GHOSH, 2016). A sensibilidade do teste rK39 varia em diferentes localidades e populações (BANGERT et al., 2018; BHATTACHARYYA; BOELAERT; MILES, 2013; COTA et al., 2013b). Apesar de muito utilizado no Brasil na testagem de LV em pessoas com HIV, apresenta em nosso país uma sensibilidade de apenas 46% nessa população (COTA et al., 2013b) – é, portanto, melhor indicado para pessoas HIV-negativas, onde a sensibilidade é descrita como acima de 90% (BRASIL, 2015). Além disso, pode ainda variar com o tipo de amostra utilizada (MOHAPATRA; SAMANTARAY; GHOSH, 2016; VAISH et al., 2012). Em um estudo para validação do rK39-ICT na Espanha, foi observada uma sensibilidade no diagnóstico de LV de 83% nas pessoas HIV-negativas e de 67% nas HIV-positivas (BANGERT et al., 2018). Em um estudo brasileiro são descritas, em pessoas HIV-negativas, sensibilidade entre 92 e 93% e especificidade entre 92 e 98% para o rK39 (MACHADO et al., 2016). Entretanto, apesar de suas boas sensibilidade e especificidade, não é um teste útil para o seguimento dos pacientes após o tratamento, uma vez que não tem valor como critério de cura nem como preditor de reativação da LV (SUNDAR; SINGH, 2018).

Outro exame é o teste de aglutinação direta (DAT), desenvolvido na década de 1980, sendo validado em várias áreas endêmicas e usado em países como o Sudão e a Etiópia (DE ASSIS et al., 2011). Baseia-se numa suspensão liofilizada de cultura

fixada e corada de promastigotas de *L. donovani*, tratada com tripsina. Esse teste detecta a presença, através de reação de aglutinação, de anticorpos circulantes que são produzidos contra os antígenos de superfície dos parasitas invasores nos casos de LV (ADAMS et al., 2012). Pode ser utilizado em formatos de kits comerciais ou ainda ser desenvolvido protocolos próprios *in-house* (OLIVEIRA et al., 2013). É um teste semiquantitativo e os resultados são mostrados em titulação (por exemplo, titulação acima de 1:6.400 é considerada positiva). O DAT apresenta boas sensibilidade e especificidade, com relatos de variação entre 93,4 a 97% e 81 a 98%, respectivamente (DE ASSIS et al., 2011). Em um estudo espanhol, foi observada uma maior sensibilidade para o DAT quando comparados os grupos com LV apenas e os coinfetados LV/HIV – 84% e 91%, respectivamente (BANGERT et al., 2018). No Brasil, é reportada sensibilidade de 99% e especificidade de 98% para o DAT (OLIVEIRA et al., 2013), porém em pessoas com HIV essa sensibilidade cai para 89% (COTA et al., 2013b).

De forma alternativa aos testes sorológicos citados anteriormente, foi desenvolvido pela Fiocruz um teste chamado Lci2, apresentando, quando usado para diagnóstico de LV em pessoas com HIV, melhor sensibilidade em comparação ao rK39 e ao DAT (94% do Lci2 contra 75% do rK39 e do DAT), tendo ainda a vantagem de baixo custo e fácil execução (RAMOS et al., 2021).

A detecção de antígeno de *Leishmania* na urina, através do teste chamado KAtex, vem se mostrando promissora no diagnóstico de LV em pessoas com HIV, incluindo uma possível diferenciação entre doença ativa e latente e como um parâmetro de cura. Isso porque, por ser um teste de detecção de antígeno, o resultado aparentemente sofre pouca influência da condição imunológica do hospedeiro, além de ser um teste não invasivo e de fácil realização e interpretação. O teste se baseia em uma reação de aglutinação, onde antígenos liberados na urina do paciente irão reagir com partículas de látex de poliestireno revestidas com anticorpos anti-antígeno de *L. donovani* (SALAM; KHAN; MONDAL, 2011). Em um estudo recente com pacientes coinfetados na Etiópia, o KAtex apresentou sensibilidade de 84% e especificidade de 99% (MELSEW et al., 2018). Em uma série de casos realizada em Pernambuco, Brasil, o KAtex foi positivo em três de quatro pacientes HIV positivos com confirmação parasitológica de LV (CAVALCANTI et al., 2012). Além disso, esse

teste pode vir a ser um bom preditor de reativação da LV durante o seguimento desses pacientes coinfectados LV-HIV após o tratamento (VAN GRIENSVEN et al., 2018).

2.3.2.2 Exames moleculares

A maioria das espécies de *Leishmania* foram sequenciadas e sabe-se que conservam entre si a estrutura gênica e cromossômica. Assim, a sensibilidade da PCR depende basicamente do tipo de amostra biológica analisada e dos *primers* utilizados para amplificar a sequência alvo. Os alvos de amplificação mais usados são o gene do RNA ribossômico de subunidade pequena (SSU rRNA), o DNA repetitivo do cinetoplasto (kDNA), genes mini-exon e região espaçadora interna transcrita ribossômica (ITS) (SUNDAR; SINGH, 2018).

Em áreas endêmicas, uma proporção substancial de indivíduos sem LV ativa apresenta PCR positiva (infecção assintomática por *Leishmania*). Isso indica que um teste positivo deve ser interpretado associado a uma suspeita clínica e, de forma ideal, associado a algum outro teste, como sorologia. Os testes moleculares, por apresentarem precisão próxima aos métodos convencionais, provavelmente serão cada vez mais utilizados em áreas endêmicas com recursos limitados (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

Uma limitação no uso de DNA PCR é que, uma vez que são baseados na detecção de DNA de *Leishmania* spp, esse DNA pode permanecer detectável em material biológico mesmo em pessoas assintomáticas para LV (GARCÍA-GARCÍA et al., 2006). Ainda, utilizando a PCR em sua forma convencional, mesmo com suas elevadas sensibilidade e especificidade nem sempre podemos inferir se há infecção ativa ou latente (COTA et al., 2013b). Para contornar esse problema, uma alternativa seria a PCR quantitativa, com a possibilidade de avaliar carga parasitária de *Leishmania* spp (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). Alguns métodos de PCR quantitativa podem informar o resultado de forma rápida e com a necessidade de pouco volume de amostra biológica, incluindo sangue periférico (DANTAS-TORRES et al., 2017). A quantificação de carga parasitária provavelmente poderia também ser utilizada no seguimento pós tratamento como preditor de reativação da LV (MOLINA et al., 2013).

Outra possível solução para diferenciar infecção assintomática de infecção ativa seria o uso da PCR em tempo real com amplificação de RNA de *Leishmania* spp (SUNDAR; SINGH, 2018). Isso seria importante pois é possível que, em pessoas com HIV, um exame DNA PCR positivo na presença de sintomas como febre e perda de peso não significar ser um caso de LV ativa, e sim outra infecção oportunista como tuberculose ou histoplasmose, por exemplo. Além disso, em regiões endêmicas essa diferenciação é útil no controle coletivo da doença, visto que o portador assintomático pode ter um papel importante na manutenção do ciclo do parasita (MOLINA et al., 2020).

Destacamos, por fim, que, até o momento, nenhum método disponível para o diagnóstico de LV em pessoas com HIV apresenta sensibilidade e especificidade altas, associadas a baixo custo e facilidade na realização dos exames. Por isso, é sugerida a associação de diferentes métodos para melhores índices de positividade e para diagnósticos mais precisos (COTA et al., 2013b; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

2.3.2.3 Exame parasitológico

O padrão ouro no diagnóstico da LV é o exame parasitológico (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019), sendo o aspirado de medula óssea para detecção da forma amastigota de *Leishmania* spp frequentemente utilizado, com sensibilidade acima de 90% (COTA et al., 2013b; PAGLIANO; ESPOSITO, 2017; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). Entretanto em indivíduos imunocomprometidos esse diagnóstico torna-se mais desafiador (PAGLIANO; ESPOSITO, 2017). Apresentações atípicas da doença não são incomuns, onde parasitas são encontrados apenas em locais atípicos, como o intestino (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019), e a aspiração da medula óssea ou do baço pode ser negativa. Além disso a punção aspirativa é um método invasivo, doloroso, e que requer profissional especializado e equipamentos nem sempre disponíveis nas áreas endêmicas (ROSENTHAL et al., 2000). Por outro lado, a dependência do diagnóstico parasitológico por cultura, mais sensível, em muitos casos poderia retardar o início do tratamento em até quatro semanas, aumentando as chances de pior desfecho clínico (LIMA et al., 2013).

2.3.3 Tratamento da LV em PVHIV

A LV sintomática não tratada é quase sempre fatal. Assim, todos os pacientes sintomáticos com LV precisam de tratamento com drogas anti-*Leishmania* (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). O tratamento da LV em pessoas com HIV no Brasil é feito utilizando-se a anfotericina B, preferencialmente na sua forma lipossomal, uma vez que essa apresenta menor toxicidade e seu uso leva a um melhor prognóstico quando comparada ao desoxicolato de anfotericina B e ao antimoniato, além de menor duração do tratamento (BRASIL, 2015; COTA et al., 2013a). Ainda, a anfotericina B lipossomal oferece a vantagem de ser absorvida seletivamente por macrófagos. Como desvantagem, o tratamento com a anfotericina B lipossomal apresenta um custo mais elevado em comparação às outras drogas anti-*Leishmania* (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). A dose total de tratamento com a anfotericina B lipossomal pode variar entre 20mg a 40mg por quilograma de peso corporal. Apesar de ser a droga de escolha, em alguns países da África e da América Latina é descrita uma menor resposta a esse tratamento (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

Uma estratégia diferente é a associação de drogas no tratamento da LV, onde, além de potencialmente haver melhor resposta, haveria diminuição da indução de resistência aos fármacos no parasita e ainda diminuição do tempo e do custo da terapia (VAN GRIENSVEN et al., 2010). Em um estudo realizado na Etiópia o esquema de anfotericina B lipossomal na dose total de 30mg/kg combinada com 100mg diários de miltefosina mostrou superioridade quando comparado ao esquema com a anfotericina B lipossomal em monoterapia, e sem aumento de efeitos adversos maiores (DIRO et al., 2019). A miltefosina tem a seu favor as características de ser uma droga de apresentação oral e de não necessitar hospitalização para seu uso, mas com a desvantagem de maior risco de induzir resistência (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017).

No Brasil a miltefosina não é licenciada para uso em humanos, apenas em cães. Mesmo com o tratamento adequado e melhora clínica, a taxa de reativação nos indivíduos com HIV são superiores aos imunocompetentes (COTA et al., 2014), sendo essas reativações observadas em uma fase de maior imunocomprometimento causado pelo HIV (MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2003).

Novas abordagens terapêuticas baseadas em nanotecnologia começam a surgir. Estratégias como, por exemplo, a de direcionar substâncias bioativas para o vacúolo parasitóforo do macrófago, onde as formas amastigotas de *Leishmania* estão localizadas. Ou, ainda, a criação de novos dispositivos de liberação de fármacos, como nanopartículas, micropartículas, lipossomos e nano emulsões, objetivando o transporte do fármaco anti-*Leishmania* para a célula-alvo, de forma mais específica e, com isso, minimizando os efeitos tóxicos para as células normais (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; GUTIÉRREZ et al., 2016).

A resposta imune do hospedeiro é um fator determinante no tratamento e no controle da LV, agindo em sinergia com os fármacos anti-*Leishmania*. Em pessoas imunocomprometidas, o tratamento apenas com drogas convencionais como a anfotericina B pode não ser suficiente. Assim, a imunoterapia, definida como o uso de moléculas biológicas ou fármacos que modulam a resposta imune, seja de maneira direta ou através da combinação com outras drogas, aparece como mais uma possibilidade na terapêutica da LV (ADRIAENSEN et al., 2018; FALEIRO et al., 2016; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018). Além disso, o início ou ajuste da terapia antirretroviral (TARV) é essencial para o sucesso do tratamento da LV em pessoas com HIV (VAN GRIENSVEN et al., 2013). Outro ponto importante nos casos de LV em indivíduos coinfectados com HIV é a prevenção das recidivas ou reativações, com a instituição de uma profilaxia secundária, onde uma droga leishmanicida (mais frequentemente a anfotericina B ou a pentamidina) é administrada em doses semanais ou quinzenais a fim de reduzir os riscos dessas reativações, mais comuns dentro do primeiro ano pós-tratamento (COTA; DE SOUSA; RABELLO, 2011; DIRO et al., 2015b). Em pessoas com HIV, essa profilaxia é guiada pela contagem de CD4+ e pode vir a ser suspensa. Porém em pessoas em tratamento com imunobiológicos, essa condução é ainda incerta (ARONSON et al., 2017).

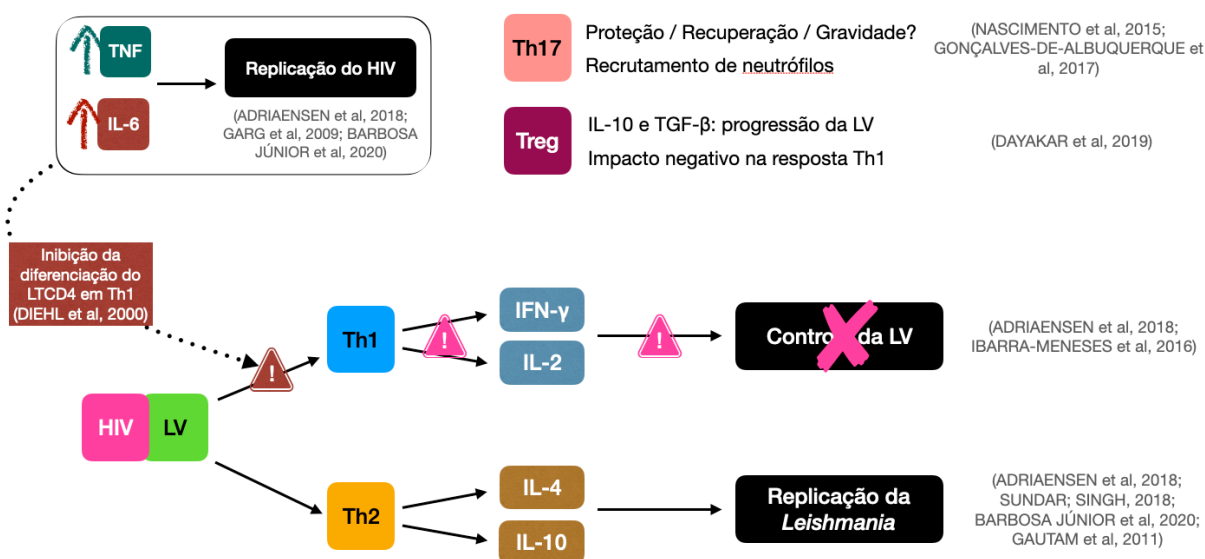
Para que essas novas abordagens terapêuticas possam ser desenvolvidas e melhoradas, é necessário o conhecimento detalhado sobre a resposta imune do hospedeiro contra a *Leishmania*. Assim, saber o perfil imunológico em cada situação clínica (assintomáticos, em doença ativa, pós-tratamento, pré-reativação) é determinante para a criação de intervenções terapêuticas específicas.

2.3.4 Imunopatogênese da coinfeção LV-HIV

O controle da LV está associado a uma resposta imune com grande liberação de IL-2 e IFN- γ (ADRIAENSEN et al., 2018; IBARRA-MENESES et al., 2016). Já a infecção pelo HIV, por sua vez, leva a uma importante redução na resposta imune do hospedeiro – mais especificamente pela destruição de linfócitos T CD4+ (Th1) (VIDYA VIJAYAN et al., 2017), que são uma das principais células protetoras contra a infecção por *Leishmania*. Assim, a infecção pelo HIV desvia a resposta imune do hospedeiro para uma resposta Th2 e, nas pessoas coinfectadas com LV, facilita uma maior replicação da *Leishmania* (ADRIAENSEN et al., 2018). Dessa forma há uma redução na produção de IFN- γ e um aumento na produção de IL-4 e IL-10 (D'ETTORRE et al., 2006; WOLDAY et al., 2000).

A LV em PVHIV induz à ativação de células do sistema imunológico, notadamente das células dendríticas e dos macrófagos, com impactos negativos no processamento e na apresentação de antígenos (OKWOR; UZONNA, 2013). Ainda, o parasita *Leishmania* induz as células dendríticas à produção de citocinas como a interleucina (IL)-6 e o fator de necrose tumoral (TNF), levando a maior replicação do HIV e acelerando a progressão para AIDS (GARG et al., 2009). A IL-6, por exemplo, acaba exercendo um papel na inibição da diferenciação do LTCD4+ para o perfil T *helper* (Th)1 (DIEHL et al., 2000), o que impacta negativamente no controle da infecção por *Leishmania*.

É descrito que a infecção por HIV eleva o risco de desenvolver LV em 100 a 2.320 vezes em pessoas que vivem em áreas endêmicas (ALVAR et al., 2008). Isso pode ser explicado pois: 1) a entrada do HIV em pessoas com *Leishmania* reduz a produção de interferon (IFN)- γ e aumenta a produção de IL-4 e IL-10 (WOLDAY et al., 2000); 2) na presença da *Leishmania* em pessoas com HIV ocorre falha na produção de IFN- γ (NIGRO et al., 1999); 3) pacientes coinfectados com LV e HIV tem níveis reduzidos de IL-15 (D'ETTORRE et al., 2006), citocina responsável também pela ativação da IFN- γ e portanto relacionada à resposta Th1. Tudo isso mostra que a infecção por *Leishmania* em pessoas com HIV modula a resposta imune para a via Th2, associada à progressão da LV (MIRZAEI et al., 2021).



Fonte: O autor.

Os macrófagos são um importante reservatório para o HIV e para a *Leishmania*, e funcionam como um veículo na disseminação desses patógenos por todo o organismo do hospedeiro. Esses dois agentes infecciosos podem ainda interagir entre si e aumentar a supressão da resposta imune através de alterações na apresentação de antígenos (ADRIAENSEN et al., 2018). É descrita, por isso, uma relação de simbiose entre o HIV e a *Leishmania* (OKWOR; UZONNA, 2013). A *L. infantum*, em sua forma amastigota, induz, dentre outras citocinas, a produção de IL-6 e TNF por células dendríticas e linfócitos T CD4+, e com isso há aumento da replicação do HIV (GARG et al., 2009). Ainda, relata-se que a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp no trato intestinal promove lesões na mucosa desse órgão, facilitando a translocação bacteriana para a corrente sanguínea e provocando uma resposta pró-inflamatória sistêmica e ativação imunológica (CASADO et al., 2015; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2013).

Após fagocitarem parasitas *Leishmania*, os macrófagos passam a produzir IL-12, que, por sua vez, estimula células *Natural Killers* (NK) a produzirem IFN-γ, além de também estimular a produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos (ROS), importante para a destruição intracelular das amastigotas de *Leishmania* (DAYAKAR et al., 2019). Assim, após essa invasão inicial pelos parasitas *Leishmania*, comumente ocorre uma resposta Th1, iniciada pela IL-12. A via Th1 é conhecida pela

resposta protetora contra a leishmaniose, sendo mediada pelo IFN- γ e pelo TNF (NASCIMENTO et al., 2015).

Para escapar da resposta inata do hospedeiro, a *Leishmania* utiliza de táticas como: o bloqueio de parte do sistema complemento; redução da expressão de CD40 (necessária para atividade antiparasitária das células T); modificação na sinalização dos *Toll-like Receptors* (TLR)-2 e TLR-4, e também da *Janus tyrosina kinase* (JAK), afetando a cascata de citocinas e alterando o perfil de expressão dessas. Além desses, é relatado que parasitas *L. donovani* poderiam escapar da resposta oxidativa intracelular por inibição da expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) da óxido nítrico sintetase (iNOS) (DAYAKAR et al., 2019).

A gravidade dos casos de LV pode estar relacionada a baixos níveis de IFN- γ e a níveis elevados de IL-10. Gama *et al* relatam que em crianças com LV, e com nenhum ou apenas um sinal de gravidade, os níveis de IFN- γ e IL-10 estavam elevados (GAMA et al., 2013). Em casos sintomáticos de LV, com doença ativa, normalmente o IFN- γ , o TNF e a IL-10 são detectados em níveis elevados (COSTA, A. et al., 2012). Ainda, IFN- γ e as quimiocinas IP-10 (*IFN- γ -inducible protein-10*) e MIG (*monokine-induced-by-IFN- γ*) são apontados como marcadores de boa resposta ao tratamento contra a LV (IBARRA-MENESES et al., 2017), onde esses marcadores estavam, em pessoas curadas, em níveis significativamente aumentados quando comparadas aos dos casos de LV ativa.

Para que essa resposta com o IFN- γ aconteça, é determinante o papel da IL-2 como promotora da resposta anti-*Leishmania* pelas células T, em especial as CD4+ (CHAUHAN et al., 2019; DAYAKAR et al., 2019; MURRAY et al., 1993). Em um estudo experimental, à inativação da IL-2 através de anticorpos monoclonais sucedeu-se falha no controle da replicação parasitária no fígado (MURRAY et al., 1993). De forma interessante, a adição de IL-2 a amostras de sangue de pacientes com LV estimulou o aumento dos níveis de IFN- γ mas não alterou os níveis de IL-10 (CHAUHAN et al., 2019). Maiores níveis de IL-2 são encontrados em pessoas assintomáticas ou curadas para LV (COSTA, A. et al., 2012; IBARRA-MENESES et al., 2016). Já em pacientes com LV ativa, a detecção de IL-2 é baixa ou ausente (IBARRA-MENESES et al., 2016, 2017). Após o tratamento para LV, é observada rápida elevação dos níveis dessa citocina (DAYAKAR et al., 2019).

Envolvida tanto na resposta inata como na adaptativa, o TNF é descrito como citocina com tendo papel protetor para LV por sua ação de ativação de macrófagos para a morte intracelular de parasitas (DAYAKAR et al., 2019). O papel do TNF no controle da infecção por *Leishmania* é demonstrado em um estudo onde TNF e IFN- γ foram neutralizados através do uso de anticorpos monoclonais anti-TNF e anti-IFN- γ (SINGH; SUNDAR, 2018). Nas amostras com a neutralização dessas citocinas, houve aumento do número de parasitas quando comparada a amostras sem esse bloqueio imune. Ainda nesse estudo, foi observado que esse duplo bloqueio não afeta os níveis de IL-10, porém induz a produção de IL-4 nas amostras estudadas. Em concordância com os estudos experimentais, são reportados dezenas de casos de LV em pessoas em uso de medicamentos anti-TNF para tratamentos em doenças reumatológicas (CATALÀ et al., 2015). Em coinfectados LV-HIV também há relato de níveis mais altos de TNF quando comparados aos das pessoas apenas com HIV (BARBOSA JÚNIOR et al., 2020).

Maior carga parasitária nos casos de leishmaniose cutânea (VERMA et al., 2010), por exemplo, ou em pessoas com LV ativa (COSTA, A. et al., 2012), são relatados como sendo correlacionados a maiores níveis de IL-4. Níveis mais elevados de IL-4 foram também reportados em pessoas coinfectadas com LV-HIV quando comparadas às infectadas apenas com HIV (BARBOSA JÚNIOR et al., 2020), em um estudo onde todos os indivíduos estavam em uso de antirretrovirais e os níveis de CD4 nos coinfectados era três vezes maior. Existe, pois, um papel supressor da IL-4 na resposta imune do tipo Th1 do hospedeiro frente à infecção por *Leishmania*. O impacto negativo na resposta Th1 seria, portanto, não apenas secundário à inibição da produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+, mas também devido ao estímulo que a IL-4 exerce em linfócitos T CD4+ *naïve* para uma resposta Th2 (DAYAKAR et al., 2019). Por outro lado, um estudo experimental em animais observou o papel da IL-4 endógena como adjuvante no tratamento dos animais com LV por *L. donovani* medicados com antimoniato de meglumina (ALEXANDER et al., 2000) – sendo essa uma das drogas disponíveis para o tratamento da LV em humanos, porém não recomendada para os casos de coinfecção com HIV.

IL-6 é uma citocina produzida, entre outras células, por monócitos e linfócitos T. Exerce um papel importante na diferenciação de monócitos em macrófagos (DAYAKAR et al., 2019). Em modelo experimental na infecção por outro

tripanossomatídeo, o *Trypanosoma cruzi*, foi observado com camundongos com deficiência na produção de IL-6 houve grande aumento da produção de óxido nítrico em resposta à infecção parasitária intracelular (SANMARCO et al., 2017). Concluiu-se que essa citocina tem papel regulador da resposta oxidativa por NO. Sabe-se ainda que a IL-6 influencia a produção de IL-17 (KHADER; GOPAL, 2010).

Níveis aumentados de IL-6 estão relacionados também à replicação do HIV (BORGES et al., 2015; TANAKA; KISHIMOTO, 2014), e por isso provavelmente maiores níveis dessa citocina deve ser observado em coinfectados LV-HIV que não estejam em terapia antirretroviral ou que estejam com falha terapêutica e com cargas virais elevadas quando comparados com pessoas com carga viral de HIV indetectável. Também é descrita uma correlação negativa entre IL-6 e contagem de CD4, onde maiores valores de CD4 se correlacionam com menores níveis de IL-6 (BORGES et al., 2015). Estudos anteriores relacionam ainda a IL-6 com maior gravidade dos casos de LV (COSTA, D. et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016), sendo esse fato atribuído a dois mecanismos: pela inibição do TNF na fase inicial da infecção e, após essa fase inicial, pela influência da IL-6 na inibição da resposta Th1 (DOS SANTOS et al., 2016).

A IL-10 é uma citocina regulatória secretada por vários tipos de células do sistema imune, como macrófagos, células NK, células dendríticas, células B e células T (GAUTAM et al., 2011). Em LV esplênica foi demonstrado que células T CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ estavam associadas como grande fonte de IL-10 mRNA (NYLÉN et al., 2007). A IL-10 atua auxiliando outras citocinas, como a IFN- γ , o TNF e a IL-2, para uma resposta efetiva contra a LV (Th1). Por outro lado, de forma contraditória, níveis altos de IL-10 foram associados também a uma maior replicação parasitária (VERMA et al., 2010), podendo estar relacionado a maior gravidade de doença. Isso ser explicado pois a IL-10 inibiria a fagocitose, além de afetar a habilidade dos macrófagos em destruir parasitas intracelulares (NASCIMENTO et al., 2015). Reforçando essa última observação, em estudos experimentais utilizando anticorpos anti-IL-10 foi observado significativa redução da carga parasitária (FALEIRO et al., 2016; GAUTAM et al., 2011), provavelmente pelo efeito secundário de aumento nos níveis de IFN- γ (citocina relacionada à resposta Th1, e portanto, à resposta antiparasitária) (FALEIRO et al., 2016). Em humanos, em um estudo espanhol baixos níveis de IL-10 foram vistos em

casos assintomáticos de LV – já em pessoas com LV ativa, o contrário também foi observado, com valores mais altos dessa citocina (IBARRA-MENESES et al., 2016).

Outra citocina relacionada à infecção por *Leishmania* é a IL-17, relacionada à resposta Th17. A IL-17 é majoritariamente produzida por células T CD4+ e CD8+ ativadas, além das células Th17. Na presença de IL-6 e fator de crescimento beta (TGF- β), células T *naïve* são ativadas a Th17. A IL-17, por sua vez, induz a produção de IL-6, o que estimula novamente a produção de células Th17. O papel da IL-17 é duplo, podendo agir como protetora ou estar relacionada à progressão da doença (DAYAKAR et al., 2019), e esse papel parece ser determinado por diferentes causas, como espécie do parasita e fatores relacionados ao hospedeiro (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). Valores mais elevados de IL-17 são descritos como relacionados à proteção nos casos de LV por *L. donovani* (DAYAKAR et al., 2019; PITTA et al., 2009). A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória presente durante a infecção ativa de leishmaniose, sendo observada queda nos níveis após tratamento eficaz (NASCIMENTO et al., 2015). É descrita, ainda, como intimamente relacionada ao recrutamento de neutrófilos. Experimentos em camundongos mostram alta produção de IL-17 durante o pico de carga parasitária. Essa citocina age de forma sinérgica com IFN- γ , potencializando a produção de óxido nítrico e a atividade leishmanicida dos macrófagos (NASCIMENTO et al., 2015).

3 JUSTIFICATIVA

O número de novos casos de pessoas com HIV aumentou nos últimos anos em Pernambuco (PERNAMBUCO, 2018). Para essas pessoas, uma vez que vivem em área endêmica para LV, e dada a condição de pior prognóstico da coinfeção LV-HIV quando comparada à infecção por LV apenas, é importante saber sobre sua possível condição de coinfectadas. Entretanto, as estatísticas sobre coinfeção LV-HIV no estado têm sido feitas a partir da notificação de pessoas doentes pela LV. Ainda, estima-se que apenas 65% das notificações de LV têm o campo “coinfeção com HIV” preenchidos. Optamos por realizar o estudo no município de Petrolina, local onde são notificados a maior parte dos casos de LV em Pernambuco.

Existe ainda, como desdobramentos de estudos de prevalência de casos assintomáticos de LV em áreas endêmicas, a necessidade – observada através da ausência de estudos sobre – de se conhecer a potencial (ou alternativa) meio de transmissão da LV que é a via sexual. Discute-se isso também na perspectiva de se saber mais sobre o papel dos portadores assintomáticos de LV, podendo esses serem um importante fator na manutenção da transmissão da doença (MOLINA et al., 2020).

Como foi explicitado na revisão de literatura, existe a dificuldade no diagnóstico da LV em pessoas com HIV, principalmente com relação aos testes imunológicos. Dada essa limitação, propusemos o uso de uma nova ferramenta diagnóstica, a partir de um equipamento, já acessível no acompanhamento das pessoas com HIV, que é o citômetro de fluxo.

Por fim, lembramos que até o momento não há consenso sobre biomarcadores que indiquem de forma clara a evolução ou o desfecho dos casos de LV (cura, óbito, latência etc.). Além disso, uma considerável parcela dos estudos sobre a resposta imune de pessoas com LV não leva em consideração os casos de coinfeção com o HIV. Citocinas, moléculas produzidas por linfócitos e que atuam na resposta imune e na inflamação, são alguns dos marcadores estudados para essa finalidade. Dessa forma, e por não haver ainda estudos sobre níveis de citocinas em pessoas coinfectadas com LV e HIV no estado de Pernambuco, justificamos esse projeto de pesquisa.

4 OBJETIVO GERAL

Conhecer o perfil epidemiológico, clínico e laboratorial da coinfeção LV-HIV no estado de Pernambuco.

4.1 Objetivos específicos

- a) Analisar por meio de uma revisão narrativa a transmissão sexual da LV como uma via alternativa em humanos;
- b) Determinar a prevalência da coinfeção LV-HIV e sua relação com aspectos epidemiológicos e laboratoriais em Petrolina, Pernambuco;
- c) Avaliar o desempenho da citometria de fluxo na detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em pacientes infectados pelo HIV;
- d) Comparar os níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 encontradas nos coinfectados LV-HIV assintomáticos com os encontrados em coinfectados LV-HIV sintomáticos.

5 MÉTODO

5.1 Referente ao objetivo específico A

Trata-se de uma revisão narrativa, em formato de artigo de opinião/fórum. Foi realizada uma busca na literatura sobre transmissão sexual de *Leishmania*, em animais e em humanos. Utilizamos, nas bases *PubMed* e *Web of Science* os termos (*sexually OR semen OR venereal OR horizontal*) AND (*leishmaniasis OR leishmania*). Foram encontrados 166 artigos. Artigos em inglês, português, espanhol ou francês foram avaliados.

5.2 Referente ao objetivo específico B

Sobre o objetivo de determinar a prevalência da coinfeção LV-HIV e sua relação com aspectos epidemiológicos e laboratoriais em Petrolina, Pernambuco.

5.2.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo de corte transversal/inquérito epidemiológico para identificação dos casos de coinfeção LV-HIV. Com isso, foi estimada a prevalência da coinfeção LV-HIV no local estudado.

5.2.2 Local do estudo

Nessa etapa, o estudo foi realizado no município de Petrolina, estado de Pernambuco, no Serviço de Assistência Especializada em HIV/AIDS (SAE), vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS). Petrolina, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) possui um território de 4.561km² e uma população no ano de 2018 estimada em 343.865 habitantes, e é o município com mais casos de LV notificados em Pernambuco (DINIZ; SOUZA; CARMO, 2018).

5.2.3 População e amostra

A população do estudo foi composta por pessoas com HIV atendidas no SAE Petrolina, onde estão cadastradas cerca de 600 pessoas com HIV. Considerando uma

prevalência de 16,9% de coinfeção LV-HIV (GUEDES et al., 2018), o tamanho mínimo da amostra deveria ser de 159 indivíduos (para um intervalo de confiança de 95%). Para o cálculo da amostra foi utilizada a plataforma virtual OpenEpi (disponível em <https://www.openepi.com>).

A amostra foi composta por PVHIV de ambos os sexos, de idade igual ou superior a 18 anos e que, de forma consentida (APÊNDICE A), aceitaram participar do estudo. Foi considerado caso de coinfeção LV-HIV qualquer indivíduo com HIV que viesse a apresentar ao menos um teste positivo para LV dentre os testes que foram realizados neste estudo.

5.2.4 Protocolo de investigação de Leishmaniose Visceral

O protocolo de investigação de leishmaniose visceral foi dividido em avaliação epidemiológica, avaliação clínica, avaliação laboratorial e diagnóstico laboratorial da LV.

5.2.4.1 Avaliação epidemiológica

As seguintes informações foram obtidas em entrevista clínica e registradas em formulário próprio (APÊNDICE B): sexo/gênero, idade, escolaridade, estado civil, ocupação; presença de animais em casa; e casos de leishmaniose no domicílio ou na vizinhança; uso de drogas injetáveis.

5.2.4.2 Avaliação clínica

Foram coletadas as seguintes informações clínicas, através de consulta a prontuário médico: presença de comorbidades; presença e tempo de febre; presença de falta de ar e cansaço, sangramentos, tosse, diarreia, perda de peso; presença de hepatomegalia ou esplenomegalia; rarefação de pelos; palidez cutânea; lesões em pele ou mucosa; data de diagnóstico e tempo de infecção pelo HIV; uso de TARV e tempo de uso; histórico de diagnóstico prévio de leishmaniose; histórico de uso de anfotericina B, antimoniato de meglumina ou pentamidina.

5.2.4.3 Avaliação laboratorial

Foram coletados os seguintes resultados de exames por meio de consulta a prontuário: contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos; hemoglobina, hematócrito, plaquetas, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia, creatinina; albumina e globulina séricas. Também foram avaliadas carga viral de HIV e contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+.

5.2.4.4 Diagnóstico laboratorial de LV

Para o diagnóstico de LV em pessoas com HIV atendidas no SAE Petrolina foram utilizados quatro testes para LV, que são: rK39-ICT, DAT, KAtex e PCR convencional em sangue periférico. Foi considerado como caso de coinfeção LV-HIV todo indivíduo com pelo menos um desses testes positivo (BRASIL, 2011).

As informações sobre cada um dos testes e procedimentos são descritas a seguir:

- a) **rK39-ICT** – O teste foi realizado de acordo com as descrições do kit OnSite (InBios International, Seattle, USA). Uma gota de soro é colocada na base da membrana, sendo absorvida, e acrescenta-se três gotas de tampão de teste. Após 10 minutos surge uma linha vermelha superior indicando a presença de imunoglobulina (Ig) G (controle), o que valida o kit. O aparecimento de outra linha vermelha abaixo indica a presença de IgG anti-rK39, sendo considerado nesse caso um resultado positivo.
- b) **DAT** – Para a realização desse exame foi utilizado soro do paciente, obtido por centrifugação do sangue (2.500 rpm por 10 min). O material foi processado de acordo com o protocolo do kit DAT (Biomedical Research, AD Amsterdam). Neste estudo foi considerado como resultado positivo uma titulação igual ou maior que 1:6.400 (EL HARITH et al., 1988).
- c) **KAtex** – Detecção de antígeno de *Leishmania* spp. em urina: Amostras de urina foram obtidas dos pacientes, de forma não invasiva, em recipientes limpos e estéreis, e conservadas sob refrigeração, por poucas horas, à temperatura de 2°C a 8°C, até o momento da análise, a qual foi realizada de acordo com o protocolo KAtex (kit Kalon Biological Ltd, Guildford, UK).

d) **PCR** – As extrações de DNA foram feitas a partir de amostras sanguíneas, utilizando o protocolo *in-house* de Araújo *et al.* (2009), e adaptações, descritas abaixo: 1) adição de 300 microlitros (μL) de sangue em um microtubo de polipropileno de 2mL; 2) acréscimo de 500 μL de SDS 20%, homogeneização em vórtex e incubação a 65°C por 15 minutos; 3) remoção do microtubo da incubação, colocação de 400 μL de clorofórmio e homogeneização em vórtex; 4) adição de 300 μL de solução de precipitação proteica e agitação em vórtex até completa homogeneização; 5) centrifugação durante 10 minutos a 10.000 giros por minuto; 6) pipetagem da fase aquosa para um microtubo de 1,5 ml; 7) adição de 1mL de álcool etílico a 100% ou álcool isopropílico, deixando descansar por pelo menos uma hora sob refrigeração; 8) retirada da incubação e homogeneização por inversão; 9) centrifugação durante três minutos a 10.000 giros por minuto; 10) desprezo do sobrenadante por inversão e adição de 1mL de etanol a 70%; 11) homogeneização por inversão e centrifugação durante 2 minutos a 10.000 giros por minuto; 12) repetição das etapas 10 e 11 do protocolo por mais duas vezes; 13) desprezar o sobrenadante e inverter o microtubo sob papel toalha, por aproximadamente 10 minutos; 14) terminar a secagem do microtubo em *speed-vac* centrifugando a uma temperatura de aproximadamente 30°C durante 10 minutos; 15) eluição da amostra em 100 μL de água livre de nucleases ou de tampão TE. 16) após cada extração, a concentração e a pureza do DNA genômico foram avaliadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000/2000c). Como controle endógeno foi realizado PCR para o gene constitutivo humano de beta-globina, onde se verificou questões como integridade e qualidade do material genético, conforme especificações de Simonato *et al.* (2007). Os alvos utilizados foram os seguintes:

- **ITS-1:** A PCR foi realizada de acordo com as condições descritas por Schönian *et al.* (2003) – desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos e 35 ciclos a 94°C por um minuto; 67°C por dois minutos; 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por cinco minutos – tendo como alvo o espaçador interno transcrito 1 (ITS-1), que produz um fragmento de 300 – 350 pb, a depender da espécie de *Leishmania* spp. Os *primers* utilizados na reação foram LITSR (5'-CTGGATCATTTCGGATG-3') e L5.8S (5'-

TGATACCACTTATCGCACTT-3'), descritos pelos autores supracitados. A amplificação do DNA foi realizada a um *mix* de reação de 50µl, contendo 2µl de DNA molde, 25µl de 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega Corp, Madison, WI) e 2,5µl (10pmol/µl) de cada *primer*. GoTaq® Green Master Mix apresenta as seguintes condições: 2x Green GoTaq *reaction Buffer* (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl₂. A análise e registros do material dos resultados de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0% com coloração pelo brometo de etídio. As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação L-Pix EX (Loccus Bioteclogia, São Paulo, Brasil). Os padrões de bandas foram comparados aos descritos para cada espécie por Schönian *et al.* (2003).

- **kDNA gênero:** Para essa PCR, cujo alvo é o DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*, foram utilizados os seguintes *primers*: 150 (5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA3') e 152 (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3). Esses amplificam um fragmento de 120 pares de base (pb) para todas as espécies de *Leishmania*. Para essa PCR foram seguidas especificações conforme Souza *et al.* (2010).
- **kDNA espécie:** Para confirmação da espécie como *L. infantum* foram utilizados os *primers* RLC2 (5'-GGGAAATTGGCCTCCCTGAG-3') e FLC2 (5'-GTCAGTGTCGGAACTAATCCGC-3'), que amplificam um produto de 230 pb dessa espécie, segundo o protocolo de Gualda *et al.* (2015). A análise e registros do material dos resultados de PCR foram através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% com coloração pelo brometo de etídio. As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Polaroid MP4+ System™ (Sigma St. Louis, MA, USA).

5.2.5 Análise estatística dos dados

Os dados foram inseridos em planilhas do software Microsoft Excel Professional Plus 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, EUA). A análise dos dados foi realizada no software Stata SE 12.0 para Windows (StataCorp, College Station, TX, EUA). Os casos assintomáticos de coinfeção LV-HIV foram comparados com pessoas que eram positivas para HIV apenas. Foram obtidas frequências e médias, com intervalo de confiança de 95%, das variáveis de interesse. Para variáveis binárias e categóricas foi utilizado o teste do qui-quadrado (nível de significância $p < 0,05$). Para variáveis contínuas, usamos o teste Mann-Whitney para duas amostras. As variáveis que mostraram um valor de p menor ou igual a 0,1 na análise univariada foram incluídas em uma análise multivariada por meio de regressão logística.

5.3 Referente ao objetivo específico C

Sobre o objetivo de avaliar o desempenho da citometria de fluxo na detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em pacientes infectados pelo HIV.

5.3.1 Desenho, local, população e amostra

Estudo transversal, retrospectivo, realizado no Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Pernambuco. A população do estudo foi definida pela conveniência do tamanho da amostra de dois estados do Nordeste do Brasil (Pernambuco e Piauí). Foram utilizados soros de 18 indivíduos coinfectados com LV-HIV, todos diagnosticados por exame parasitológico para *Leishmania* através de aspirado de medula óssea e por teste rápido para HIV, e 18 pacientes HIV-positivos LV-negativos, bem como 18 indivíduos controles saudáveis, soronegativos para LV e HIV – confirmados por testes sorológicos convencionais rK39 (teste rápido) e DAT.

5.3.2 Protocolo de pesquisa

As amostras de sangue total foram coletadas em tubos *vacutainer* (BD Biosciences), processadas por centrifugação (1.000 g, por 10min, à temperatura ambiente), inativadas por aquecimento (30min a 56°C) e centrifugadas a 4°C, a 1.000 g por 5 minutos. Após centrifugação, o soro foi aliquoteado e mantido a -20°C até o momento do uso.

5.3.2.1 Diagnóstico da LV

Aspirados de medula óssea (1mL) foram obtidos para detecção de *Leishmania* em esfregaços em lâminas. As lâminas foram coradas com kit de coloração panóptico (Ranylab, Barbacena, Brasil) e avaliadas em microscópio óptico (objetiva de 100×). Foram avaliados pelo menos três esfregaços de medula óssea para cada paciente e de acordo com Da Silva *et al.* (2005). Os testes rápidos baseados em rK39 (IT LEISH) foram adquiridos da *Bio Rad Laboratories* (Marnes-la-Coquette, França), sendo realizados de acordo com as instruções do fabricante. O DAT foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (*Royal Tropical Institute*, Amsterdã, Países Baixos), sendo considerados positivos os soros com títulos de diluição de ao menos 1: 6.400 de acordo com El Harith *et al* (1988).

5.3.2.2 Teste de imunofluorescência indireta (IFAT)

O teste IFAT (*indirect fluorescent antibody test*) foi realizado com um protocolo *in-house*, onde 20µl de uma suspensão antigênica de formas promastigotas de *L. infantum* foram aplicados na região delimitada das lâminas IFAT (PERFECTLAB, São Paulo, Brasil) e mantidos por duas horas a 37°C. As lâminas foram então revestidas com 10µl de soro do paciente, em títulos variando de 1:20 a 1:320, diluído em PBS, pH 7,2. Dois soros controle (positivo e negativo) foram adicionados a lâminas e incubados em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes por imersão em PBS, em intervalos de 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado IgG anti-humano conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Chemical Corp., St. Louis, Estados Unidos da América - EUA) preparado em azul de Evans (40 mg) em PBS (previamente diluído na proporção

de 1:10 no mesmo tampão) foi adicionado às lâminas em uma diluição de 1:50 e incubado nas mesmas condições mencionadas anteriormente. As lâminas foram então lavadas três vezes por 10 minutos em PBS e deixadas em temperatura ambiente. A montagem foi feita com glicerina tamponada pH 8,5 e as lâminas foram observadas por microscopia fluorescente, com objetiva de 100×. Os soros foram considerados positivos a partir da diluição 1:40.

5.3.2.3 ELISA

O teste ELISA foi realizado conforme descrito por Oliveira *et al.* (2011), utilizando 600ng por poço de antígeno bruto de *L. infantum* testado com os vários soros diluídos a 1:900, seguido de incubação com o anti-IgG conjugado com peroxidase (Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, EUA) diluído a 1:2.000. Após a detecção enzimática com o-fenilenodiamina e H₂O₂, a reação foi parada pela adição de 2M H₂SO₄ (50µl/poço) e as placas foram lidas a 490 nm (*Spectra Max 190*, *Molecular Devices, Sunnyvale*, EUA ou *MRX II*, *Dynex Technologies, Chantilly*, EUA). Controles positivos e negativos foram adicionados a cada ensaio. O ponto de corte entre as amostras não reagentes e reagentes foi calculado como a média dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão.

5.3.2.4 Citometria de fluxo

O ensaio de citometria de fluxo foi realizado conforme descrito originalmente por Rocha *et al.* (2002). Promastigotas cultivados de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/70/BH46) foram obtidas e lavadas três vezes em PBS gelado suplementado com 10% de soro fetal bovino, antes da ressuspensão em 1% de paraformaldeído e incubação *overnight*. Seguido por uma nova lavagem e ressuspensão em PBS mais soro fetal bovino a 10%, a suspensão do parasita foi incubada em 96 poços, placas de fundo U (2,5 × 10⁵ / poço) a 37°C por 30 minutos na presença de diferentes diluições de soro (1:64 a 1:8.192), seguido por duas lavagens com PBS - soro fetal bovino a 10%. Os parasitas foram então incubados a 37°C por 30 minutos protegidos da luz e na presença de IgG anti-humana conjugada a FITC diluído a 1: 200 em PBS– soro fetal bovino a 10%. Após mais uma lavagem, os parasitas marcados com FITC foram fixados com 200 µL de paraformaldeído a 1%

e mantidos longe da luz direta por 30 minutos a 4°C até a aquisição de dados no citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson), usando o software *Cell Quest Pro*, com 20.000 eventos por amostra. As promastigotas foram identificados com base em suas propriedades específicas de dispersão de luz frontal (FSC) e lateral (SSC). Após ajustes de ganho de FSC e SSC, os parasitas assumiram uma distribuição característica com esses parâmetros. A intensidade relativa da fluorescência FITC de cada evento foi analisada com uma única representação de histograma. Uma delimitação foi definida no histograma de controle interno conjugado com FITC e aplicada a todas as análises de dados aqui relatadas, a fim de determinar a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra.

A diluição de soro ideal e o ponto de corte de PPFP foram então selecionados para reunir os dados de reatividade de IgG com os melhores índices de desempenho. Os valores obtidos foram plotados como a média do PPFP em relação à diluição inversa dos soros avaliados. Para cada ensaio, além do controle interno conjugado com FITC, controles não marcados em quadruplicadas e controles negativos (um conjunto de soros negativos) e positivos (um conjunto de soros positivos) foram incluídos para validar o ensaio.

5.3.3 Análise estatística

A sensibilidade foi determinada como a fração dos soros coinfectados com LV-HIV confirmados que eram reagentes, e a especificidade foi calculada como a fração de soros não reagentes (controles saudáveis e grupos infectados com HIV) que foram identificados para ser verdadeiramente negativo no teste. As análises estatísticas foram realizadas usando uma tabela de contingência dois por dois com intervalos de confiança binomiais exatos de 95% por meio do *software* OpenEpi (versão 2.3.1, *Centers for Disease Control*, Atlanta, EUA). O grau de concordância foi determinado pelo índice *kappa*, utilizando os critérios de interpretação de Landis e Koch. Os gráficos foram gerados pelo *software* GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, EUA)

5.4 Referente ao objetivo específico D

Sobre o objetivo de comparar os níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 encontradas nos coinfectados LV-HIV assintomáticos com os encontrados em coinfectados LV-HIV sintomáticos.

5.4.1 Desenho, local, população e amostra

Este foi um estudo do tipo transversal, retrospectivo, realizado no Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Pernambuco, nos departamentos de parasitologia e de imunologia.

Foram incluídas amostras dos casos assintomáticos de coinfeção LV-HIV identificados na primeira parte deste projeto, ocorrido no SAE Petrolina; e, para comparação, foram analisadas amostras de casos de coinfeção LV-HIV sintomáticos, hospitalizados, de pessoas de um estudo anterior, armazenadas no IAM; e ainda amostras de controles negativos obtidas de voluntários saudáveis no IAM.

5.4.2 Protocolo de avaliação laboratorial

Os níveis de citocinas foram quantificados usando o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) da Becton Dickinson-BD para as citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A, de acordo com as recomendações do fabricante. Os limites de detecção para essas citocinas, de acordo com o fabricante, são: IFN- γ - 3.7 pg/ml; TNF - 3.8 pg/ml; IL-2 - 2.6 pg/ml; IL-4 - 4.9 pg/ml; IL-6 - 2.4 pg/ml; IL-10 - 4.5 pg/ml; IL-17A - 18.9 pg/ml.

Foram utilizados 25 μ L do soro, 25 μ L dos padrões de citocinas, e 25 μ L de diluente (apenas controle negativo), sendo transferidos para tubos de poliestireno de 5mL. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 25 μ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , anti-TNF, anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10 e anti-IL-17 (*Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit*) e 25 μ L de um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) e com subsequente incubação por 3 horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L da solução de lavagem (*wash buffer*, um reagente presente no kit CBA),

e centrifugadas a 300xg, por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. As esferas foram então ressuspendidas em 250 μ L de *wash buffer*. Foi utilizado então o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, San Jose, California), com subsequente análise utilizando o FCAPArray (BD, San Jose, CA).

5.4.3 Análise estatística dos dados

As diferenças nas proporções das variáveis categóricas por grupo foram comparadas usando o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, conforme apropriado. As diferenças nas medianas por grupo foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. Comparações dos níveis de citocinas entre os três grupos (assintomáticos LV-HIV, sintomáticos LV-HIV e controles negativos) foram realizadas usando o teste de comparações múltiplas de Dunn. O coeficiente de correlação de Spearman (ρ) foi calculado para avaliar a correlação entre as diferentes medições de citocinas e para avaliar a correlação entre os níveis de citocinas e parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes coinfectedos. A análise dos dados foi feita com os softwares Stata SE 12.0 (StataCorp, College Station, TX, EUA) e GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos metodológicos do presente projeto foram condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o código de ética, resolução 466/12 do Conselho nacional de Saúde e complementares. O armazenamento e a utilização do material biológico seguiram os itens da resolução do Conselho Nacional de Saúde 441/2011 e Portaria do Ministério da Saúde 2.201/11 que trata das recomendações para o uso de biorrepositório.

Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICES A e C), sendo garantido o sigilo e anonimato relacionado às informações obtidas na pesquisa em respeito às recomendações da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Relativo ao objetivo A, não foi necessária submissão ao comitê de ética (artigo de revisão). Para o objetivo B houve aprovação pelo Comitê de Ética do IAM/Fiocruz Pernambuco (CAAE 51235815.0.0000.5190). Para os objetivos C e D houve aprovação nos comitês de ética em pesquisa da Universidade Federal do Piauí (0116/2005) e do IAM/Fiocruz Pernambuco (CAEE 51603115.7.0000.5190).

7 ARTIGOS

Nesta seção são apresentados quatro artigos. O primeiro, escrito em colaboração com pesquisadores do *Institute of Tropical Medicine* em Antuérpia, Bélgica, durante o período sanduíche no exterior, publicado em 2020 na revista *Trends in Parasitology*, cujo título é “*Sexual transmission of visceral leishmaniasis: a neglected story*”.

O segundo artigo, intitulado “*Asymptomatic Leishmania infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco, Brazil*”, submetido em julho de 2020 e aceito em dezembro de 2020 para publicação pela revista *PLOS Neglected Tropical Diseases*.

Um terceiro artigo, “*A flow cytometry-based serological assay to detect visceral leishmaniasis in HIV-infected patients*”, publicado na revista *Frontiers in Medicine* em 2021.

Por fim, o artigo intitulado “*Comparison of cytokine levels from symptomatic and asymptomatic HIV-Leishmania coinfecting individuals living in a VL-endemic area*”, diz respeito a avaliação dos níveis de citocinas nos coinfectados LV-HIV e encontra-se em revisão final pelos autores para a submissão.

7.1 Artigo 1: Sexual transmission of visceral leishmaniasis: a neglected story

Resumo

Para a leishmaniose visceral (LV), uma das principais doenças parasitárias transmitidas por vetores, uma via alternativa de transmissão sexual está bem documentada em cães, porém em humanos carecem evidências. Aqui, discutimos o conhecimento atual e as principais questões a serem respondidas, uma vez que este pode ser um obstáculo adicional para os programas de eliminação de LV em andamento.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; transmissão sexual

Forum

Sexual Transmission of Visceral Leishmaniasis: A Neglected Story

Diego L. Guedes ^{1,2,*},
Saskia van Henten,³
Lieselotte Cnops,³
Wim Adriaensen,³ and
Johan van Griensven³



For visceral leishmaniasis (VL), a major vector-borne parasitic disease, an alternative sexual transmission route is well documented in dogs but evidence is lacking in humans. Here, we discuss the current knowledge and key questions to be answered as it may be an additional obstacle in ongoing VL elimination programs.

Transmission Routes of VL

VL is a vector-borne disease caused by parasites of the *Leishmania donovani* complex [1]; it annually affects 20 000 people worldwide [2]. Manifestations range from asymptomatic to chronic active disease which is fatal without treatment [3]. Bone marrow, spleen, and liver are predominant locations of parasite replication but infections have also been found in other organs such as the gastrointestinal tract and skin [4].

While VL-elimination plans are being implemented in the Indian subcontinent, a good understanding of all potential modes of transmission is crucial. In addition to transmission by sandflies, other transmission modes such as via organ transplantation and blood transfusion were demonstrated [1]. Sexual transmission, however, has barely received any attention as a potential route of VL transmission but it could be highly relevant in the final stages of elimination.

What Do We Know of Sexual Transmission in Infectious Diseases?

Sexual transmission can cause unnoticed spreading of pathogens in endemic regions and it might be responsible for new outbreaks by introducing pathogens into new regions. The recent Zika and Ebola virus epidemics have clearly demonstrated that sexual transmission can occur for viral infections with a predominant transmission mode by mosquitos or direct contact, respectively [5,6]. A recent review also highlighted that, for many viral pathogens, the risk of sexual transmission remains unknown and underinvestigated [7]. This is even more pronounced for parasitic diseases, although sexual transmission could be equally important.

For *Entamoeba histolytica*, *Schistosoma haematobium*, *Trypanosoma cruzi*, and *Toxoplasma gondii*, the presence of parasites in semen has been demonstrated [8], but the specific mechanism of how the parasites access the genital tract, and whether they might be sexually transmitted, remains unclear.

Does Sexual Transmission Also Occur in VL?

Viable *Leishmania* parasites have already been found in semen, with a high parasite load in the prepuce, glans penis, epididymis, testis, and prostate of male symptomatic dogs, and to a lesser extent in asymptomatic dogs [9]. A case of potential male-to-female sexual transmission in dogs was reported in Germany, a nonendemic country for VL. The female dog became seropositive despite any history of living in or visiting VL-endemic areas [10]. In a Brazilian study, six of 12 VL-negative female dogs became PCR-positive for *Leishmania* after sexual contact with seropositive male dogs with PCR-positive semen [11]. These findings and other reports in animals strongly support the evidence of male-to-female sexual transmission of *Leishmania* (see Table S1 in the supplemental information online).

Despite the considerable number of studies investigating sexual transmission of VL in animals, this mode of transmission has received little attention in humans (see Table S2 in the supplemental information online). The first report of presumed sexual transmission of *Leishmania* in humans was published in 1960. A woman living in the UK presented with a vaginal lesion with Leishman–Donovan bodies in macrophages, although she had never been in a *Leishmania*-endemic region. It was believed that she had been infected by her husband who had been treated for VL 14 years earlier after visiting several VL-endemic East African countries. Although the husband did not experience all symptoms of active VL disease or genital lesions at the time of the assumed sexual transmission of VL, further clinical examination revealed enlargement of the spleen, liver, and lymph nodes. A lymph node biopsy showed the presence of *Leishmania* parasites, and this was confirmed by culture while his semen was negative by culture [12]. Although only a case report, this raises several questions that need to be addressed:

- How did the wife become infected?
- Could human semen indeed be a route of infection?
- How long are parasites viable for sexual transmission after the initial systemic infection?
- Could *Leishmania* be sexually transmitted during the asymptomatic phase of the infection?

VL with testicular involvement has also been reported in a boy with acute lymphoblastic leukemia [13]. The authors explained that this atypical VL presentation was due to the high parasite load, indicating that *Leishmania* seems to enter the male genital tract in a disseminated infection. The high presence of macrophages in human testicular tissue suggests that the access of *Leishmania* to these sites may be more common than previously thought. In addition, some parasites may be able to

escape from the human immune system inside immune-privileged sites of the sexual tract [7]. Further, anti-*Leishmania* drugs may not have good penetration in this tissue, which could allow the parasite to persist after treatment. It is also likely that underlying immunosuppressive factors, such as HIV, affect the risk of parasite spreading to and persistence in the testes.

Another potential way for sexual transmission of *Leishmania* could be through mucosal or skin lesions of individuals with post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). This condition affected more than 7000 individuals between 2014 and 2018, of which most cases occurred in India [2]. Since PKDL cases with genital involvement were previously reported [14], and the lesions are highly infectious, it would be useful to investigate PKDL patients in future studies on sexual transmission of *Leishmania*.

VL Patients Coinfected with HIV: A Vulnerable Population Group?

Studying sexual transmission of VL in HIV coinfecting individuals seems particularly relevant, as tissue and blood parasite loads are higher in VL–HIV coinfecting individuals [4]. In addition, patients can develop chronic active VL, with frequent symptomatic VL relapses alternating with asymptomatic phases while viable parasites remain continually detectable in the blood [15]. Importantly, a recent study from Spain indicated that, after VL treatment, VL–HIV coinfecting patients can remain infectious to sandflies while being asymptomatic and on secondary prophylaxis. This has raised concerns whether such patients would act as potential super-spreaders [3]. In addition, atypical locations (e.g., gastrointestinal, oral mucosae) of *Leishmania* infection have been described more frequently in HIV patients [4]. HIV might also induce localized inflammation in the sexual reproductive tract [7], exacerbating the infection and facilitating the infiltration of parasites.

All the above could indicate that dissemination to the testes may be more likely in HIV coinfecting patients.

Given that young male adults account for most of the VL–HIV coinfecting cases [1], special attention should be given to this group, especially with regard to control/eradication programs.

How to Study Sexual Transmission of VL?

Although studying sexual transmission of VL is not straightforward, the following important steps can be undertaken to demonstrate sexual transmission of *Leishmania*. A first key step would be to demonstrate the presence and viability of parasites in semen or smegma of VL patients. Secondly, parasite dynamics during and after VL treatment should be studied. We propose to prioritize investigation of sexual transmission in VL–HIV coinfecting patients since these patients usually carry parasites in higher numbers and for a longer duration, which may make it easier to answer important questions on sexual transmission of VL (Box 1).

While collection of semen may be a sensitive and cultural issue, it has been previously done in various settings, including amongst Zika-infected males [5]. Prior to

engaging in such work, social science research should be conducted in the study area to understand the cultural factors determining the acceptability of semen collection. Demographic surveillance sites in VL-endemic areas could be a good context to engage in such studies.

Ideally, qPCR should be done to properly quantify and monitor the parasite load over time. To evaluate the presence of viable parasites, and thus the risk for potential transmission, parasite culture or the detection of *Leishmania* RNA by PCR can be used.

If (viable) parasites are detected in the semen of VL patients (with or without HIV), the next challenging step would be to identify cases of sexually transmitted VL. To demonstrate this in VL-endemic settings might be arduous or even impossible, for several reasons. First, it would require advanced molecular analysis comparing the parasite sequences in sexual partners, similar to what was done in presumptive cases of sexual transmission of Ebola [6]. Second, sufficient genetic variation in circulating parasites would be required. Finally, doubt might remain whether the couple was not infected by the same

Box 1. Important Questions on Sexual Transmission of VL

- i. Can *Leishmania* parasites penetrate the human blood–testis barrier?
 - Can viable parasites be detected in the semen of VL patients?
 - Do anti-*Leishmania* drugs have any penetration in the human genital tract?
- ii. How long does the parasite persist in the semen, and how long can a person sexually transmit *Leishmania*?
 - Is there a specific cut-off level in parasite load in semen at which sexual transmission is possible?
 - Could VL treatment decrease the risk for sexual transmission of *Leishmania*?
- iii. Is sexual transmission of *Leishmania* more likely to occur in specific groups (e.g., persons with HIV or those with another type of immunosuppression)? In HIV-positive individuals, does antiretroviral therapy have a protective effect, preventing *Leishmania* from accessing the genital tract for sexual transmission of VL?
- iv. What is the risk of VL development after sexually transmitted *Leishmania* infection, and who is at risk?
- v. How does sexually transmitted VL manifest? Does it disseminate or lead to venereal or sexual-tract lesions?
- vi. Can genital cutaneous leishmaniasis (CL) or PKDL lesions also lead to transmission of *Leishmania*?
- vii. Could a pregnant woman be infected during the pregnancy and then pass *Leishmania* parasites to her fetus?

parasite strain circulating in sandflies in the area. Proving sexual transmission may be easier in certain settings. For example, in the nonendemic Ethiopian highlands, a high number of seasonal migrants return from work in the highly endemic lowlands. If VL emerges in the highlands, sexual transmission could be studied.

Travel clinics providing services for returning travelers and migrants can play an important role as sentinels, especially those located in VL nonendemic countries. A potential study could entail regular testing for *Leishmania* parasites in the semen of male individuals diagnosed with VL after returning from a VL-endemic area. Regular clinical follow-up of the sexual partner(s) – combined with testing for molecular and serological *Leishmania* markers to detect incident *Leishmania* infections and perhaps even disease – should be carried out. If the parasites could be shown to perfectly match those from the index case, this would strengthen the case for sexual transmission.

Concluding Remarks

Currently, conclusive evidence is lacking to confirm a sexual transmission mode of VL in humans. Nevertheless, data from animals, observations from other pathogens, and a limited number of case reports suggest that sexual transmission is plausible. In the context of VL elimination, a good understanding of all potential modes of transmission is essential, and prospective studies should be designed to address the outstanding questions on this topic. Such knowledge is also highly needed to properly counsel VL patients and their partners.

Acknowledgments

D.L.G. is supported by a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) scholarship – Finance Code 001.

W.A. is personally supported by a Research Foundation-Flanders, Belgium postdoctoral fellowship.

Supplemental Information

Supplemental information associated with this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.002>.

¹Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil

²Curso de Medicina, Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brazil

³Department of Clinical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

*Correspondence:

diego.linsguedes@ufpe.br (D.L. Guedes).

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.002>

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

References

- Burza, S. *et al.* (2018) Leishmaniasis. *Lancet* 392, 951–970
- Ruiz-Postigo, J.A. *et al.* (2020) Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Wkly Epidemiol. Rec.* 25, 265–280
- Molina, R. *et al.* (2020) Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008253
- van Griensven, J. *et al.* (2014) Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 286–299
- Kurscheidt, F.A. *et al.* (2019) Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nat. Rev. Urol.* 16, 211–230
- Mate, S.E. *et al.* (2015) Molecular evidence of sexual transmission of ebola virus. *N. Engl. J. Med.* 373, 2448–2454
- Le Tortorec, A. *et al.* (2020) From ancient to emerging infections: the odyssey of viruses in the male genital tract. *Physiol. Rev.* 100, 1349–1414
- Crespillo-Andujar, C. *et al.* (2018) Evidence for previously unidentified sexual transmission of protozoan parasites. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 602–603
- Diniz, S.A. *et al.* (2005) Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.* 42, 650–658
- Naucke, T.J. and Lorentz, S. (2012) First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniasis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit. Vectors* 5, 67
- Silva, F.L. *et al.* (2009) Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 160, 55–59
- Symmers, W.S.C. (1960) Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet* 275, 127–132
- Kapila, K. *et al.* (1994) Testicular leishmaniasis in a boy with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Cytol.* 38, 878–879
- Singh, A. *et al.* (2015) Histopathological characteristics of post kala-azar dermal leishmaniasis: a series of 88 patients. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 81, 29–34
- Bourgeois, N. *et al.* (2010) 'Active chronic visceral leishmaniasis' in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med.* 11, 670–673

Forum

Host Mast Cells in Leishmaniasis: Friend or Foe?

Nilofer Naqvi,^{1,2}
Rahul Srivastava,¹
Angamuthu Selvapandiyani,³
and Niti Puri^{1,*}



Mast cells (MCs) are skin-resident immune cells whose role in leishmaniasis has been recently explored. Researchers report varying inferences, that is, mast cells promote, eliminate, or have no role in leishmaniasis. This article discusses this heterogeneity in mast cell roles to facilitate potential therapeutic and vaccine interventions for these diseases.

MCs are sentinel immune cells present throughout the host's body. They are the first to interact with invading vector-borne pathogens. They have secretory mediators, a multitude of receptors, and different effector functions enhancing their antimicrobial activity, and can control innate and adaptive immune responses during infection. Twelve million people worldwide are affected by leishmaniasis, ranging from mild cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), to the severe visceral manifestation (VL), caused by the protozoan parasite *Leishmania*. While there is no vaccine, the treatment is expensive and can cause severe side effects and drug resistance. This article teases out the mixed knowledge of MC–*Leishmania* interactions to help researchers develop a vaccine or therapies.

Clinical Studies Exploring the Role of MCs

Clinical studies to explore the functional relevance of MCs in leishmaniasis revealed

7.2. Artigo 2: Asymptomatic *Leishmania* infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco, Brazil

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) em indivíduos HIV-positivos é um problema de saúde global. A coinfeção por HIV-*Leishmania* piora o prognóstico e o risco de mortalidade, e os indivíduos coinfectados por HIV-*Leishmania* são mais suscetíveis a reativações da LV. Realizamos um estudo transversal em Petrolina, Brasil, área endêmica para LV, para estimar a prevalência de casos assintomáticos de *Leishmania* entre pacientes HIV positivos ambulatoriais. **Método:** Convidamos pacientes HIV-positivos, com idade ≥ 18 anos, em terapia antirretroviral e assintomáticos para LV. Eles foram testados para *Leishmania* com ELISA-rK39, teste rápido rK39, teste de aglutinação direta (DAT), teste de aglutinação em látex (KAtex) e reação em cadeia da polimerase convencional (PCR). A coinfeção HIV-*Leishmania* foi diagnosticada quando pelo menos um teste de VL foi positivo. **Resultados:** Um total de 483 pacientes foram incluídos. A amostra foi predominantemente composta por homens solteiros, < 48 anos, pretos/pardos, heterossexuais, com menos de oito anos de escolaridade. A prevalência de coinfeção assintomática HIV-*Leishmania* foi de 9,11% (44/483). Entre os grupos monoinfectados com HIV e coinfectados com HIV-*Leishmania* houve diferença em termos de raça ($p = 0,045$), estado civil ($p = 0,030$) e carga viral do HIV ($p = 0,046$). Pacientes pretos/pardos, pacientes casados e aqueles com carga viral de HIV de até 100.000 cópias/ml apresentaram maior chance de coinfeção HIV-*Leishmania*. **Conclusões:** Um número considerável de casos assintomáticos de LV foi observado entre indivíduos HIV-positivos em uma área endêmica de LV. Diante do potencial impacto coletivo na transmissão e nos custos com saúde, bem como no impacto individual para os pacientes coinfectados, estudos com portadores assintomáticos de LV podem ser úteis para nortear políticas públicas de saúde em áreas endêmicas de LV, visando o controle e eliminação da doença.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; HIV; coinfeção

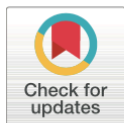
RESEARCH ARTICLE

Asymptomatic *Leishmania* infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco, Brazil

Diego Lins Guedes^{1,2*}, Alda Maria Justo³, Walter Lins Barbosa Júnior², Elis Dionísio da Silva⁴, Samuel Ricarte de Aquino⁵, Manoel Sebastião da Costa Lima Junior⁴, Ulisses Montarroyos³, Gilberto Silva Nunes Bezerra³, Amanda Virginia Batista Vieira³, Valéria Régio Alves Pereira⁴, Zulma Maria de Medeiros^{2,3}

1 Curso de Medicina, Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brasil, **2** Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brasil, **3** Núcleo de Pós-Graduação, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil, **4** Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brasil, **5** Hospital Universitário, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brasil

* diego.linsguedes@ufpe.br



OPEN ACCESS

Citation: Guedes DL, Justo AM, Barbosa Júnior WL, Silva EDd, Aquino SRd, Lima Junior MSdC, et al. (2021) Asymptomatic *Leishmania* infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco, Brazil. PLoS Negl Trop Dis 15(1): e0009067. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009067>

Editor: Asrat Hailu, Addis Ababa University, ETHIOPIA

Received: July 17, 2020

Accepted: December 11, 2020

Published: January 21, 2021

Copyright: © 2021 Guedes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data cannot be shared publicly because of the Brazilian data protection law. Data are available from the Instituto Aggeu Magalhães / Fiocruz Pernambuco Ethics Committee (contact via comiteetica@cpqam.fiocruz.br) for researchers who meet the criteria for access to confidential data.

Funding: DLG and WLBJ were supported with scholarship by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –

Abstract

Background

Visceral leishmaniasis (VL) in HIV-positive individuals is a global health problem. HIV-*Leishmania* coinfection worsens prognosis and mortality risk, and HIV-*Leishmania* coinfecting individuals are more susceptible to VL relapses. Early initiation of antiretroviral therapy can protect against *Leishmania* infection in individuals living in VL-endemic areas, and regular use of antiretrovirals might prevent VL relapses in these individuals. We conducted a cross-sectional study in Petrolina, Brazil, an VL-endemic area, to estimate the prevalence of asymptomatic *Leishmania* cases among HIV-positive outpatients.

Methods

We invited any HIV-positive patients, aged ≥ 18 -years-old, under antiretroviral therapy, and who were asymptomatic for VL. Patients were tested for *Leishmania* with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-rK39, immunochromatographic test (ICT)-rK39, direct agglutination test (DAT), latex agglutination test (KAtex), and conventional polymerase chain reaction (PCR). HIV-*Leishmania* coinfection was diagnosed when at least one VL test was positive.

Results

A total of 483 patients were included. The sample was predominantly composed of single, < 48-years-old, black/*pardo*, heterosexual males, with fewer than 8 years of schooling. The prevalence of asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfection was 9.11% (44/483). HIV mono-infected and HIV-*Leishmania* coinfecting groups differed statistically significantly in terms of race ($p = 0.045$), marital status ($p = 0.030$), and HIV viral load ($p = 0.046$). Black/*pardo*

Brasil (<https://www.capes.gov.br/>) – Finance Code 001; AVBV and ZMM were supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (<http://www.facepe.br/>), grant number APQ 1712-4.01/15; ZMD was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (<http://cnpq.br/>), grant number 400729/2019-9. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

patients, married patients, and those with an HIV viral load up to 100,000 copies/ml presented higher odds for HIV-*Leishmania* coinfection.

Conclusions

A considerable number of asymptomatic *Leishmania* cases were observed among HIV-positive individuals in a VL-endemic area. Given the potential impact on transmission and health costs, as well as the impact on these coinfecting individuals, studies of asymptomatic *Leishmania* carriers can be useful for guiding public health policies in VL-endemic areas aiming to control and eliminate the disease.

Author summary

Every year up to 90,000 new cases of visceral leishmaniasis (VL) occurs globally. One of the most neglected diseases, VL is endemic in 60 countries in four continents. Brazil is one of seven countries in which 90% of all cases in the world occur. When co-occurring with HIV, VL tends to be more severe than in HIV-negative persons, leading to worse prognosis and frequent relapses. In this study HIV-positive outpatients, aged 18 years or older, under antiretroviral therapy, who were asymptomatic for VL, were tested for *Leishmania*. We observed a prevalence of 9.11% (44/483) of HIV-*Leishmania* coinfection. For those HIV-positive/*Leishmania*-negative individuals who live in VL-endemic areas, early initiation of antiretroviral therapy can be a protective factor against *Leishmania* infection. On the other hand, for HIV-*Leishmania* coinfecting individuals who regularly use antiretrovirals might prevent VL relapses. Studies centering on asymptomatic *Leishmania* carriers can be useful for guiding public health measures in VL-endemic areas seeking to control and eliminate the disease.

Introduction

One of the most neglected diseases [1], visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease that mostly affects tropical and subtropical regions [2,3]. Endemic to more than 60 countries, it is estimated that 50,000–90,000 cases occur annually worldwide [4]. Brazil and six other countries account for about 90% of all cases [3]. In the American continent, the majority of VL-positive individuals reside in Brazil [5]. Most of VL cases in Brazil are notified in the Northeast region, and Pernambuco is a VL-endemic area [6].

VL is considered to be an opportunistic infection for those living with the human immunodeficiency virus (HIV) [7]. HIV-positive individuals who live in VL-endemic areas have an increased risk of *Leishmania* infection as compared to HIV-negative individuals [8]. When VL occurs in HIV-infected individuals, the prognosis is typically poor and the mortality rate is high [9]. Consequently, several countries have performed studies to estimate the prevalence of *Leishmania* infection in HIV-positive individuals [10–15].

Asymptomatic *Leishmania* infected individuals, despite the typically low parasite load, might contribute to maintaining the transmission cycle of *Leishmania* parasites in endemic regions during episodes of increased parasite load and disease relapse [16,17]. In Brazil, due to the high prevalence of HIV-*Leishmania* coinfection observed in previous studies [10,15,18], and due to the other potential implications (e.g. frequent relapses, mother-to-child

transmission [19]), testing for *Leishmania* should be strongly recommended for all HIV-positive individuals. In addition, once HIV-*Leishmania* coinfection is diagnosed, early start of highly active antiretroviral therapy (HAART) should be recommended as a protective factor against VL relapses [20]. Moreover, for those HIV-positive individuals who are negative for leishmaniasis and are living in VL-endemic areas, HAART could decrease the risk of *Leishmania* infection [21].

The Brazilian national HIV/AIDS program assists all persons who live with HIV with HAART, free of charge, and in the same way it provides treatment for all individuals affected by VL. Despite the impact on the public health system, there have been few studies following up these HIV-*Leishmania* coinfection cases. Most of these studies have focused on hospitalized patients. However, testing for *Leishmania* in HIV-positive outpatients in VL-endemic areas may be useful for guiding health policies aiming to control and eliminate leishmaniasis, and it could improve treatment and outcomes for those affected by the disease.

In this study, we aimed to estimate the prevalence of asymptomatic *Leishmania* cases in HIV-positive outpatients under continuous use of HAART, in a VL-endemic area, Pernambuco, in Northeast Brazil.

Methods

Ethics statement

The study was approved by the research ethics committee of Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz Pernambuco (approval number 51235815.0.0000.5190). All subjects were adults and provided written, informed consent. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Study design and sample

We performed a cross-sectional study aiming to estimate the prevalence of HIV-*Leishmania* coinfection in HIV-positive outpatients from the municipality of Petrolina, in the state of Pernambuco, Brazil. Petrolina is an VL-endemic area from where most VL cases in the state of Pernambuco are reported [22]. The study was conducted in a public HIV outpatient clinic, which serviced about 600 individuals regularly using HAART at the time of this investigation.

The study population included any HIV-positive patients, using HAART, aged 18-years-old or older. Individuals under treatment for VL and those with current VL symptoms were excluded. Based on a previous prevalence study in Pernambuco [18], the minimum sample size was calculated to be 159 individuals for a 95% confidence interval (Epi Info 7.2.3.0 software, <https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>). We publicly invited patients at this outpatient clinic to participate in the study. Many of them demonstrated interest in knowing their serological status for *Leishmania*, as they resided in an endemic area. Due to the high demand, we decided to include anyone who requested to be tested. Therefore, there was a higher number of participants recruited compared to the originally calculated sample size. Each participant received the results of the tests done in the study.

Data collection and laboratory procedures

After the interview and physical examination, peripheral venous blood and urine samples were collected from the patients at the same time when the samples were taken for analyzing the lymphocyte T CD4+ (LTCD4+) count or HIV viral load. The samples were stored, processed, and analyzed at Fiocruz Pernambuco, a referral public research center. Participants were tested for VL with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-rK39,

immunochromatographic test (ICT)-rK39, direct agglutination test (DAT), latex agglutination test (KAtex) and polymerase chain reaction (PCR) test. All HIV-positive individuals with at least one positive test for VL were considered HIV-*Leishmania* coinfection cases. Hemogram, biochemistry, LTCD4+ count, and HIV viral load data were obtained from the medical records.

For the ELISA-rK39 assays, the commercial recombinant rK39 antigen was purchased from Rekom Biotech (Granada, Spain) and the assays were essentially carried out as previously described by Scalone et al [23] and Abass et al [24]. For ICT-rK39, we used the OnSite Leishmania IgM/IgG Combo test (CTK Biotech, Inc., Poway, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

For DAT, we used a freeze-dried antigen from Biomedical Research (Amsterdam, The Netherlands) and titers of 1:3,200 or higher were considered to indicate a positive test [25]. *Leishmania* antigen was detected in urine by means of the KAtex kit (Kalon Biological Ltd., Guildford, UK) according to the manufacturer's instructions.

For PCR, we targeted the kinetoplast DNA of *Leishmania* (kDNA). We used the following primers: 150 5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA3' and 152 5'-(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3', which amplify a fragment of 120 bp for all *Leishmania* species. Details on the PCR conditions were described by Souza et al [26]. To confirm the species (*L. Infantum*), we used primers RLC2 5'-GGGAAATTGGCCTCCCTGAG-3' and FLC2 5'-GTCAGTGTGCGAAACTAATCCGC-3', which amplify a product of 230 bp, according to Gualda et al [27]. The results were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide and were visualized under ultra-violet light.

Statistical analysis

Data were entered and stored on spreadsheets using Microsoft Excel Professional Plus 2016 software (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Data analysis was performed in Stata SE 12.0 software for Windows (StataCorp, College Station, TX, USA).

Frequencies and means with 95% confidence interval of the variables of interest were obtained. We compared an HIV mono-infected and an HIV-*Leishmania* coinfection group. For binary/categorical variables, the chi-square test was used (significance level $p < 0.05$). For continuous variables, we used the two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test. Variables that yielded a p -value ≤ 0.1 in univariate analysis were included in a multivariate analysis using logistic regression.

Results

Of 487 HIV-positive individuals who agreed to enroll in the study, three individuals were excluded as they presented typical symptoms of VL and one individual was excluded for not using HAART. The study population was composed mainly of single (45.5%), black/*pardo* (83.4%), heterosexual (58.2%) men (61.3%) with 8 or fewer years of schooling (48.24%). About 3% reported using intravenous drugs (Table 1).

The prevalence of HIV-*Leishmania* coinfection was 9.11% (44/483). The highest positivity by VL test was seen with DAT (3.53%), followed by ELISA-rK39 (2.48%), and PCR kDNA (2.28%) (Table 2). Two individuals tested positive with DAT and KAtex, and one person tested positive with DAT and rK39. In addition, of the individuals who tested positive for *Leishmania* spp, three (6.8%) reported having had previous diagnoses of VL, and all of whom reported having been treated.

Regarding general laboratory findings, all results were compatible with the reference standards (Table 3). When the two groups were compared, we observed statistically significant

Table 1. Comparison of epidemiological characteristics between HIV-*Leishmania* coinfecting and HIV mono-infected groups (univariate analysis) among HIV-positive individuals tested for *Leishmania* in Petrolina, Brazil.

Variables	HIV mono (N = 439)		HIV- <i>Leishmania</i> (N = 44)		p-value
	n	(%)	n	(%)	
Gender					
Female	170	(38.7)	17	(38.6)	
Male	269	(61.3)	27	(61.4)	0.991
Age (years)					
18–27	70	(15.9)	7	(15.9)	
28–37	109	(24.8)	7	(15.9)	
38–47	140	(31.9)	17	(38.6)	0.582
48 or more	120	(27.3)	13	(29.5)	
Years of schooling					
0–8	211	(48.1)	22	(50.0)	0.751
9–11	162	(36.9)	14	(31.8)	
12 or more	66	(15.0)	8	(18.2)	
Marital status					
Separated/divorced/widowed	65	(14.8)	2	(4.5)	
Married/stable union	168	(38.3)	28	(63.6)	0.003
Single	206	(46.9)	14	(31.8)	
Race					
White	73	(16.6)	1	(2.3)	
Black/ <i>pardo</i>	336	(83.4)	43	(97.7)	0.039
Indigenous	1	(0.2)	0	(–)	
Sexual orientation					
Did not inform	86	(19.6)	7	(15.9)	
Heterosexual	257	(58.5)	24	(54.5)	0.576
Homosexual	76	(17.3)	9	(20.4)	
Bisexual	20	(4.6)	4	(9.1)	
Use of intravenous drugs					
No	426	(97.0)	43	(97.7)	0.795
Yes	13	(3.0)	1	(2.3)	
Dogs at home					
No	274	(91.3)	165	(90.2)	0.665
Yes	26	(8.7)	18	(9.8)	

All percentages are column percentages

Pardo is a specific Brazilian self-declared race, non-white

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009067.t001>

Table 2. Prevalence of asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfection cases in outpatients from Petrolina, Brazil, according to VL test done.

VL tests	Positivity	Prevalence (%)
ELISA-rK39	12/483	2.48
rK39-ICT	5/470	1.06
DAT	17/482	3.53
KAtex	2/483	0.41
PCR kDNA	11/482	2.28
DAT and KAtex	2/482	0.41
DAT and rK39-ICT	1/470	0.21
Total (at least one positive test)	44/483	9.11

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009067.t002>

Table 3. Comparison of general laboratory characteristics between HIV-*Leishmania* coinfecting and HIV mono-infected groups (univariate analysis) among HIV-positive individuals tested for *Leishmania* in Petrolina, Brazil.

Variables	HIV mono		HIV- <i>Leishmania</i>		p-value
	Mean	(95CI)	Mean	(95CI)	
White blood cells (cells/mm ³)	5793	(5583–6002)	5325	(4770–5881)	0.289
Hemoglobin (g/dL)	13.8	(13.6–14.0)	13.7	(13.0–14.4)	0.706
Platelets (x10 ³) (cells/mm ³)	255	(247–264)	263	(238–288)	0.586
AST (U/L)	31.3	(29.1–33.5)	31.1	(26.4–36.0)	0.880
ALT (U/L)	29.6	(27.7–31.5)	26.8	(22.1–31.4)	0.918
Creatinine (mg/dL)	0.82	(0.80–0.85)	0.90	(0.82–0.97)	0.188

95CI, 95% confidence interval; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009067.t003>

differences in terms of marital status ($p = 0.003$) and race ($p = 0.039$), with HIV-*Leishmania* coinfection being more frequent in married and black/*pardo* individuals. No general laboratory characteristic showed a statistically significant difference between the groups. In terms of HIV infection status (Table 4), the LTCD4+ count was greater than 350 cells/mm³ in 74.4% of the general sample, with no difference between the two groups. Most individuals (73.4%) had an undetectable HIV viral load. When we correlated the LTCD4+ count with the VL tests performed, we observed no statistically significant differences.

Marital status, race, and HIV viral load remained significant in the multivariate model (Table 5). Black/*pardo* individuals were at an increased risk (odds ratio, OR: 7.85; $p = 0.044$) of being HIV-*Leishmania* co-infected, as compared with white individuals. Marriage/stable unions and a detectable HIV viral load up to 100,000 copies/mL were also associated with an increased risk (OR: 5.12, $p = 0.029$ and OR: 2.01, $p = 0.047$, respectively).

Discussion

This study focused on HIV-*Leishmania* coinfection in outpatients in Pernambuco, which had not been reported previously. The prevalence of asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfection was 9.11% (44/483). There were statistically significant differences between the HIV mono-infected and HIV-*Leishmania* coinfecting groups in terms of race ($p = 0.045$), marital status ($p = 0.030$), and HIV viral load ($p = 0.046$). Black/*pardo* patients, married patients, and those

Table 4. Comparison of HIV infection-related characteristics between HIV-*Leishmania* coinfecting and HIV mono-infected groups (univariate analysis) among HIV-positive individuals tested for *Leishmania* in Petrolina, Brazil.

Variables	HIV mono		HIV- <i>Leishmania</i>		p-value
	n	(%)	n	(%)	
HIV viral load (copies/ml)					
Undetectable (<50)	326	(74.4)	28	(63.6)	0.099
Up to 100,000	90	(20.5)	15	(34.1)	
100,000 or more	22	(5.0)	1	(2.3)	
LTCD4+ count (cells/mm³)					
Up to 200	43	(10.1)	5	(11.9)	
200 to 350	66	(15.5)	6	(14.3)	
350 or more	318	(74.5)	31	(73.8)	0.922

All percentages are column percentages; LTCD4+, lymphocyte T CD4+

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009067.t004>

Table 5. Odds ratios for asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfection based on multivariate analysis.

Variable	OR	95CI	p-value
Race			
White	1		
Black/ <i>pardo</i>	7.85	1.05–58.39	0.044
Marital status			
Separated/Divorced/Widow	1		
Married/Stable union	5.12	1.17–22.29	0.029
Single	1.99	0.44–9.09	0.374
HIV viral load (copies/ml)			
Undetectable (<50)	1		
Up to 100,000	2.01	1.01–4.05	0.047
100,000 or more	0.70	0.09–5.60	0.740

OR odds ratio; 95CI 95% confidence interval

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009067.t005>

with an HIV viral load up to 100,000 copies/mL presented higher odds for HIV-*Leishmania* coinfection.

The prevalence of asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfection in this study (9.1%) was lower than that in a previous study in Pernambuco of hospitalized HIV-positive patients who were tested for VL (16.9%) [18]. This previous study involved three referral hospitals for infectious diseases that serviced the entire state. Despite the higher percentage, compared with the current study, there were fewer cases (35 vs 44) and we tested more individuals (483 vs 207). A similar study in Minas Gerais, Southeastern Brazil, observed a prevalence of asymptomatic *Leishmania* infection in HIV-positive individuals of 20% [15]. Minas Gerais is a Brazilian state with high VL endemicity, and it would be expected to have a higher prevalence than that observed in our study. In the Metema district of Northwestern Ethiopia, a pilot study in HIV-infected adults identified a prevalence of 12.8% in males and 4.2% in females for asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfection cases, based on the same tests used in the present study [28].

In the VL tests used, we observed a low coincidence of results. Based on previous studies [15,28,29], a large variation in the test results could be expected. Furthermore, the sample consisted of HIV-positive individuals with no suspicion of VL. The highest prevalence rate was observed with the DAT, a test with high sensitivity that is considered to be a good diagnostic tool for immunocompromised individuals [30,31]. The DAT has also showed the highest prevalence rate in a previous prevalence study in Pernambuco with symptomatic patients [18]. We observed a low prevalence with the ICT-rK39 rapid test (1%). Apparently, this is not the best serological screening test for individuals living in *L. infantum*-endemic regions [15,18,29,30]. Despite the reduced sensitivity of serological tests for VL in HIV-positive individuals [8,30], this type of test should not be excluded, as a positive result should be considered when associated with clinical features [32]. Serological tests are important as screening tests for VL, particularly in VL-endemic areas and for detection of asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfecting persons, as they normally have higher LTCD4+ counts. In our study, most participants had an LTCD4+ count exceeding 350 cells/mm³, and thus they had potentially similar humoral response as HIV-negative persons.

In terms of epidemiological aspects, we observed statistically significant differences for race and marital status. Indeed, in Brazil race and poverty are strongly connected, and most people affected by neglected tropical diseases live in low income regions [33], such as the region in which this study was performed.

The mean LTCD4+ count in HIV-*Leishmania* co-infected individuals was similar to that observed in the HIV mono-infected group. In the present study, almost three-quarters of all individuals presented with LTCD4+ exceeding 350 cells/mm³. Most participants from the previous study of hospitalized patients in Pernambuco had LTCD4+ counts lower than 200 cells/mm³ in both groups (VL-HIV and HIV) [18]. New cohort studies with paired samples may better explain the behavior of *Leishmania* infection in our population. In the present study, all HIV-positive individuals were on HAART, which explains the higher LTCD4+ count, and which might be a protective factor against developing VL.

We observed that, a detectable viral load, although lower than 100,000 copies/ml, was associated with *Leishmania* infection. As all patients were asymptomatic, this could indicate an initial HAART failure or irregular use of the treatment. In the previous study of hospitalized VL-HIV coinfecting patients, only 16% had an undetectable viral load [18], while in the present study the viral load was undetectable in 63% of the coinfecting individuals. Since regular use of HAART usually increases the LTCD4+ count, which, in turn, is a protective factor against VL relapses, campaigns to encourage the regular use of antiretrovirals should be intensified among individuals living with HIV in VL-endemic areas. In Brazil, to date, only secondary prophylaxis for VL is recommended, and the only one marker used to guide this prophylaxis is the LTCD4+ count.

The factors determining maintenance of an asymptomatic VL state have not yet been established. This balance between the parasite infection and the host's immune response, such as, for example, in blood donors or in HIV-AIDS patients, probably extends beyond nutritional status and genetic factors. Due to the increased risk of relapses and the poor prognosis, it is important for HIV-positive persons, particularly those living in VL-endemic areas, to know about a previous *Leishmania* infections. Identification of new markers or tests that might delimit active disease, suggest cure, and predict relapses is urgent. It may be challenging to distinguish active VL cases from another opportunistic infection, and new and less-invasive markers for VL could help health professionals in making more accurate diagnoses and consequently avoiding unnecessary treatments.

Conclusions

Visceral leishmaniasis remains an important problem in Brazil, particularly in the Northeastern region. We observed a considerable number of asymptomatic *Leishmania* cases in HIV-positive individuals. Studies focusing on health care of asymptomatic individuals could be useful for public health policies in VL-endemic areas, facilitating monitoring of the progress of leishmaniasis control. In addition, at the individual level, it is important to follow up all these HIV-*Leishmania* coinfecting persons in terms of VL prophylaxis and treatment, and to predict relapses. Consequently, we strongly recommend testing for *Leishmania* in all HIV-positive individuals in VL-endemic areas.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Johan van Griensven for review the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Diego Lins Guedes, Valéria Rêgo Alves Pereira, Zulma Maria de Medeiros.

Data curation: Diego Lins Guedes, Alda Maria Justo, Walter Lins Barbosa Júnior, Elis Dionísio da Silva, Ulisses Montarroyos, Amanda Virginia Batista Vieira, Zulma Maria de Medeiros.

Formal analysis: Diego Lins Guedes, Ulisses Montarroyos, Zulma Maria de Medeiros.

Funding acquisition: Zulma Maria de Medeiros.

Investigation: Diego Lins Guedes, Alda Maria Justo, Walter Lins Barbosa Júnior, Elis Dionísio da Silva, Samuel Ricarte de Aquino, Manoel Sebastiao da Costa Lima Junior, Gilberto Silva Nunes Bezerra, Amanda Virginia Batista Vieira, Valéria Rêgo Alves Pereira, Zulma Maria de Medeiros.

Methodology: Diego Lins Guedes, Valéria Rêgo Alves Pereira, Zulma Maria de Medeiros.

Project administration: Diego Lins Guedes, Valéria Rêgo Alves Pereira, Zulma Maria de Medeiros.

Resources: Valéria Rêgo Alves Pereira, Zulma Maria de Medeiros.

Supervision: Diego Lins Guedes, Valéria Rêgo Alves Pereira, Zulma Maria de Medeiros.

Visualization: Diego Lins Guedes, Walter Lins Barbosa Júnior, Elis Dionísio da Silva, Zulma Maria de Medeiros.

Writing – original draft: Diego Lins Guedes.

Writing – review & editing: Diego Lins Guedes, Alda Maria Justo, Walter Lins Barbosa Júnior, Elis Dionísio da Silva, Samuel Ricarte de Aquino, Manoel Sebastiao da Costa Lima Junior, Ulisses Montarroyos, Gilberto Silva Nunes Bezerra, Amanda Virginia Batista Vieira, Valéria Rêgo Alves Pereira, Zulma Maria de Medeiros.

References

1. Okwor I, Uzonna J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94: 489–493. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408> PMID: 26787156
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Kirk M, editor. *PLoS One.* 2012; 7: e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> PMID: 22693548
3. WHO. WHO website—Leishmaniasis: fact sheets. 2019. Available: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
4. Burza S, Croft SL, Boelaert M, Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018; 392: 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2) PMID: 30126638
5. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. 2019. p. 8.
6. Bezerra JMT, de Araújo VEM, Barbosa DS, Martins-Melo FR, Werneck GL, Carneiro M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990–2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. van Griensven J, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12: e0006697. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006697> PMID: 30188898
7. Pasquau F, Ena J, Sanchez R, Cuadrado JM, Amador C, Flores J, et al. Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24: 411–418. <https://doi.org/10.1007/s10096-005-1342-6> PMID: 15928908
8. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet J-P, et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21: 334–359. <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07> PMID: 18400800
9. Henn GA de L, Ramos Júnior AN, Colares JKB, Mendes LP, Silveira JGC, Lima AAF, et al. Is Visceral Leishmaniasis the same in HIV-coinfected adults? *Brazilian J Infect Dis.* 2018; 22: 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.03.001> PMID: 29601790
10. Carranza-Tamayo CO, de Assis TSM, Neri ATB, Cupolillo E, Rabello A, Romero GAS. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasília, Federal

- District, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103: 743–8. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.01.014> PMID: 19232657
11. Cota GF, de Sousa MR, de Mendonça ALP, Patrocínio A, Assunção LS, de Faria SR, et al. Leishmania-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e2816. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002816> PMID: 24743472
 12. Diro E, Lynen L, Ritmeijer K, Boelaert M, Hailu A, van Griensven J. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in East Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e2869. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002869> PMID: 24968313
 13. Echchakery M, Nieto J, Boussaa S, El Fajali N, Ortega S, Souhail K, et al. Asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) in Morocco. *Parasitol Res.* 2018; 117: 1237–1244. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5805-y> PMID: 29478175
 14. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. Valenzuela JG, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e3021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003021> PMID: 25144380
 15. Orsini M, Canela JR, Disch J, Maciel F, Greco D, Toledo A, et al. High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106: 283–8. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.01.008> PMID: 22348817
 16. Das VNR, Siddiqui NA, Verma RB, Topno RK, Singh D, Das S, et al. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: A challenge to kala-azar elimination programmes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105: 661–666. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.08.005> PMID: 21945327
 17. Molina R, Jiménez M, García-Martínez J, San Martín JV, Carrillo E, Sánchez C, et al. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. Schönian G, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14: e0008253. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008253> PMID: 32324738
 18. Guedes DL, Medeiros Z, Dionísio da Silva E, Martins de Vasconcelos AV, Santana da Silva M, Lopes da Silva MA, et al. Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV-Infected Patients in Pernambuco, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 99: 1541–1546. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0787> PMID: 30328408
 19. Argy N, Lariven S, Rideau A, Lemoine A, Bourgeois Moine A, Allal L, et al. Congenital Leishmaniasis in a Newborn Infant Whose Mother was Coinfected With Leishmaniasis and HIV. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2020; 9: 277–280. <https://doi.org/10.1093/pids/piz055> PMID: 31589299
 20. Abongomera C, Diro E, Vogt F, Tsoumanis A, Mekonnen Z, Admassu H, et al. The Risk and Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients in Ethiopia: A Retrospective Cohort Study. *Clin Infect Dis.* 2017; 65: 1703–1710. <https://doi.org/10.1093/cid/cix607> PMID: 29020196
 21. López-Vélez R. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97: 143–147. <https://doi.org/10.1179/000349803225002615> PMID: 14678641
 22. Diniz LFB, de Souza CDF, do Carmo RF. Epidemiology of human visceral leishmaniasis in the urban centers of the lower-middle São Francisco Valley, Brazilian semi-arid region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018; 51: 461–466. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0074-2018> PMID: 30133628
 23. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002; 104: 275–285. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00643-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00643-4) PMID: 11836028
 24. Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, et al. rKLO8, a Novel *Leishmania donovani*-Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002322> PMID: 23875052
 25. El Harith A, Kolk AHJ, Leewenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T, et al. Improvement of a Direct Agglutination Test for Field Studies of Visceral Leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology.* 1988. pp. 1321–1325. <https://doi.org/10.1128/JCM.26.7.1321-1325.1988> PMID: 3410946
 26. Souza NP, de Almeida A do BPF, de Freitas TPT, da Paz RCR, Dutra V, Nakazato L, et al. *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43: 333–335. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000300024> PMID: 20563507
 27. Gualda KP, Marcussi LM, Neitzke-Abreu HC, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Cardoso RF, et al. New Primers for Detection of *Leishmania infantum* Using Polymerase Chain Reaction. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57: 377–83. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500002> PMID: 26603223

28. van Griensven J, van Henten S, Mengesha B, Kassa M, Adem E, Endris Seid M, et al. Longitudinal evaluation of asymptomatic *Leishmania* infection in HIV-infected individuals in North-West Ethiopia: A pilot study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13: e0007765. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007765> PMID: 31593563
29. de Gouvêa Viana L, de Assis TSM, Orsini M, da Silva AR, de Souza GF, Caligiome R, et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi carriers who present modulated cytokine profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008; 102: 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.02.007> PMID: 18367221
30. Cota GF, de Sousa MR, de Freitas Nogueira BM, Gomes LI, Oliveira E, Assis TSM, et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 89: 570–7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0239> PMID: 23836568
31. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect Dis Clin North Am*. 2019; 33: 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005> PMID: 30712769
32. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis. Boelaert M, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6: e1665. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001665> PMID: 22666514
33. Lindoso JAL, Lindoso AABP. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo; 2009. pp. 247–253. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652009000500003> PMID: 19893976

7.3 Artigo 3: A flow cytometry-based serological assay to detect visceral leishmaniasis in HIV-infected patients

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária grave que emergiu como uma importante condição oportunista em pacientes com HIV, e cujo controle é prejudicado por uma identificação imprecisa. Isso se deve principalmente ao fato dos testes sorológicos utilizados para LV terem um desempenho reduzido nos casos de coinfeção LV-HIV por haver uma baixa resposta humoral. Nessa situação, entretanto, um teste positivo tem valor diagnóstico ainda maior quando associado ao quadro clínico. Este estudo teve como objetivo avaliar a aplicação e o desempenho da citometria de fluxo na detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em pacientes infectados pelo HIV. **MÉTODOS:** Os soros de pacientes coinfectados LV-HIV, diagnosticados por técnicas de “padrão ouro”, foram comparados com os soros de controles saudáveis e com os soros de indivíduos infectados com HIV. Os resultados da citometria de fluxo foram expressos como níveis de reatividade de IgG, com base na porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP). **RESULTADOS:** Uma análise da curva ROC de uma titulação sérica indicou um PPFP de 1,26% como sendo o ponto de corte para separar os resultados positivos e negativos. Na diluição 1: 2.048, com sensibilidade de 89% e especificidade de 83%, a citometria de fluxo apresentou maior sensibilidade em relação aos testes sorológicos avaliados. Além disso, a citometria de fluxo foi o único ensaio que identificou positivamente todos os pacientes com VL-HIV com carga de HIV quantificada. **CONCLUSÃO:** Juntos, esses achados sugerem que a citometria de fluxo pode ser usada como uma abordagem sorológica alternativa para a identificação de LV e como uma ferramenta para caracterizar a resposta humoral contra *Leishmania infantum* em pacientes infectados pelo HIV.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; HIV; AIDS; diagnóstico; citometria de fluxo.



A Flow Cytometry-Based Serological Assay to Detect Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients

Elis D. da Silva^{1*}, Beatriz C. de Oliveira¹, Allana M. de S. Pereira¹, Diego L. Guedes¹, Osvaldo P. de Melo Neto¹, Carlos H. N. Costa², Zulma M. de Medeiros¹ and Valéria R. A. Pereira¹

¹ Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil, ² Laboratory of Leishmaniasis, Natan Portella Institute of Tropical Medicine, Teresina, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Jaime A. Cardona-Ospina,
Fundación Universitaria Autónoma de
las Américas, Colombia

Reviewed by:

Jorge Enrique Gómez Marín,
University of Quindío, Colombia
Laila Woc-Colburn,
Emory University, United States
Sergio Oscar Angel,
CONICET Instituto Tecnológico de
Chascomús (INTECH), Argentina

*Correspondence:

Elis D. da Silva
dionisio.elis@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases - Surveillance,
Prevention and Treatment,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 18 April 2020

Accepted: 08 April 2021

Published: 30 April 2021

Citation:

da Silva ED, de Oliveira BC,
Pereira AMdS, Guedes DL, de Melo
Neto OP, Costa CHN, de
Medeiros ZM and Pereira VRA (2021)
A Flow Cytometry-Based Serological
Assay to Detect Visceral
Leishmaniasis in HIV-Infected
Patients. *Front. Med.* 8:553280.
doi: 10.3389/fmed.2021.553280

Visceral Leishmaniasis (VL) is a severe parasitic disease that has emerged as an important opportunistic condition in HIV-infected patients and whose control is impaired by inaccurate identification. This is mainly due to the serological tests used for VL having a reduced performance in cases of VL-HIV coinfection due to a low humoral response. In this situation, however, a positive test has even greater diagnostic value when combined with the clinical status. This study aimed to evaluate the application and performance of flow cytometry to detect anti-*Leishmania infantum* antibodies in HIV-infected patients. Sera from VL/HIV coinfecting patients, characterized using “gold standard” techniques, were compared with sera from healthy controls plus sera from HIV-infected individuals. The flow cytometry results were expressed as levels of IgG reactivity, based on the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). A ROC curve analysis of a serum titration indicated a PPFP of 1.26% as being the cutoff point to segregate positive and negative results. At the 1:2,048 dilution, with 89% sensitivity and 83% specificity, flow cytometry showed greater sensitivity in relation to the serological tests evaluated. Furthermore, flow cytometry was the only assay that positively identified all VL-HIV patients with quantified HIV load. Together, these findings suggest that flow cytometry may be used as an alternative serological approach for VL identification and as a tool to characterize the humoral response against *Leishmania infantum* in HIV-infected patients.

Keywords: visceral leishmaniasis, HIV infection, aids, diagnosis, flow cytometry

INTRODUCTION

Visceral Leishmaniasis (VL) is a potentially fatal disease that has emerged as an important opportunistic condition in HIV infected patients, resulting in a substantial number of VL-HIV coinfection cases which have been reported from 35 countries. The coinfection generates an impact in the immunopathogenesis, clinical manifestation, therapeutic response and diagnosis of both diseases (1). Case definition of HIV-VL requires confirmation of HIV infection by serological tests and positive results for VL diagnosis based on parasitological (bone marrow aspirate),

serological or molecular methods, in addition to clinical symptoms. The microscopic examination or isolation of the parasite, the protozoan *Leishmania infantum*, is considered the gold standard for laboratorial confirmation of VL. Although this technique has high specificity, its use in clinical laboratories has some limitations, mainly due to the low sensitivity levels. The procedures involved are also invasive, time-consuming and require experienced personnel (2). Furthermore, due to the immunodepressed status of HIV-infected individuals, the parasites may not be found in the bone marrow, but rather in less common sites such as the oral mucosa, skin, stomach, colon and lungs (3–5). Serological approaches which detect specific antibodies against *L. infantum* constitute a valuable alternative as an early, rapid, and user-friendly diagnostic test. In the VL-HIV coinfection, however, the conventional VL serological assays, which includes indirect immunofluorescence test and the rK39 rapid test, are not considered accurate due to the low antibody production in these individuals (6–8).

The development of an effective VL diagnosis for the VL-HIV coinfections represents still a relevant challenge since it needs to be precise in order to reduce the lethality and mortality of afflicted individuals. Considering the limitations of the available diagnostic techniques, alternative methodologies have been employed (9, 10). One of them is flow cytometry, a technique that has been seen to be useful for a diversity of diagnostic applications, such as immunodeficiency disorders and cancer (11, 12). In addition, it can also be applied to parasitic diseases, such as Chagas Disease and leishmaniasis (13, 14). This technique has several advantages for immunoassays, such as high throughput capacity, possibility of analyte quantification, reduced sample volume, high reproducibility and sensitivity (14, 15). More importantly, it allows the development of multiplex studies using recombinant antigens, and it can be used as a monitoring tool for cured patients, allowing a more sensitive detection of anti-*Leishmania* antibodies (16–18). Therefore, the aim of this study was to evaluate the performance and to verify the possible application of an alternative diagnostic method using flow cytometry to detect anti-*L. infantum* antibodies in HIV-infected patients.

METHODS

Serum Samples and Study Population

The study population was defined by the convenience of the sample size from two states from Northeastern Brazil (Pernambuco and Piauí). The sera used were from 18 VL-HIV coinfecting (diagnosed by *Leishmania* positive bone marrow aspirate and rapid HIV test) and 18 VL negative-HIV positive patients as well as 18 healthy control individuals, with VL negative sera confirmed using conventional serological tests (rK39 rapid test and DAT). For the VL-HIV coinfecting group, eight patients (five from Pernambuco and three from Piauí) had been more thoroughly investigated prior to this study during their clinical evaluation, with more detailed immunological records available (CD4⁺ T cell count and viral load). All serum samples were collected in vacutainer tubes (BD Biosciences), processed by centrifugation (1,000 g, 10 min, room temperature),

inactivated by heating (30 min at 56°C) and centrifuged at 4°C, 1,000 g for 5 min. After centrifugation, the supernatants were aliquoted and kept at –20°C until further use.

This study was approved by the Ethics Committees from the Federal University of Piauí (0116/2005) and from the Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (CAEE 51603115.7.0000.5190).

Conventional Tests for VL Diagnosis

Bone marrow (1 mL) aspirates were obtained for *Leishmania* detection and used to prepare smears by slide apposition. The slides were stained with a panoptic staining kit (Ranlyab, Barbacena, Brazil) and were evaluated under a light microscope (100× objective). At least three bone marrow smears were evaluated for each patient and the process was performed according to Da Silva et al. (19). Rapid tests based on rK39 (IT LEISH) were purchased from Bio Rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France) and performed according to the manufacturer's instructions. The DAT was carried out according to the manufacturer's instructions (Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL), with sera having dilution titers of 1:6,400 considered positive, as defined by El Harith et al. (20).

In-house Immunofluorescence Antibody Test

The IFAT test was performed with an in-house protocol, where 20 µl of a *L. infantum* promastigote antigenic suspension were applied to the delimited region of IFAT slides (PERFECTLAB, São Paulo, Brazil) and kept for 2 h at 37°C. The slides were then coated with 10 µl of the patients' serum, in titers ranging from 1:20 to 1:320, diluted in PBS, pH 7.2. Two control sera (positive and negative) were incubated in a humid chamber for 30 min at 37°C. After incubation, the slides were washed three times through immersion in PBS, in intervals of 10 min. Anti-human IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) prepared in Evans blue (40 mg) in PBS (previously diluted at 1:10 ratio in the same buffer) was added to the slides in a 1:50 dilution, and incubated under the same conditions as mentioned before. The slides were then washed three times for 10 min in PBS and left at room temperature. The assembly was made with buffered glycerin pH 8.5 and the slides then observed under a fluorescence microscope, with a 100× objective. Sera were considered positive from the dilution 1:40.

ELISA

The ELISA test was performed as described by Oliveira et al. (21), using 600 ng per well of crude *L. infantum* antigen assayed with the various sera diluted 1:900, followed by incubation with the peroxidase-conjugated anti-IgG (Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, MA) diluted 1:2,000. After enzymatic detection with o-phenylenediamine (OPD) and H₂O₂, the reaction was quenched by adding 2M H₂SO₄ (50 µl/well) and the plates read at 490 nm (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, USA or MRX II, Dynex Technologies, Chantilly, USA). Positive and negative controls were added to each 96-well plate to standardize the readings and variations. The cutoff point between non-reagent

and reagent samples was calculated as the mean of the negative controls plus two standard deviations.

Flow Cytometry

The flow cytometry assay was performed as originally described by Rocha et al. (22). Cultured *L. infantum* promastigotes (strain MHOM/BR/70/BH46) were harvested and washed three times in ice-cold PBS supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), prior to resuspension in 1% paraformaldehyde and incubation overnight. Following by a new wash and resuspension in PBS+10% FBS, the parasite suspension was incubated in 96-well, U-bottom plates (2.5×10^5 /well) at 37°C for 30 min in the presence of different serum dilutions (1:64–1:8,192), followed by two washes with PBS-10% FBS. The parasites were then incubated at 37°C for 30 min protected from the light and in the presence of anti-human IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluted 1:200 in PBS-10% FBS. After yet another wash, FITC labeled parasites were fixed with 200 μ L of 1% paraformaldehyde and kept away from direct light for 30 min at 4°C until data acquisition on the flow cytometer (FACScalibur, Becton Dickinson), using the software “Cell Quest Pro,” with 20,000 events per sample. Promastigotes were identified based on their specific frontal (FSC) and side (SSC) light scattering properties. After FSC and SSC gain adjustments, the parasites assumed a characteristic distribution with these parameters. The relative FITC fluorescence intensity of each event was analyzed with a single histogram representation. A delimitation was set on the FITC-conjugated internal control histogram and it was applied to all data analyses reported here in order to determine the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) for each sample (Supplementary Figure 1). The optimal serum dilution and PPFP cutoff point were then selected to gather the IgG reactivity data with the best performance indexes. The values obtained were plotted as the mean of the PPFP related to the inverse dilution of the evaluated sera. For each assay, in addition to the FITC-conjugated internal control, unlabeled controls in quadruplicates and negative (a pool of negative sera) and positive (a pool of positive sera) controls were included to validate the assay.

Statistics

For each test, the sensitivity was determined as the fraction of the confirmed VL-HIV coinfecting sera that were reagent, and the specificity was calculated as the fraction of non-reagent sera (Healthy controls and HIV mono-infected groups) that were identified to be truly test negative. Statistical analyses were performed using a two-by-two contingency table with exact binomial 95% CIs using the OpenEpi Software (Version 2.3.1, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA). The degree of agreement was determined by the kappa index, using the Landis and Koch interpretation criteria. A kappa-value of 0.60–0.80 represents a substantial agreement beyond chance and a kappa-value of >0.80 represents almost perfect agreement beyond chance (23). The graphs were generated by the GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA).

RESULTS

Defining the Flow Cytometry Parameters for the Diagnosis of VL-HIV Coinfected Cases

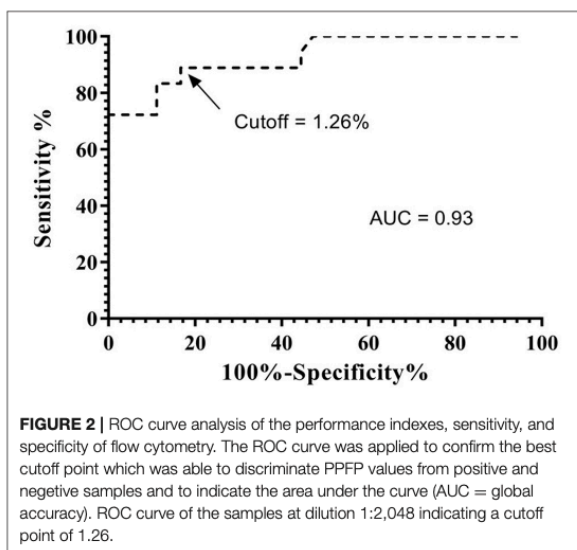
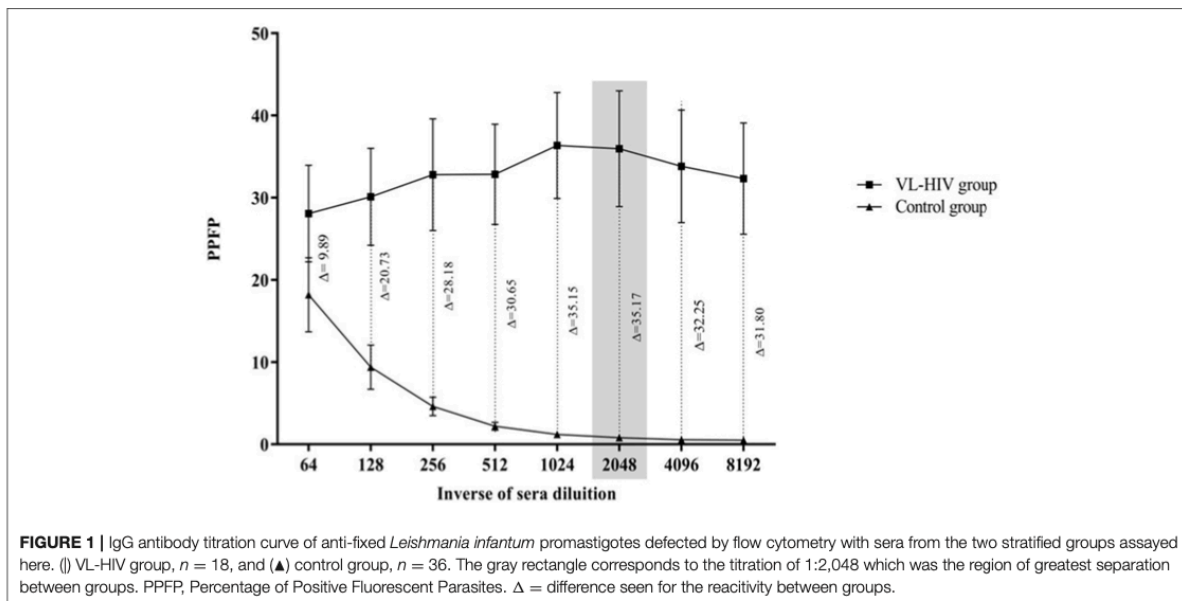
To evaluate the use of flow cytometry serology to clearly differentiate between positive and negative VL samples from HIV co-infected individuals, a serum dilution curve was used to assess the IgG reactivity data from sera from VL-HIV coinfecting patients in comparison with a VL-negative control group. The VL-HIV coinfecting samples all consisted of true positive cases identified by a positive parasitological test for VL and positive HIV serology. The control group consisted of sera from healthy individuals, with no obvious signs and symptoms of any disease and living in the non-endemic regions for VL, as well as HIV mono-infected individuals, with positive serology for HIV and negative serology for VL. This negative VL serology was confirmed through three independent assays: an in-house Immunofluorescence Antibody Test (IFAT), a commercial Direct Agglutination Test (DAT) and ELISA using a crude *L. infantum* antigen preparation. Figure 1 shows the mean values of the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) from VL-HIV coinfection and control groups vs. a sera dilution curve ranging from 1:64 to 1:8,192. The difference between the reactivity of positive and negative samples (Δ) showed that the best performance in segregating these groups was at the dilution of 1:2,048. Thus, we used this dilution to better define the optimal PPFP value for VL diagnosis.

Defining a Cutoff Point for the Diagnosis of VL-HIV Coinfected Cases

Next, we sought to define an ideal cutoff point for the flow-cytometry, which would be able to differentiate the IgG reactivity data with the best performance indexes. This was evaluated through a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve, generated by plotting sensitivity on the y-axis and the complement of specificity (100–specificity) on the x-axis and thus able to discriminate negative from low positive and high positive PPFP results. The data analysis of the ROC curve demonstrated that the PPFP value of 1.26 was the most appropriated cutoff to distinguish negative (PPFP \leq 1.26%) from positive (PPFP > 1.26%) results (Figure 2). The tests' global accuracy determined by the area under the ROC curve (AUC), which was calculated at 0.93 [95%, with a confidence interval (CI) between 0.85 and 1.0]. Using this approach, flow cytometry displayed 89% of sensitivity (CI 95% = 65–99%) and 83% of specificity (CI 95% = 67–94%). The mean PPFP values was 36% (CI 95% = 22–50%) for the VL-HIV coinfection group, 1.4% (CI 95% = 0.9–1.8%) for the healthy controls and 0.2% (CI 95% = 0.1–0.35%) for the mono-infected HIV group.

Comparative Analysis of Flow Cytometry and Conventional Serological Tests for VL-HIV Diagnosis

Aiming to evaluate the global performance of flow cytometry, we used the same serum panel with serological tests conventionally



moderate agreement between rK39 rapid test and IFAT ($\kappa < 0.6$; agreement < 80).

Performance of Flow Cytometry and Standard Serological Tests in Relation to the Immunological Status of Patients Co-Infected With VL-HIV

Eight of the VL-HIV coinfected sera were derived from patients whose immune statuses had been evaluated and the HIV viral load quantified (Table 2). We observed that flow cytometry was able to positively identify all of these sera, including those with a more severe immunosuppression, with CD4+ T cell counts below 200 cells/mm³, and even taking into account the very large variations in HIV viral load. Although the various conventional tests evaluated also gave positive results even in the patients with the most severe immunosuppressions, all the other tests had at least one negative result for the series of cases analyzed, with IFAT having the worst performance (three false negative results). However, no clear correlation between immunosuppression, viral load and positivity in the assays was observed for the any of these tests.

DISCUSSION

used for the diagnosis of VL (DAT, rK39 rapid test, ELISA, and IFAT). Flow cytometry had the best values in terms of sensitivity and negative predictive value (89 and 94%, respectively), however, the other tests were more specific (100%) when compared to flow cytometry, which had a specificity of 83% (Table 1). When the different tests were individually compared to flow cytometry, we could identify a substantial agreement between DAT and ELISA tests ($\kappa > 0.6$; agreement $> 80\%$) and a

To our knowledge, this is the first study using the detection of antibodies anti-*L. infantum* by flow cytometry for VL diagnosis in HIV-infected individuals. Previous reports started by using this technique to evaluate IgG binding to live promastigotes to assay individuals with VL (24, 25) and with American tegumentary leishmaniasis (26). The used of fixed cells as an alternative was also investigated with both Chagas disease and tegumentary leishmaniasis (27, 28). In a previous study, we also

TABLE 1 | Values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of the serological tests used for the diagnosis of VL-HIV coinfection ($N = 54$)*.

	Flow cytometry	DAT	rK39 rapid test	ELISA	IFAT
Sensitivity (95%CI) ^a	89% (67–97%)	83% (61–94%)	72% (49–87.5%)	72% (49–87.5%)	61% (39–80%)
Specificity (95%CI)	83% (68–92%)	100% (90–100%)	100% (90–100%)	100% (90–100%)	100% (90–100%)
PPV ^b (95%CI)	73% (52–87%)	100% (80–100%)	100% (80–100%)	100% (80–100%)	100% (74–100%)
NPV ^c (95%CI)	94% (80–98%)	92% (80–97%)	88% (74–95%)	88% (74–95%)	84% (70–92%)
Accuracy (95%CI)	85% (73–92%)	94% (85–98%)	91% (80–96%)	91% (80–96%)	87% (76–94%)

*The samples included 18 VL-HIV coinfecting patients, 18 VL negative-HIV positive patients and 18 healthy individuals (negative control).

^aCI, Confidence Interval.

^bPPV, Positive Predictive Value.

^cNPV, Negative Predictive Value.

TABLE 2 | Laboratorial findings of eight cases of the VL-HIV/AIDS coinfecting group.

Patient	Flow cytometry (%PPFP)	DAT (Titer)	rK39 rapid test	ELISA (Absorbance-490 nm)	IFAT (Titer)	T CD4+ (cells/mm ³)	Viral load (copies/mL)
1	Positive (1.37)	Positive (1:51,200)	Positive	Positive (0.64)	Negative	399	3,722
2	Positive (23.47)	Positive (1:24,600)	Positive	Positive (0.85)	Positive (1:160)	56	50,000
3	Positive (1.96)	Negative	Negative	Negative (0.02)	Negative	392	<50
4	Positive (37.91)	Positive (1:102,400)	Positive	Positive (3.5)	Positive (1:160)	2	<50
5	Positive (21.56)	Positive (1:51,200)	Positive	Positive (0.85)	Positive (1:160)	<50	54
6	Positive (59.76)	Positive (1:51,200)	Positive	Positive (0.65)	Positive (1:40)	157	45,795
7	Positive (4.89)	Positive (1:6,400)	Negative	Negative (0.04)	Negative	345	39,529
8	Positive (88.32)	Positive (1:51,200)	Positive	Positive (3.1)	Positive (1:320)	92	1,027

directly investigated the use of fixed promastigotes to assess IgG binding by flow cytometry for the diagnosis of individuals with VL, reaching a sensitivity of 92–96% in these individuals (15). In the present study, we found a good, but not ideal, sensitivity, although in relation to the conventional tests used for comparison, the sensitivity of flow cytometry was greater. As described here, the technique is even more relevant for the diagnosis of VL in cases of VL-HIV co-infections.

The rk39 rapid test and IFAT are the serological tests most used for the diagnosis of VL, but they show the lowest sensitivity (<60%) in VL-HIV coinfecting individuals (6). Therefore, particularly for this group of patients, the VL diagnosis is a great challenge. Our results showed higher sensitivity levels for these tests than previously reported, but with a performance still inferior to flow cytometry and DAT.

Indeed, among the serological tests conventionally used for the VL diagnosis in coinfecting individuals, DAT stands out as having the highest sensitivities in multiple studies: 89% (29), 81% (6), 82.3–89.7% (30), 91.3% (31), 89.5% (32), and 90% (33). This performance was also corroborated by our study. Both DAT and flow cytometry use serial dilutions that allow the identification of antibodies in low serum concentrations, even in immunosuppressive conditions (CD4+ T cells <200 cells/mm³). Nevertheless, flow cytometer uses photomultiplier detectors and its quantitative assessment excludes the operator subjectivity which exists in DAT. In this context, flow cytometry shows the potential to be an alternative serological method for

VL detection in HIV-infected patients, since a positive test, even at low titers, has diagnostic value when combined with the clinical case definition.

All serological tests, except for flow cytometry, had 100% specificity. This may have been overestimated in our study, since we used the rk39 rapid test and DAT for the original screening for the group of VL negative-HIV positive samples. In previous studies, specificities varying from 83.3 to 90% for DAT and 97.4 to 100% for rapid tests have been observed in VL-HIV coinfections (6, 31, 32). Ideally, it would be best to evaluate different control groups, such as individuals from endemic regions and with other confirmed pathologies, to have a more reliable specificity value. Despite the good sensitivity of our flow cytometry data, further investigations are needed in order to reduce the high incidence of false positive results seen here among healthy controls from non-endemic regions (**Supplementary Figure 2**). It is particularly important to investigate VL-related diseases that are co-endemic, since cross-reactivity with other trypanosomatid infections still represents an important issue regarding the applicability of flow cytometry (24, 34).

So far, it has been a challenge to find a more practical and safer antigen preparation which would allow greater sensitivity and specificity levels with low cross-reactivity. Improvements which include the use of fixed parasites and solutions that are able to preserve their morphology, such as formaldehyde, were strategies developed to facilitate the use of these parasites and to enable the development of diagnostic kits (35, 36). It is also

noteworthy that the development of algorithms which allow the elimination of cross-reactivity are important for the differential diagnosis of trypanosomatids (14), but the use of molecularly defined antigens seems to be the best option capable of addressing this limitation (16).

With the emergence of monoclonal antibodies and flow cytometry, it was possible to clarify the role of CD4+ T cells in HIV-AIDS. Indeed, CD4 quantitation is currently one of the most widespread tests performed in diagnostic centers for the prognosis and evaluation of anti-retroviral treatments in HIV-infected individuals (37). In our study, the immunological data were collected retrospectively from medical records, limiting the complete evaluation of all patients. Nevertheless, for those with the data available, flow cytometry was able to detect anti-*L. infantum* antibodies even in cases with low CD4+ T cell counts. It can thus be an additional tool to improve the evaluation of individuals in endemic regions for VL with lower CD4+ T counts. **In this context**, it would be interesting to take advantage of the operational and technical settings that flow cytometers use to quantify CD4 and apply them also for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in countries which are endemic for VL, such as Brazil. This would imply adding an algorithm for the VL diagnosis in people with HIV from endemic areas, enabling a more sensitive diagnosis in cases with a prior negative VL result based on techniques such as DAT and rapid tests. As observed in a study carried out in Ethiopia, the need for a different algorithm for this population is evident due to the substantial reduction in the sensitivity of conventional techniques in HIV-infected individuals (38).

In conclusion, although it is a preliminary assessment, our results emphasize that flow cytometry can contribute to the correct identification of cases, especially in cases of immunosuppression, being a useful tool to characterize the humoral response to *Leishmania* in HIV-infected patients. Therefore, we encourage the evaluation of this technique in a larger number of samples and in other regions, such as those affected by *Leishmania donovani*.

REFERENCES

1. WHO technical. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. *World Health Organ Tech Rep Ser.* (2010) xii–xiii:1–186, back cover.
2. Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis.* (2016) 53:8–16.
3. Diro E, van Griensven J, Mohammed R, Colebunders R, Asefa M, Hailu A, et al. Atypical manifestations of visceral leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: a gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resource poor settings. *Lancet Infect Dis.* (2015) 15:122–9. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70833-3
4. González-Beato MJ, Moyano B, Sánchez C, González-Beato MT, Pérez-Molina JA, Miralles P, et al. Kaposi's sarcoma-like lesions and other nodules as cutaneous involvement in AIDS-related visceral leishmaniasis. *Br J Dermatol.* (2000) 143:1316–8. doi: 10.1046/j.1365-2133.2000.03909.x

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ES, ZM, and VP conceived and designed the study. ES, BO, and AP drafted the manuscript. ES and DG analyzed the data. ES, BO, AP, DG, OM, CC, ZM, and VP critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by a Brazilian grant from MCTI/CNPq/MS SCTIE—DECIT N° 40/2012—Research in Neglected Diseases, from FACEPE—PROEP (APQ-1712-4.01/15) and from CNPq (400729/2019-9).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Camila Queiroz from the Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, for kindly providing us the *L. infantum* strain.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.553280/full#supplementary-material>

5. Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, Pires LHS, Cupolillo E, Kuhls K, Giacoia-Gripp CBW, et al. Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive patient simultaneously infected by two viscerotropic *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg.* (2011) 85:55–9. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0398
6. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* (2012) 6:e1665. doi: 10.1371/journal.pntd.0001665
7. Lindoso JAL, Valente CH, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV/AIDS Res Palliat Care.* (2018) 10:193–201. doi: 10.2147/HIV.S143929
8. Silva MRB, Brandão NAA, Colovati M, Sousa MMP, Lima LC, Dorta ML, et al. Performance of two immunochromatographic tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV. *Parasitol. Res.* (2017) 117:419–427. doi: 10.1007/s00436-017-5716-3

9. Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, et al. rKLO8, a novel *Leishmania donovani*-derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis.* (2013) 7:2322. doi: 10.1371/journal.pntd.0002322
10. Bhattacharyya T, Bowes DE, El-Safi S, Sundar S, Falconer AK, Singh OP, et al. Significantly lower anti-leishmania IgG responses in Sudanese versus Indian visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* (2014) 8:2675. doi: 10.1371/journal.pntd.0002675
11. Cabral-Marques O, Schimke LF, de Oliveira EB, El Khawanky N, Ramos RN, Al-Ramadi BK, et al. Flow cytometry contributions for the diagnosis and immunopathological characterization of primary immunodeficiency diseases with immune dysregulation. *Front Immunol.* (2019) 10:2742. doi: 10.3389/fimmu.2019.02742
12. Del Principe MI, De Bellis E, Gurnari C, Buzzati E, Savi A, Consalvo MAI, et al. Applications and efficiency of flow cytometry for leukemia diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* (2019) 19:1089–97. doi: 10.1080/14737159.2019.1691918
13. Martins-Filho OA, Pereira ME, Carvalho JF, Cançado JR, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypanosome antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* (1995) 2:569–73.
14. Teixeira-Carvalho A, Campos FMF, Geiger SM, Rocha RDR, de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0122938. doi: 10.1371/journal.pone.0122938
15. Silva ED, Oliveira BC, Oliveira AP, Santos WJT, Diniz GT, de Melo Neto OP, et al. Performance evaluation of anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral Leishmaniasis. *J Immunol Methods.* (2019) 469:18–25. doi: 10.1016/j.jim.2019.02.009
16. Sousa S, Cardoso L, Reed S, Reis AB, Martins-filho OA, Silvestre R, et al. Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. *PLoS Negl Trop Dis.* (2013) 7:2371. doi: 10.1371/journal.pntd.0002371
17. Ker HG, Coura-Vital W, Valadares DG, Aguiar-Soares RDO, de Brito RCF, Veras PST, et al. Multiplex flow cytometry serology to diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2019) 103:8179–90. doi: 10.1007/s00253-019-10068-x
18. Mendes APO, Oliveira BC, Pereira AMS, Castro MCAB, Souza MA, et al. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: A comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. *BMC Infect Dis.* (2019) 19:1–11. doi: 10.1186/s12879-019-4642-7
19. Da Silva MRB, Stewart JM, Costa CHN. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* (2005) 72:811–4. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.811
20. El Harith A, Kolk AHJ, Leewenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T, et al. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* (1988) 26:1321–5.
21. Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MCA, Pereira AM, Pinheiro CGM, Santos LR, et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* (2011) 85:1025–34. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0102
22. Rocha RDR, Gontijo CME, Elói-Santos SM, Carvalho AT, Corrêa-Oliveira R, Marques MJ, et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2002) 35:551–62. doi: 10.1590/S0037-86822002000600002
23. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* (1977) 33:159–74.
24. Garcia LM, Coelho-Dos-Reis JGA, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A, Rocha RDR, Araújo MSS, et al. Anti-fixed *Leishmania chagasi* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods.* (2009) 350:36–45. doi: 10.1016/j.jim.2009.07.004
25. Lemos EM, Gomes IT, Carvalho SFG, Rocha RDR, Pissinate JF, Martins-Filho OA, et al. Detection of anti-leishmania (*Leishmania*) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* (2007) 14:569–76. doi: 10.1128/CVI.00354-06
26. Pereira de Oliveira A, Accioly Brelaz de Castro MC, Ferreirade Almeida A, De Assis Souza M, Coutinho de Oliveira B, Campos Reis L, et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. *J Immunol Methods.* (2013) 387:245–53. doi: 10.1016/j.jim.2012.11.002
27. Matos CS, Coelho-dos-Reis JGA, Rassi A, Luquetti AO, Dias JCP, Eloi-Santos SM, et al. Applicability of an optimized non-conventional flow cytometry method to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G for the serological diagnosis and cure assessment following chemotherapeutic treatment of Chagas disease. *J Immunol Methods.* (2011) 369:22–32. doi: 10.1016/j.jim.2011.03.007
28. Pereira VRA, Reis LDC, Souza MDA, de Oliveira AP, de Brito MEF, Lage PS, et al. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2012) 74:292–8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.025
29. ter Horst R, Tefera T, Assefa G, Ebrahim AZ, Davidson RN, Ritmeijer K. Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* (2009) 80:929–34. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.929
30. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO, Rabello A. Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. *PLoS Negl Trop Dis.* (2013) 7:e2195. doi: 10.1371/journal.pntd.0002195
31. Bangert M, Flores-Chávez MD, Llanes-Acevedo IP, Arcones C, Chicharro C, García E, et al. Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis.* (2018) 12:6277. doi: 10.1371/journal.pntd.0006277
32. Freire ML, Assis M, De Oliveira E, Moreira D, Avelar D, Siqueira IC, et al. Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* (2019) 13:e0007484. doi: 10.1371/journal.pntd.0007484
33. Sanchez MCA, Celeste BJ, Lindoso JAL, Fujimori M, De Almeida RP, Fortaleza, et al. Performance of rK39-based immunochromatographic rapid diagnostic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis using whole blood, serum and oral fluid. *PLoS ONE.* (2020) 15:e0230610. doi: 10.1371/journal.pone.0230610
34. Pissinate JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods.* (2008) 336:193–202. doi: 10.1016/j.jim.2008.04.018
35. Ker HG, Coura-Vital W, Aguiar-Soares RDO, Roatt BM, das Dores Moreira N, et al. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* (2013) 20:1792–8. doi: 10.1128/CVI.00575-13
36. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Wendling APB, Rocha RDR, Teixeira-Carvalho A, Martins NE, et al. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J Immunol Methods.* (2007) 318:102–12. doi: 10.1016/j.jim.2006.10.009
37. Kagan JM, Sanchez AM, Landay A, Denny TN, Diseases I, Services H. A brief chronicle of CD4 as a biomarker for HIV/AIDS: a tribute to the memory of John L. Fahey Jonathan. *HHS Public Access.* (2015) 6:55–64. doi: 10.1615/ForumImmunDisTher.2016014169.A
38. Kassa M, Abdellati S, Cnops L, Bremer Hinckel BC, Yeshanew A, Hailemichael W, et al. Diagnostic accuracy of direct agglutination test, rK39 elisa

and six rapid diagnostic tests among visceral leishmaniasis patients with and without hiv coinfection in ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* (2020) 14:8963. doi: 10.1371/journal.pntd.0008963

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 da Silva, de Oliveira, Pereira, Guedes, de Melo Neto, Costa, de Medeiros and Pereira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

7.4 Artigo 4: Comparison of cytokine profile of symptomatic and asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfecting individuals from a VL-endemic area

Resumo

O objetivo deste estudo foi estimar e comparar os níveis de diferentes citocinas entre indivíduos coinfectados com LV-HIV, sintomáticos e assintomáticos, que viviam em uma área endêmica de LV. **MÉTODO:** Estudo transversal, retrospectivo, onde 134 pacientes foram incluídos (35 LV-HIV sintomáticos, 75 LV-HIV assintomáticos e 24 controles negativos). O critério de inclusão foi idade igual ou superior a 18 anos. Todos os indivíduos forneceram consentimento informado por escrito. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz Pernambuco. **RESULTADOS:** A população foi composta principalmente por homens, com mediana de idade de 35 (27 - 41) anos e escolaridade ≤ 8 anos. Os indivíduos assintomáticos eram mais jovens ($p = 0,013$), com maior tempo de escolaridade ($p < 0,001$) e faziam mais uso de terapia antirretroviral ($p < 0,001$) do que os do grupo sintomático. No grupo sintomático encontramos níveis aumentados de IL-17A, seguido de IL-6. Não houve diferença nos níveis das citocinas avaliadas entre indivíduos LV-HIV assintomáticos e os controles saudáveis. Os níveis de citocinas foram maiores entre os pacientes LV-HIV sintomáticos quando comparados aos assintomáticos e com os controles saudáveis. No grupo sintomático, a IL-4 estava positivamente correlacionada com a contagem de linfócitos ($r = 0,5$; $p = 0,002$), e a IL-10 foi negativamente correlacionada com os níveis de hemoglobina ($r = -0,4$; $p = 0,020$) e positivamente correlacionada com os níveis de AST ($r = 0,36$; $p = 0,049$). **CONCLUSÕES:** Níveis ligeiramente mais elevados das citocinas avaliadas foram observados entre os coinfectados sintomáticos, principalmente IL-17A e IL-6. Mais estudos entre pessoas HIV-positivas são necessários para entender melhor o papel das citocinas e outros biomarcadores em indivíduos coinfectados com LV-HIV.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; HIV; coinfecção; citocinas.

Comparison of cytokine levels from symptomatic and asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfecting individuals from a VL-endemic area

Authors:

Diego Lins Guedes^{1,2}, Elis Dionísio da Silva³, Maria Carolina Accioly Brelaz Castro³, Walter Lins Barbosa Júnior¹, Ana Victoria Ibarra-Meneses⁴, Achilleas Tsoumanis⁵, Wim Adriaensen⁵, Johan van Griensven⁵, Valéria Rêgo Alves Pereira³, Zulma Maria de Medeiros¹

Affiliations:

¹ Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute – Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil.

² Curso de medicina, Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brazil.

³ Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute – Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil.

⁴ WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain.

⁵ Unit of Neglected Tropical Diseases, Department of Clinical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

Keywords: visceral leishmaniasis; HIV; coinfection; cytokines.

INTRODUCTION

In spite of all the efforts to control visceral leishmaniasis (VL), it remains an important and prevalent infectious disease worldwide. Affecting mainly neglected people in tropical and subtropical nations (ALVAR et al., 2012; WHO, 2019), VL is present in more than 60 countries in four continents (BURZA et al., 2018). In South America, Brazil carries the highest burden (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). Most *Leishmania* infections are self-limited, but when symptomatic the disease is inevitably lethal without treatment. Despite receiving anti-*Leishmania* drugs and appropriate health care, death is not rare – and those who also live with HIV are more prone to such a poor prognosis (HENN et al., 2018). In addition, VL-HIV coinfecting individuals are, unfortunately, overwhelmed with a higher parasite load and frequent relapses when compared with persons with VL only (DAS et al., 2011; MOLINA et al., 2020).

Immunotherapy for VL has been discussed as a potential way to support the traditional treatments based on chemical drugs as the amphotericin B (ADRIAENSEN et al., 2018; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018). In fact, despite the disease being known, and its recorded mortality in various countries (RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020), only two drugs are available in Brazil – pentavalent antimonial and amphotericin B (in its different preparations). Many adverse effects were reported by using these two drugs (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017), and for some specific populational groups – such as persons who live with HIV – the traditional chemotherapy presents lower levels of success with high failure rates and frequently relapses (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019; ZIJLSTRA, 2016b).

So far, it is still scarce information on biomarkers which can properly distinguish active VL from asymptomatic *Leishmania* infection, and to predict relapses. Some cytokines have been described as potential markers – for example, IL-2 for detecting asymptomatic *Leishmania* infection (BOTANA et al., 2019; IBARRA-MENESES, A. V. et al., 2016), IL-6 for predicting the severity of the disease (DOS SANTOS et al., 2016; GAMA et al., 2013), and IFN- γ for suggesting cure (CARRILLO et al., 2015; IBARRA-MENESES, Ana V. et al., 2017).

However, few studies have included VL-HIV coinfecting patients. Consequently, it is not yet fully understood how big is the impact of HIV infection on the cytokine profile among those coinfecting with *Leishmania*. In this study, we aimed to estimate and compare the levels of different cytokines between symptomatic and asymptomatic VL-HIV coinfecting individuals who live in a VL-endemic area, Pernambuco, in Northeast Brazil. Also, we evaluated whether the cytokine levels might have been influenced by the CD4 T lymphocyte (CD4) count and by the HIV viral load.

METHODS

Study design and sample

This was a retrospective, cross-sectional study. The main objective of this study was to estimate the levels of different cytokines in symptomatic and asymptomatic VL-HIV coinfecting individuals. We 1) compared cytokine levels of the two groups with negative controls; 2) assessed the correlation among the different cytokines within each group; 3) assessed the correlation between serum cytokine levels and general laboratory data; and 4) examined the association between the CD4 count, HIV viral load and the cytokine levels.

A total of 134 patients were included (35 symptomatic VL-HIV, 75 asymptomatic VL-HIV, and 24 healthy controls). Inclusion criteria was be aged 18 years-old or older. The participants had already been diagnosed with HIV and they were tested for *Leishmania*, presenting at least one positive result of four VL tests done (from serum: rK39 rapid test, and Direct Agglutination Test; from urine: detection of *Leishmania* antigen with KAtex; and from peripheral venous blood: kDNA Polymerase Chain Reaction). For the symptomatic group, we analyzed the samples of the 35 cases of VL-HIV coinfection diagnosed in a previous study occurred in the year of 2014 in three referral hospitals from Recife, Brazil. For the asymptomatic group, we randomly selected samples of asymptomatic VL-HIV cases identified in the year of 2018 in an outpatient service from Petrolina, Brazil. The negative controls were tested in the year of 2018 for HIV and VL, with negative results for both, and they were asymptomatic at the time of the study.

Data collection and laboratory procedures

We obtained the following data: gender, age, education; levels of hemoglobin, leucocytes, neutrophils, lymphocytes, platelets, AST, ALT, urea, creatinine, CD4 and HIV viral load. These demographic and laboratory characteristics were obtained from the medical records and the data are described by group.

Cytokine levels were quantified using Becton Dickinson-BD's Cytometric Bead Array (CBA) system for cytokines interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17A, according to the manufacturer's recommendation. The limits of detection of cytokines, according to the manufacturer, are: IL-2 - 2.6 pg/ml; IL-4 - 4.9 pg/ml; IL-6 - 2.4 pg/ml; IL-10 - 4.5 pg/ml; TNF - 3.8 pg/ml; IFN- γ - 3.7 pg/ml; IL-17A - 18.9 pg/ml. The flow cytometer FACSCalibur (BD, San Jose, CA) was used, with subsequent analysis using the FCAPArray (BD, San Jose, CA).

Statistical analysis

Continuous variables were summarized as medians and interquartile range, while categorical variables as counts and proportions. Differences in proportions of categorical variables by group were compared using chi-squared or Fisher's exact test as appropriate. Differences in medians by group were compared by the Mann-Whitney U test. Multiple comparisons of cytokine levels analysis among the three groups were performed using Dunn's multiple comparisons test. Spearman's correlation coefficient was calculated to assess correlation among the different cytokine measurements and to assess correlation among cytokine levels and hematological and biochemical parameters. Data analysis was done with Stata SE 12.0 software (StataCorp, College Station, TX, USA) and GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

Ethics

All subjects were adults and provided written, informed consent. The study was approved by the research ethics committee of Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz Pernambuco (approval number 51235815.0.0000.5190).

RESULTS

The study population was composed mainly of men, with median age of 35 (27 – 41) years-old, and with 8 or fewer years of education. Demographic and laboratory characteristics by group are shown in Table 1. Asymptomatic individuals were younger ($p = 0.013$), with more years of education ($p < 0.001$), and were more on antiretroviral therapy ($p < 0.001$) than those in the symptomatic group. The levels of hemoglobin ($p < 0.001$), lymphocytes count ($p < 0.001$) and CD4 count ($p < 0.001$) were lower in symptomatic individuals, while HIV viral load were higher ($p < 0.001$) in the latter.

We observed among the symptomatic VL-HIV coinfecting group increased levels of IL-17A, followed by IL-6. There were no differences in the levels of all cytokines evaluated between asymptomatic VL-HIV coinfecting individuals and the healthy controls. Cytokine levels were higher among symptomatic VL-HIV patients when compared with the asymptomatic VL-HIV group and with the healthy controls (Figure 1). In Figure 2 we show the levels of each cytokine by CD4 count, by group (symptomatic and asymptomatic VL-HIV individuals).

Correlations across cytokine levels and CD4 count and HIV viral load, for each group, are described in Figure 3. The correlations between cytokine levels and hematological and biochemical parameters for the general sample can be seen in Table 3. We did not see any difference in correlation between cytokines levels and hematological and biochemical parameters among asymptomatic VL-HIV patients. In the symptomatic group, IL-4 was positively correlated with lymphocytes count ($r=0.5$, $p=0.002$), and IL-10 was negatively correlated with hemoglobin levels ($r= -0.4$, $p=0.020$) and positively correlated with AST levels ($r=0.36$, $p=0.049$). We also did not observe correlation between cytokine levels neither with the CD4 count nor the HIV viral load.

Table 1. Comparison of demographic characteristics between symptomatic and asymptomatic VL-HIV coinfecting individuals (univariate analysis) from Pernambuco, Brazil.

Characteristic	Symptomatic (N=35)	Asymptomatic (N=75)	Healthy controls (N=24)	p-value
Gender (n (%))				
Male	22 (62.86)	54 (72)	11 (45.83)	0.062
Female	13 (37.14)	21 (28)	13 (54.17)	
Age (Years) (median and IQR)	38 (31 – 48)	33 (26 – 41)	24 (23 – 25)	<0.001
Education (years) (n (%))				
0 – 8	30 (85.71)	35 (46.67)	0 (-)	<0.001
> 8	5 (14.29)	40 (53.33)	24 (100)	

IQR, interquartile range. All percentages are column percentages.

Table 2. Comparison of laboratory characteristics between symptomatic and asymptomatic VL-HIV coinfecting individuals (univariate analysis) from Pernambuco, Brazil.

	Symptomatic (N=35)	Asymptomatic (N=75)	p-value
Characteristic (median (IQR))			
Hemoglobin (g/dL)	10.45 (8.9 – 11.4)	13.1 (12.2 – 14.7)	<0.001
Leucocytes (/mm³)	4695 (3030 – 7360)	5350 (4600 – 6300)	0.558
Neutrophils (/mm³)	2790 (1400 – 5535)	2576 (2064 – 3358)	0.348
Lymphocytes (/mm³)	880 (538 – 1300)	1782 (1551 – 2310)	<0.001
Platelets x10³ (/mm³)	227.5 (156 – 333)	253.5 (207.5 – 299.5)	0.180
AST (U/L)	31 (20.7 – 72.4)	25 (21 – 37)	0.239
ALT (U/L)	30 (20 – 53.6)	24 (18 – 38)	0.150
Urea (mg/dL)	27.3 (22.67 – 39.75)	23 (19 – 34)	0.065
Creatinine (mg/dL)	0.71 (0.51 – 0.9)	0.8 (0.7 – 1)	0.159
LTCD4+ count (cells/μL)	197 (16 – 414)	587 (422 – 765)	<0.001
Characteristic (n (%))			
LTCD4+ count (cells/μL)			
< 200	16 (51.6)	8 (11.6)	<0.001
200 – 349	6 (19.4)	6 (8.7)	
≥ 350	9 (29.0)	55 (79.7)	
HIV viral load (copies/mL)			
Undetectable (< 50)	5 (16.67)	52 (75.36)	

50-100,000	14 (46.67)	15 (21.74)	<0.001
≥ 100,000	11 (36.67)	2 (2.90)	
On antiretroviral therapy	22 (62.86)	75 (100)	<0.001

IQR, interquartile range; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

All percentages are column percentages.

Table 3. Correlation between serum cytokine levels and general laboratory data of all patients.

	IFN- γ	TNF	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17a
LTCD4 (cells/ μ L)	-0,17	-0,17	-0,23 ^a	-0,22 ^a	-0,33 ^c	-0,26 ^b	-0,28 ^b
HIV viral load (copies/mL)	0,22 ^a	0,10	0,24 ^b	0,34 ^c	0,40 ^c	0,39 ^c	0,28 ^b
Hemoglobin (g/dL)	-0,35 ^c	-0,38 ^c	-0,29 ^b	-0,35 ^c	-0,38 ^c	-0,44 ^c	-0,39 ^c
Neutrophils (/mm ³)	0,04	0,01	0,11	0,14	0,04	0,04	-0,01
Lymphocytes (/mm ³)	-0,18	-0,17	-0,10	-0,19	-0,42 ^c	-0,43 ^c	-0,30 ^a
Platelets (/mm ³)	-0,09	-0,13	-0,06	0,04	-0,21 ^a	-0,22 ^a	-0,15
AST (U/L)	0,14	0,08	0,14	0,03	0,20	0,26 ^a	0,25 ^a
ALT (U/L)	0,04	-0,03	0,09	0,09	0,12	0,19	0,15

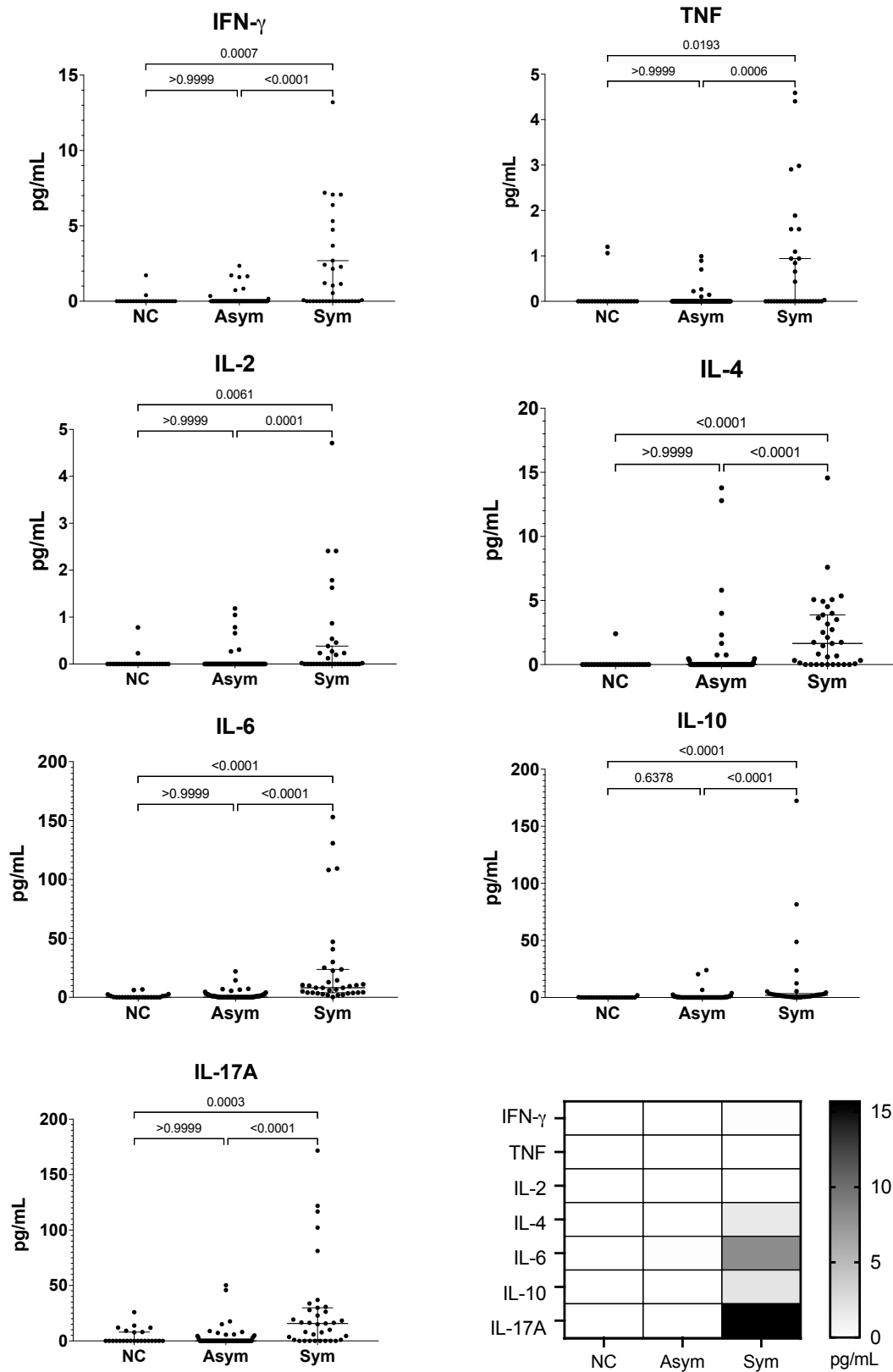
All values represent the Spearman r.

^a $p \leq 0.05$

^b $p \leq 0.005$

^c $p \leq 0.0005$

Figure 1. Comparison between cytokine levels by group (Kruskal-Wallis test with multiple comparisons; median and interquartile range).



NC, negative controls (n=24); Asym, asymptomatic VL-HIV coinfecting patients (n=75); Sym, symptomatic VL-HIV coinfecting patients (n=35).

Figure 2. Cytokine levels by CD4 count, by group (asymptomatic and symptomatic VL-HIV coinfected individuals).

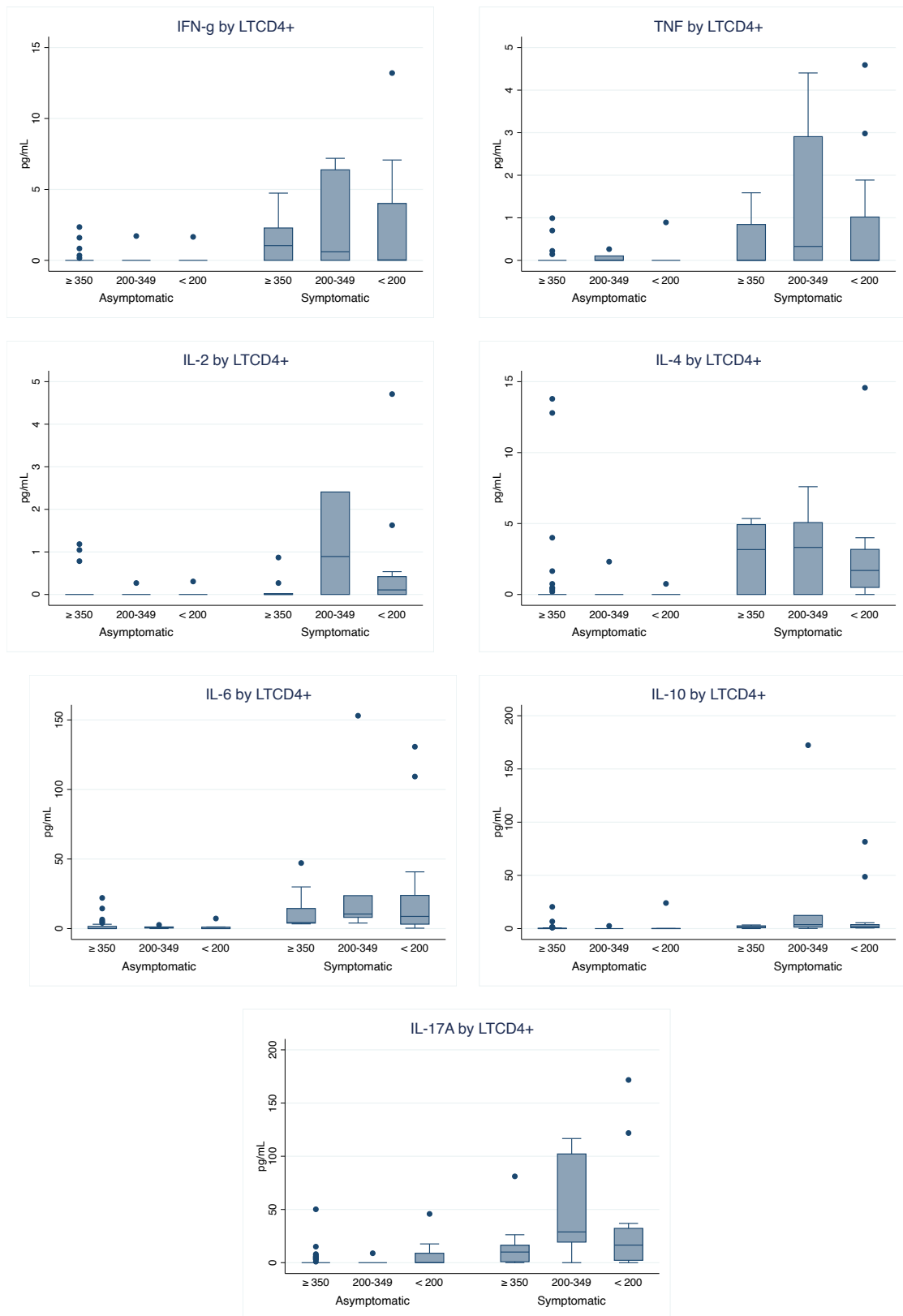
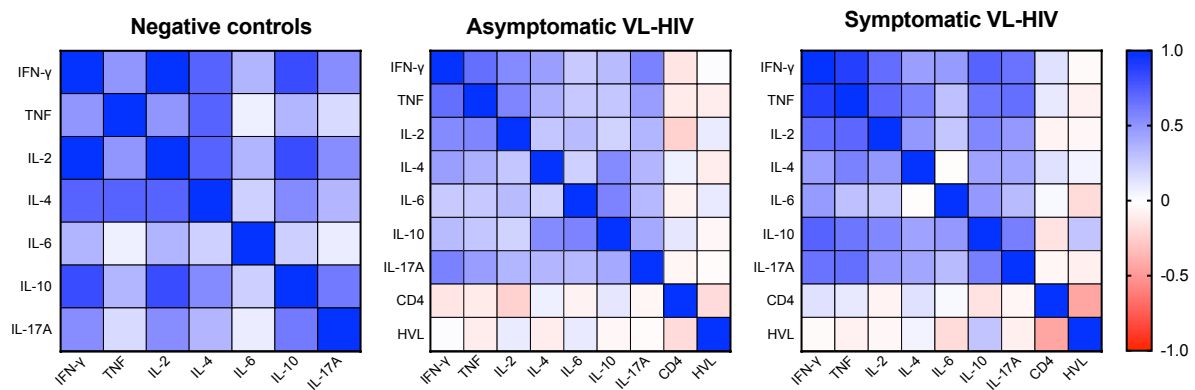


Figure 3. Correlation between cytokine levels, CD4 count, and HIV viral load, by group (negative controls, asymptomatic VL-HIV and symptomatic VL-HIV coinfected individuals).



IFN- γ , interferon-gamma; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; CD4, lymphocyte T CD4+; HVL, HIV viral load.

DISCUSSION

In this study, we aimed to estimate the levels of different cytokines of symptomatic and asymptomatic VL-HIV coinfected individuals living in a VL-endemic area, and also to correlate these cytokine levels among themselves and with laboratorial characteristics of the HIV infection.

We mainly observed increased levels of IL-17A and IL-6 in individuals from the symptomatic group. Low levels of all cytokines analyzed were seen in samples from asymptomatic individuals and from the negative controls. Usually, it is expected a predominantly Th2 response in symptomatic *Leishmania* infections (DOS SANTOS et al., 2016; ZIJLSTRA, 2016a), however, a mixed T helper type 1 (Th1)/Th2 response could also be seen (COSTA, A. et al., 2012; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005). Probably, this dichotomy is not the only factor involved on the course of infection (NYLÉN; SACKS, 2007; ZIJLSTRA, 2016a), and other variables such parasitic load, nutritional status, and genetic factors, might have an important role in the development and outcome of the disease (DAYAKAR et al., 2019; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

In our study, IL-6 levels were dozen times higher in symptomatic individuals when compared with the asymptomatic individuals and with the negative controls. High

levels of IL-6 have already been observed in patients with active VL, and this could be related to more severe cases and death (DOS SANTOS et al., 2016). Despite its high levels, IL-6 in our study demonstrated no correlation with the other cytokines analyzed, neither with LTCD4+ count or HIV viral load. This was observed in all of the three groups of comparison.

Increased IL-6 levels are also related to HIV replication (BORGES et al., 2015; TANAKA; KISHIMOTO, 2014) – fact that could explain the high levels of this cytokine observed in our study in the symptomatic VL-HIV coinfecting group, as they display detectable HIV viral loads. A negative correlation between IL-6 and CD4 count was also reported (BORGES et al., 2015), with high CD4 count related to low IL-6 levels. This result might also support our findings, when low IL-6 levels were observed in negative controls and asymptomatic VL-HIV coinfecting individuals – the last ones presenting high LTCD4+ levels (median of 587 cells/ μ L) when compared with those who were symptomatic (median of 197 cells/ μ L). And among the symptomatic individuals, lower levels of IL-6 were observed in those with CD4 > 350 cells/ μ L.

In our study we observed a correlation between IL-17A and IL-6. It is known that IL-6 influences the IL-17 production (KHADER; GOPAL, 2010), and this could explain why these two cytokines presented the higher medians. IL-17, an interleukin related to the Th17 profile is described to have a protective effect against the *Leishmania donovani* infection in high levels (PITTA et al., 2009). In our study, IL-17 was presented in the highest levels, particularly among the symptomatic patients, as the Th17 response is necessary to control infections caused by intracellular pathogens (KHADER; GOPAL, 2010). It has been described the detection of IL-17A in higher levels in serum of patients with active VL before treatment, and its levels start to decrease during the treatment, but still higher when compared with uninfected participants of the study (NASCIMENTO et al., 2015).

Regarding IL-10, we detected considerable levels of it in symptomatic individuals. It was previously demonstrated that IL-10 is in higher levels during an active VL disease (COSTA, A. et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2016; IBARRA-MENESES, A. V. et al., 2016). Further, some studies suggest the relation between high IL-10 levels and severity of the disease (GAMA et al., 2013). The opposite is also true, where asymptomatic individuals often present low levels of IL-10 (DE OLIVEIRA FRANÇA et al., 2020). High levels of IL-10 could inhibit the human immune response

against *Leishmania* parasites (NYLÉN; SACKS, 2007). In addition, IL-10 has a regulatory role on the Th1 immune response, which, in turn, when exacerbated, present a harmful effect to the host. Therefore, the balance of IL-10 production may be determinant to the progression of the disease. We also observed in symptomatic individuals a positive correlation between IL-10 and AST levels, fact previously reported as related to active VL disease (DOS SANTOS et al., 2016).

In this study we used stored serum samples, which could be characterized as a potential limitation since the levels of the cytokines might decrease during the time. As a cross-sectional study, we cannot infer about the clinical outcomes of the participants and its correlation with the cytokine levels analyzed. Moreover, since we did not explore the presence of other opportunistic infections, their role on the cytokine levels of the patients evaluated could act as a confounder factor, been needed further cohort studies to clarify the potential influence of other opportunistic and latent coinfections (e.g., toxoplasmosis or tuberculosis) on the immune profile of the VL-HIV coinfecting cases.

CONCLUSIONS

Higher levels of the cytokines evaluated were observed among the symptomatic coinfecting individuals, mainly IL-17A and IL-6. More studies among HIV-positive persons are needed to better understand the role of cytokines and other biomarkers in terms of diagnose, prognosis, cure, and relapses of VL on these coinfecting individuals. Such information could better guide prophylaxis and treatment and, consequently, reduce lethality and unnecessary medical interventions. Cohort studies, and studies based on cell stimulation with *Leishmania* antigens, and with a more wide-ranging group of cytokines and other biomarkers, can be determinant to fill these gaps – mainly for asymptomatic individuals.

REFERENCES

ADRIAENSEN, W. et al. Immunomodulatory Therapy of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1943, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01943>

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Tropica*, v. 172, p. 86–90, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.029>

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

BORGES, Á. H. et al. Factors Associated with Plasma IL-6 Levels during HIV Infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 212, n. 4, p. 585–595, 2015. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv123>

BOTANA, L. et al. Asymptomatic immune responders to *Leishmania* among HIV positive patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 6, p. 1–14, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007461>

BURZA, S. et al. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

CARRILLO, E. et al. Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to *Leishmania*, and for Confirming Cure from Leishmaniasis, in Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004179>

COSTA, A. S. A. et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: A comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 6, p. 735–739, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000600005>

DAS, V. et al. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: A challenge to kala-azar elimination programmes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, n. 11, p. 661–666, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.08.005>

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. April, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00670>

DE OLIVEIRA FRANÇA, A. et al. Cytokine profile in Leishmania-positive blood donors. *PLoS ONE*, v. 15, n. 9 September 2020, p. e0238933, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238933>

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. e0004375, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004375>

GAMA, M. E. A. et al. Severe visceral leishmaniasis in children: The relationship between cytokine patterns and clinical features. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 6, p. 741–745, 2013. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0203-2013>

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. et al. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01437>

HENN, G. A. L. et al. Is Visceral Leishmaniasis the same in HIV-coinfected adults? *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 22, n. 2, p. 92–98, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.03.001>

IBARRA-MENESES, A. V. et al. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 8, p. 739.e1-739.e4, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.021>

IBARRA-MENESES, A. V. et al. IFN- γ , IL-2, IP-10, and MIG as Biomarkers of Exposure to *Leishmania* spp., and of Cure in Human Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00200>

KHADER, S. A.; GOPAL, R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence*, v. 1, n. 5, p. 423–427, 2010. <https://doi.org/10.4161/viru.1.5.12862>

MOLINA, R. et al. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 4, p. e0008253, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008253>

NASCIMENTO, M. S. L. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against leishmania infantum infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 2015. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu531>

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends in Immunology*, v. 28, n. 9, p. 378–384, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.004>

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. Washington, DF, 2019. http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/Leishreport2019_eng.pdf?sequence=9&isAllowed=y

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: Analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 62, n. 5, p. 487–495, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01686.x>

PITTA, M.G.R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009. <https://doi.org/10.1172/JCI38813>

RUIZ-POSTIGO, J.A.; GROUT, L.; JAIN, S. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Weekly epidemiological record*, v. 25, p. 265–280, 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. *American Association for Cancer Research*, 2014. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0022>

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, v. 145, n. 4, p. 497–507, 2018. <https://doi.org/10.1017/S003118201600216X>

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 79–99, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Leishmaniasis: fact sheets. Geneva, 2019. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

ZIJLSTRA, E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 464, 2016a. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1721-0>

ZIJLSTRA, E. Visceral leishmaniasis: A forgotten epidemic. *Archives of Disease in Childhood*, v. 101, n. 6, p. 561–567, 2016b. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-309302>

8 CONCLUSÕES

A LV segue como uma das principais doenças negligenciadas. De difícil controle, segue como um desafio à saúde pública no Brasil. Além das já conhecidas vias de transmissão da LV – pela picada de flebotomos infectados e por transmissão por sangue infectado através de agulhas entre usuários de drogas – apontamos aqui a possibilidade da transmissão por via sexual. Documentada em cães e suspeitada em humanos (por alguns poucos casos relatados), a transmissão sexual da LV necessita atenção principalmente em locais em estágios finais de controle e erradicação da doença. Para isso, novos estudos em pessoas com LV (com ou sem HIV) são necessários para a detecção de parasitas no sêmen e avaliação da viabilidade e transmissibilidade desses.

A prevalência da coinfeção LV-HIV assintomática na área estudada foi considerável, e ressaltamos que, por não haver sintomas, muitos desconheciam a possibilidade de terem sido expostos à LV. Por haver a possibilidade de apresentarem parasitas circulantes, a detecção e acompanhamento desses casos é também importante como medida de controle e erradicação da LV. Além disso, para essas PVHIV coinfectadas com LV o acompanhamento ambulatorial deve ter atenção à possibilidade de recidivas da LV, reforçando a necessidade do uso regular da TARV e o olhar atento para o surgimento de sintomas de LV visando um tratamento adequado e melhor prognóstico da reativação.

O diagnóstico da LV em PVHIV segue desafiador. Muitas vezes outras doenças oportunistas e prevalentes, como tuberculose ou histoplasmoses, manifestam-se com sintomas semelhantes aos da LV – e, nesses casos, testes sorológicos positivos para LV em pessoas de áreas endêmicas podem não necessariamente significar se tratar de LV ativa. Por outro lado, sintomas atípicos ou resultados falso-negativos de testes sorológicos (ou até mesmo de testes moleculares em amostras de sangue periférico) em PVHIV podem atrasar o diagnóstico de LV ativa e aumentar os riscos de pior prognóstico. Assim, novos testes diagnósticos são necessários. E o uso da citometria de fluxo para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* pode ser mais uma ferramenta para isso.

Por fim, observamos que não houve diferenças dos níveis das citocinas avaliadas entre indivíduos coinfectados LV-HIV assintomáticos e os do grupo dos

controles saudáveis. Já na comparação entre as pessoas do grupo de coinfectados LV-HIV sintomáticos e assintomáticos, e entre sintomáticos e controles saudáveis, os níveis de todas as citocinas foram maiores nesses sintomáticos LV-HIV. Mais especificamente, os níveis de IL-6 e de IL-17A foram os mais elevados. De maneira geral citocinas do perfil Th2 apresentaram maiores níveis dentre as avaliadas, porém com baixos valores. A característica das amostras pode ter influenciado esses resultados, uma vez que as análises foram feitas a partir de soros armazenados. Para resultados e respostas mais esclarecedoras, é necessário que haja o seguimento dos pacientes a fim de avaliar as variações nos níveis das citocinas (além de outros marcadores biológicos) ao longo do tempo, correlacionando com outros fatores e com o desfecho dos casos.

REFERÊNCIAS

- ABASS, E. *et al.* Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: Comparison of different serological tests in three endemic regions. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.
- ADAMS, E. R. *et al.* Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e1946, 2012.
- ADRIAENSEN, W. *et al.* Immunomodulatory Therapy of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1943, 2018.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, Basel, v. 172, p. 86–90, 2017.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALEXANDER, J. *et al.* Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 30, n. 10, p. 2935–2943, 2000.
- ALVAR, J. *et al.* The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.
- ARONSON, N. *et al.* Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 96, n. 1, p. 24–45, 2017.
- BADARÓ, R. *et al.* rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 173, n. 3, p. 758–761, 1996.
- BANGERT, M. *et al.* Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 3, p. e0006277, 2018.
- BARBOSA JÚNIOR, W. L. *et al.* Higher levels of TNF and IL-4 cytokines and low miR-182 expression in visceral leishmaniasis-HIV co-infected patients. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 1–9, 2020.
- BEZERRA, J. M. T. *et al.* Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. e0006697, 2018.

BHATTACHARYYA, T.; BOELAERT, M.; MILES, M. A. Comparison of Visceral Leishmaniasis Diagnostic Antigens in African and Asian *Leishmania donovani* Reveals Extensive Diversity and Region-specific Polymorphisms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e2057, 2013.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE HIV E AIDS. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2020.

BORGES, Á. H. et al. Factors Associated With Plasma IL-6 Levels During HIV Infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 212, n. 4, p. 585–595, 2015.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.271, de 6 de junho de 2014. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Brasília: **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 6 jun. 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271_06_06_2014.html. Acesso em: 17 jul. 2021.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018.

BURZA, S. et al. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CARRANZA-TAMAYO, C. O. et al. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasília, Federal District, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, n. 7, p. 743–748, 2009.

CARVALHO, F. A. A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 43, p. 289–295, 2002.

CARVALHO, F. L. et al. Perfil epidemiológico dos indivíduos HIV positivo e coinfeção HIV-*Leishmania* em um serviço de referência em São Luís, MA, Brasil.

Ciência & Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 18, n. 5, p. 1305–1312, 2013.

CASADO, J. L. et al. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. **HIV Medicine**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 240–248, 2015.

CATALÀ, A. et al. Anti-tumour necrosis factor-induced visceral and cutaneous leishmaniasis: Case report and review of the literature. **Dermatology**, Basel, v. 230, n. 3, p. 204–207, 2015.

CAVALCANTI, A. T. A. et al. Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 43–47, 2012.

CHAUHAN, S. B. et al. Interleukin 2 is an Upstream Regulator of CD4+ T Cells from Visceral Leishmaniasis Patients with Therapeutic Potential. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 220, n. 1, p. 163–173, 2019.

COSTA, A. S. A. et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: A comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 6, p. 735–739, 2012.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, Edimburgh, v. 107, n. 2, p. 78–87, 2013.

COSTA, P. L. et al. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 126, n. 2, p. 99–102, 2013.

COTA, G. F. et al. The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e1665, 2012.

COTA, G. F. et al. Efficacy of Anti-Leishmania Therapy in Visceral Leishmaniasis among HIV Infected Patients: A Systematic Review with Indirect Comparison. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e2195, 2013a.

COTA, G. F. et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 89, n. 3, p. 570–577, 2013b.

COTA, G. F. et al. Leishmania-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e2816, 2014.

COTA, G. F.; DE SOUSA, M. R.; RABELLO, A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-Infected Patients: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical**

Diseases, San Francisco, v. 5, n. 6, p. e1153, 2011.

COUTINHO, J. V. S. C. et al. Visceral leishmaniasis and Leishmaniasis-HIV coinfection: Comparative study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 50, n. 5, p. 670–674, 2017.

CUNHA, M. A. et al. Frequency of *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in an urban area in Brazil: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology today**, Cambridge, v. 16, n. 4, p. 142–144, abr. 2000.

D'ETTORRE, G. et al. Central role of interleukin-15 in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients with visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 99, n. 1, p. 83–87, 2006.

DA SILVA, M. R. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 72, n. 6, p. 811–814, 2005.

DAHER, E. F. et al. Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and Hiv Co-infection in fifteen patients from Brazil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 95, n. 3, p. 652–655, 2009.

DANTAS-TORRES, F. et al. *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 31, p. 65–69, 2017.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 352–356, 2006.

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, n. 670, p. 1–23, 2019.

DE ASSIS, T. S. M. et al. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 2, p. 81–85, 2011.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v. 97, p. 3–15, 2003. Supl. 1.

DIAS, D. S. et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. **Parasitology**

International, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 344–350, 2018.

DIEHL, S. et al. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. **Immunity**, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 805–815, 2000.

DINIZ, L. F. B.; SOUZA, C. D. F.; CARMO, R. F. Epidemiology of human visceral leishmaniasis in the urban centers of the lower-middle São Francisco Valley, Brazilian semiarid region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 51, n. 4, p. 461–466, 2018.

DIRO, E. et al. Atypical manifestations of visceral leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: a gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resource poor settings. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 15, n. 1, p. 122–129, 2015a.

DIRO, E. et al. Use of Pentamidine As Secondary Prophylaxis to Prevent Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV Infected Patients, the First Twelve Months of a Prospective Cohort Study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e0004087, 2015b.

DIRO, E. et al. A randomized trial of AmBisome monotherapy and AmBisome and miltefosine combination to treat visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 1, p. e0006988, 2019.

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. e0004375, 2016.

DRIEMEIER, M. et al. Late diagnosis: A factor associated with death from visceral leishmaniasis in elderly patients. **Pathogens and Global Health**, Edimburgh, v. 109, n. 6, p. 283–289, 2015.

EL HARITH, A. et al. Improvement of a Direct Agglutination Test for Field Studies of Visceral Leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, Chicago, v. 26, n. 7, p. 1321–1325, 1988.

FALEIRO, R. J. et al. Combined Immune Therapy for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. e0004415, 2016.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. **La Revue de Médecine Interne**, Paris, v. 32, n. 9, p. 544–551, 2011.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, M. L. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 83, n. 6, p. 1098–1102, 1987.

FRANÇA, A. DE O. et al. Leishmania infection in blood donors: A new challenge in

leishmaniasis transmission? **Plos One**, San Francisco, v. 13, n. 6, p. e0198199, 2018.

GAMA, M. E. A. et al. Severe visceral leishmaniasis in children: The relationship between cytokine patterns and clinical features. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 46, n. 6, p. 741–745, 2013.

GARCÍA-GARCÍA, J. A. et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 12, p. 4455–4458, 2006.

GARG, R. et al. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF- α . **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. e441, 2009.

GAUTAM, S. et al. IL-10 Neutralization Promotes Parasite Clearance in Splenic Aspirate Cells From Patients With Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GIBSON, M. E. The identification of kala azar and the discovery of *leishmania donovani*. **Medical History**, London, v. 27, n. 2, p. 203–213, 1983.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1437, 2017.

GUALDA, K. P. et al. New Primers for Detection of *Leishmania infantum* Using Polymerase Chain Reaction. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 5, p. 377–383, 2015.

GUEDES, D. L. et al. Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV-Infected Patients in Pernambuco, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 99, n. 6, p. 1541–1546, 2018.

GUTIÉRREZ, V. et al. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. **Chemical Society Reviews**, London, v. 45, n. 1, p. 152–168, 2016.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.

HASENKRUG, K. J.; CHOUGNET, C. A.; DITTMER, U. Regulatory T cells in retroviral infections. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 14, n. 2, p. 1–22, 2018.

HASKER, E. et al. Latent infection with *Leishmania donovani* in highly endemic villages in Bihar, India. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e2053, 2013.

HENN, G. A. DE L. et al. Is Visceral Leishmaniasis the same in HIV-coinfected

adults? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 22, n. 2, p. 92–98, 2018.

HIRVE, S. et al. Transmission Dynamics of Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent – A Systematic Literature Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0004896, 2016.

HOANG, T. N.; PAIARDINI, M. Role of cytokine agonists and immune checkpoint inhibitors toward HIV remission. **Current Opinion in HIV and AIDS**, Hagerstown, v. 14, n. 2, p. 121–128, 2019.

IBARRA-MENESES, A. V. et al. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 739.e1-739.e4, 2016.

IBARRA-MENESES, A. V. et al. IFN- γ , IL-2, IP-10, and MIG as Biomarkers of Exposure to *Leishmania* spp., and of Cure in Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1–8, 2017.

KARKHAH, A.; JAVANIAN, M.; EBRAHIMPOUR, S. The role of regulatory T cells in immunopathogenesis and immunotherapy of viral infections. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 59, p. 32–37, 2018.

KHADER, S. A.; GOPAL, R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. **Virulence**, London, v. 1, n. 5, p. 423–427, 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LEITE DE SOUSA-GOMES, M.; ROMERO, G. A. S.; WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 9, p. 1–13, 2017.

LIMA, I. D. et al. Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 3, p. e0006164, 2018.

LIMA, I. P. et al. Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 46, n. 2, p. 156–160, 2013.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e3136, 2014.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 5, p.

247–253, 2009.

MACHADO, C. A. L. et al. Epidemiological profile and lethality of visceral leishmaniasis/human immunodeficiency virus co-infection in an endemic area in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 54, p. 2021, 2021.

MACHADO, T. S. et al. Cost-effectiveness analysis of diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 110, n. 8, p. 464–471, 2016.

MARLIER, S. et al. [Leishmaniasis and human immunodeficiency virus: an emerging co-infection?]. **Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial**, Paris, v. 59, n. 2, p. 193–200, 1999.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000.

MELSEW, Y. et al. Antigen Detection in Urine for Noninvasive Diagnosis and Treatment Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus Coinfected Patients: An Exploratory Analysis from Ethiopia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 99, n. 4, p. 957–966, 2018.

MICHEL, G. et al. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. **Acta tropica**, Basel, v. 119, n. 2–3, p. 69–75, 2011.

MIRZAEI, A. et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, San Diego, v. 145, p. 155297, 2021.

MNIOUIL, M. et al. Comparative evaluation of immunochromatographic dipstick test (ICT) rk39, soluble antigen ELISA and IFAT for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Morocco. **Acta Tropica**, Basel, v. 182, p. 185–189, 2018.

MOGENSEN, T. H. et al. Innate immune recognition and activation during HIV infection. **Retrovirology**, London, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010.

MOHAPATRA, S.; SAMANTARAY, J. C.; GHOSH, A. A comparative study of serum, urine and saliva using rk39 strip for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, Tehran, v. 10, n. 1, p. 87–91, 2016.

MOLINA, I. et al. Ultrasensitive real-time pcr for the clinical management of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, n. 1, p. 105–110, 2013.

MOLINA, R. et al. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 14, n. 4, p. e0008253, 2020.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*.

Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Liverpool, v. 97, p. 29–45, 2003. Supl 1.

MURRAY, H. W. et al. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 2, p. 929–938, 1993.

NASCIMENTO, M. S. L. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against leishmania infantum infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 2015.

NIGRO, L. et al. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and Leishmania infantum. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 1, p. 142–145, 1999.

NYLÉN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 4, p. 805–817, 2007.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Immunologic research**, Basel, v. 56, n. 1, p. 163–171, 2013.

OLIVEIRA, E. et al. Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 107, n. 4, p. 243–247, 2013.

OLIVEIRA, G. G. S. et al. Characterization of novel Leishmania infantum recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, n. 6, p. 1025–1034, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Estimated number of people living with HIV, 2016, by WHO region. Geneve, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/map-gallery-search-results?&maptopics=fdbb2f39-7b8f-4672-ac34-c879e52023fb>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide. Geneve, 2019. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 27 set. 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas**. Washington, DC: OPAS, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de la Leishmaniasis en las Américas**. Washington, DC: OPAS, 2019.

ORSINI, M. et al. High frequency of asymptomatic Leishmania spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 106, n. 5, p. 283–288, 2012.

PAGLIANO, P.; ESPOSITO, S. Visceral leishmaniasis in immunocompromised host: an update and literature review. **Journal of Chemotherapy**, Firenze, v. 9478, p. 1–6, 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO HIV/AIDS. Recife: Secretaria Estadual de Vigilância em Saúde, p. 1–36, dez. 2018.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

RAMOS, R. E. M. et al. Assessment of a recombinant protein from *Leishmania infantum* as a novel tool for Visceral Leishmaniasis (VL) diagnosis in VL/HIV co-infection cases. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 16, n. 5, p. e0251861, 2021.

ROCHA, R. D. R. et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 551–562, 2002.

ROSENTHAL, E. et al. HIV and *Leishmania* coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of *Leishmania*. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 31, n. 4, p. 1093–1095, 2000.

RUIZ-POSTIGO, J. A.; GROUT, L.; JAIN, S. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, Geneve, v. 25, p. 265–280, 2020.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 53, p. 8–16, 2016.

SALAM, M. A; KHAN, M. G. M.; MONDAL, D. Urine antigen detection by latex agglutination test for diagnosis and assessment of initial cure of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 5, p. 269–272, 2011.

SANMARCO, L. M. et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, v. 1863, n. 4, p. 857–869, 2017.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R. et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 208, n. 1, p. 57–66, 2013.

SANTOS, G. D. O. et al. Prevalence of HIV and associated factors among visceral leishmaniasis cases in an endemic area of Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 52, p. 1–4, 2019.

SCAGNOLARI, C.; ANTONELLI, G. Type I interferon and HIV: Subtle balance between antiviral activity, immunopathogenesis and the microbiome. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 40, p. 19–31, 2018.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, n. 1, p. 349–358, 2003.

SEDDIKI, N.; BREZAR, V.; DRAENERT, R. Cell exhaustion in HIV-1 infection: Role of suppressor cells. **Current Opinion in HIV and AIDS**, Hagerstown, v. 9, n. 5, p. 452–458, 2014.

SILVA, L. P. et al. Asymptomatic leishmania infection in blood donors from a major blood bank in northeastern Brazil: A cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo, v. 62, p. 1–7, 2020.

SIMONATO, L. E. et al. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 121–127, 2007.

SINGH, N.; SUNDAR, S. Combined neutralization of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha induces IL-4 production but has no direct additive impact on parasite burden in splenic cultures of human visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 6, p. 1–11, 2018.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. **Casos de AIDS identificados em Pernambuco por ano diagnóstico segundo município de residência no período de 1980 a 2012**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: www.datasus.gov.br. Acesso em: 10 jan. 2020.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. **Casos de leishmaniose visceral entre 2010 e 2019 em Pernambuco por macrorregião de residência**, Brasília, DF, 2020. Disponível em: www.datasus.gov.br. Acesso em: 25 set. 2020.

SOKOYA, T. et al. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 2017, p. 1–16, 2017.

SOUSA-GOMES, M. L. DE et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2941–2947, 2008.

SOUSA, A. E. et al. Comparison of the Frequency of Interleukin (IL)-2, Interferon- γ , and IL-4 Producing T Cells in 2 Diseases, Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2, with Distinct Clinical Outcomes. **The Journal of Infectious Diseases**,

Chicago, v. 184, n. 5, p. 552–559, 2001.

SOUSA, J. M. DOS S.; RAMALHO, W. M.; DE MELO, M. A. Demographic and clinical characterization of human visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 622–630, 2018.

SOUZA, N. P. et al. Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 333–335, 2010.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 1, p. 1–6, 2011.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, Cham, v. 22, n. 4, p. 443–457, 2018.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. **Cancer immunology research**, Philadelphia, v. 2, n. 4, p. 288–294, 2014.

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, London, v. 145, n. 4, p. 497–507, 2018.

THAKUR, L. et al. Atypical leishmaniasis: A global perspective with emphasis on the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. 1–17, 2018.

PROGRAMA CONJUNTO DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE HIV/AIDS. **Global AIDS Update**. Geneve: UNAIDS, 2020.

VAISH, M. et al. rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 86, n. 4, p. 598–600, 2012.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 10, n. 3, p. 184–194, 2010.

VAN GRIENSVEN, J. et al. HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-co-infected individuals. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 13, n. 3, p. 251–259, 2013.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Leishmania Antigenuria to Predict Initial Treatment Failure and Relapse in Visceral Leishmaniasis/HIV Coinfected Patients: An Exploratory Study Nested Within a Clinical Trial in Ethiopia. **Frontiers in Cellular**

and Infection Microbiology, Lausanne, v. 8, p. 1–7, 2018.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 79–99, 2019.

VERMA, S. et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 4, p. 1–8, 2010.

VIANA, G. M. DE C. et al. Epidemiological profile of patients co-infected with visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Northeast, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 50, n. 5, p. 613–620, 2017.

VIDYA VIJAYAN, K. K. et al. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1–8, 2017.

WOLDAY, D. et al. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **AIDS**, London, v. 14, n. 8, p. 921–929, 2000.

APÊNDICE A – TCLE (OBJETIVO B)

Convidamos você a participar da pesquisa **“FATORES ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE VISCERAL EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS EM PETROLINA-PERNAMBUCO”**, sob responsabilidade da pesquisadora Alda Maria Justo, orientação da Professora Dra. Zulma Maria de Medeiros e coorientação do Professor Dr. Ulisses Ramos Montarroyos, tendo por objetivo identificar os fatores socioeconômicos, demográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais associados à ocorrência da leishmaniose visceral em pessoas vivendo com HIV e aids. Para atingir o objetivo, será realizado um estudo do tipo caso-controle com os usuários do Serviço de Atendimento Especializado (SAE) do Programa Municipal de DST/HIV/aids de Petrolina. Se você concordar em participar, será entrevistado e serão feitos exames físico, de sangue e urina. Esclarecemos que as suas respostas à entrevista serão colocadas em formulário sem nome, não usaremos filmagens, fotos ou gravações etc, portanto você não será identificado. Manteremos completo anonimato e sigilo absoluto durante e após o término da pesquisa, usaremos apenas os números. Todos os desconfortos serão minimizados. A entrevista e o exame físico serão realizados em consultório com total discrição e na ausência de pessoas estranhas à pesquisa. Os riscos na coleta de amostras para pesquisa do microrganismo que provoca a doença do cachorro ou calazar serão reduzidos ao máximo. Todo o material utilizado será de uso individual e descartado após o procedimento. Ocasionalmente, você poderá perceber uma manchinha roxa no local da picada ou a veia poderá ficar um pouco vermelha, porém você será informado sobre os procedimentos e cuidados necessários para prevenir estes inconvenientes. Para o exame de urina, você receberá um recipiente e será orientado sobre a coleta. Caso um desses exames dê positivo para o microrganismo do calazar, se você concordar e após os esclarecimentos, será retirada uma amostra de medula óssea para confirmação. Esse exame será realizado com anestesia local no ambulatório do Hospital Universitário de Petrolina (UNIVASF) por profissional médico hematologista. Caso você venha a sentir algum tipo de desconforto de origem física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual, comunique imediatamente ao pesquisador para que sejam tomadas as devidas providências. O calazar é a terceira infecção oportunista que mais acomete pessoas vivendo com HIV/aids. A identificação de marcadores críticos para calazar é o principal benefício da pesquisa e poderá ser utilizado pelo SAE para controlar a

doença e prevenir mortes. Você terá os seguintes direitos: a garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta; a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si; a garantia de privacidade à sua identidade e do sigilo de suas informações; a garantia de que caso haja algum dano a sua pessoa, os prejuízos serão assumidos pelos pesquisadores ou pela instituição responsável inclusive acompanhamento médico e hospitalar. Caso haja gastos adicionais, os mesmos serão absorvidos pelo pesquisador. Nos casos de dúvidas e esclarecimentos você deve procurar os pesquisadores ALDA MARIA JUSTO, (87) 98805.3682 da Universidade de Pernambuco – Av. Cardoso de Sá, S/N Cidade Universitária Petrolina-PE CEP 56328-900; ZULMA MARIA DE MEDEIROS E ULISSES RAMOS MONTARROYOS da Universidade de Pernambuco do Recife.

3.5q	Tem tido tosse? (TOS) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não sabe <input type="checkbox"/> 8	TOS _
3.6q	Tem tido diarreia? (DIAR) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não sabe <input type="checkbox"/> 8	DIAR _
3.7q	Tem notado perda de peso? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não sabe <input type="checkbox"/> 8	PPESO _
3.8q	Se sim, quantos quilos? (PKG) _____ kg	PKG _ _ _

4. HISTÓRICO DE HIV E LV: (888=não sabe) (999=não se aplica)		CODIFICAÇÃO
4.1q	Qual o mês e ano que você soube que tinha HIV? Ou Há quanto tempo você sabe que tem HIV? (999=não sabe) _____	TDHIV _ _ _
4.2q	Está fazendo uso de medicamento para HIV (coquetel)? (TARV) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2	TARV _
4.3q	Se sim, há quanto tempo? (TTARV) _____ meses	TTARV _ _ _
4.4e	Você já teve calazar ou leishmaniose visceral ou doença do cachorro? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não sabe <input type="checkbox"/> 8	DPLV _
4.5q	Se sim, quantas vezes? (NELV) Não sabe <input type="checkbox"/> 888 Não se aplica <input type="checkbox"/> 999	NELV _ _ _
4.6q/f	Fez ou está em uso de Anfotericina B ou Glucantime? (TTPLV) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2 Não sabe <input type="checkbox"/> 8	TTPLV _

5. APRESENTAÇÃO CLÍNICA: (88=não sabe) (99=não se aplica)		CODIFICAÇÃO
5.1e	Hepatomegalia? (HMG) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2	HMG _
5.2e	Se sim, a quantos centímetros do RCD? (HMGCM) _____ cm	HMGCM _ _
5.3e	Esplenomegalia? (EMG) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2	EMG _
5.4e	Se sim, a quantos centímetros do RCE? (EMGCM) _____ cm	EMGCM _ _
5.5e	Rarefação de pêlos? (RPEL) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2	RPEL _
5.5e	Palidez cutânea? (PCUT) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2	PCUT _
5.7e	Lesões de pele ou mucosa? (PELE) Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2	PELE _
5.8e	Tipo de lesão de pele ou mucosa (PELET) (lista)	PELET _

6. EXAMES LABORATORIAIS (resultados do dia da entrevista ou do exame mais recente) E CONCLUSÃO:		CODIFICAÇÃO
6.1f	Leucócitos _____/mm ³	WBC _ _ . _ _ _
	Data ___/___/___	WBCD ___/___/___
6.2f	Neutrófilos _____/mm ³	NTF _ _ . _ _ _
	Data ___/___/___	NTFD ___/___/___
6.3f	Linfócitos _____/mm ³	LNf _ _ . _ _ _
	Data ___/___/___	LNFD ___/___/___

6.4f	Hemoglobina (99,99=não sabe) Data ___/___/___	_____ g/dL	HB HBD	_ _ , _ _ ___/___/___
6.5f	Hematócrito (99,99=não sabe) Data ___/___/___	_____ %	HTC HTCD	_ _ . _ _ ___/___/___
6.6f	Plaquetas (999,999=não sabe) Data ___/___/___	_____/mm ³	PLAQ PLAQD	_ _ _ . _ _ _ ___/___/___
6.7f	AST (9999=não sabe) Data ___/___/___	_____ U/L	AST ASTD	_ _ _ _ ___/___/___
6.8f	ALT (9999=não sabe) Data ___/___/___	_____ U/L	ALT ALTD	_ _ _ _ ___/___/___
6.9f	Ureia (99=não sabe) Data ___/___/___	_____ mg/dL	UREA UREAD	_ _ _ ___/___/___
6.10f	Creatinina (99,99=não sabe) Data ___/___/___	_____ mg/dL	CREA CREAD	_ _ , _ _ ___/___/___
6.14f	Albumina (99,99=não sabe) Data ___/___/___	_____ g/dL	ALB ALBD	_ _ , _ _ ___/___/___
6.15f	Proteínas totais (99,99=não sabe) Data ___/___/___	_____ g/dL	PROT PROTD	_ _ , _ _ ___/___/___
6.16f	Globulina (99,99=não sabe) Data ___/___/___	_____ g/dL	GLOB GLOBD	_ _ , _ _ ___/___/___
6.18f	Carga viral mais recente Data ___/___/___	_____ cópias/mL	CV CVD	_ _ _ _ _ _ _ ___/___/___
6.19f	Log da carga viral mais recente Data ___/___/___	_____	LCV LCVD	_ , _ _ _ _ ___/___/___
6.20f	<u>Maior</u> carga viral já apresentada Data ___/___/___	_____ cópias/mL	MCV MCVD	_ _ _ _ _ _ _ ___/___/___
6.21f	Contagem de CD4 mais recente Data ___/___/___	_____ células/mm ³	CD4 CD4D	_ _ _ _ _ ___/___/___
6.22f	<u>Menor</u> contagem de CD4 Data ___/___/___	_____ células/mm ³	MCD4 MCD4D	_ _ _ _ _ ___/___/___

7. CONCLUSÃO:				
7.1	rK39 Positivo <input type="text" value="1"/>	Negativo <input type="text" value="2"/>	Não fez <input type="text" value="8"/>	RK39 __
7.2	DAT Positivo <input type="text" value="1"/>	Negativo <input type="text" value="2"/>	Não fez <input type="text" value="8"/>	DAT __
7.3	Teste de aglutinação em látex – KAtex (urina) Positivo <input type="text" value="1"/>	Negativo <input type="text" value="2"/>	Não fez <input type="text" value="8"/>	TAL __
7.4	PCR no sangue periférico Positivo <input type="text" value="1"/>	Negativo <input type="text" value="2"/>	Não fez <input type="text" value="8"/>	PCRS __
7.5	Aspirado de medula óssea (pesquisa do parasita): Positivo <input type="text" value="1"/>	Negativo <input type="text" value="2"/>	Não fez <input type="text" value="8"/>	ABMO __
7.6	Esfregaço de medula óssea Positivo <input type="text" value="1"/>	Negativo <input type="text" value="2"/>	Não fez <input type="text" value="8"/>	EMO __
7.7	PCR de medula óssea Positivo <input type="text" value="1"/>	Negativo <input type="text" value="2"/>	Não fez <input type="text" value="8"/>	PCRMO __
7.8	Cultura de medula (CMO) Positivo <input type="text" value="1"/>	Negativo <input type="text" value="2"/>	Não fez <input type="text" value="8"/>	CMO __
7.9	Diagnóstico final de Leishmaniose visceral (DFLV) Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="2"/>			DFLV __
7.10	Classificação clínica (CLCL) Assintomático <input type="text" value="1"/> Sintomático típico <input type="text" value="2"/> Sintomático atípico <input type="text" value="3"/>			CLCL __

Observações:

Legenda: e=item a ser preenchido pelo entrevistador
q=questionário
f=item a ser coletado no prontuário

APÊNDICE C – TCLE (OBJETIVO D)

Termo de consentimento livre e esclarecido para investigação de leishmaniose em pessoas vivendo com HIV/Aids

Convidamos

o(a)

Sr(a)

_____, acompanhado (a) na unidade de saúde _____, para participar do projeto de pesquisa **AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES NA DETECÇÃO DE CASOS ASSINTOMÁTICOS, COMO CRITÉRIO DE CURA E COMO PREDITOR DE REATIVAÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM PESSOAS VIVENDO COM HIV** coordenado por **Diego Lins Guedes**, cujo objetivo é conhecer a prevalência de casos assintomáticos de leishmaniose visceral em pessoas vivendo com HIV, além de observar e tentar melhorar os métodos de diagnóstico tratamento da leishmaniose visceral em qualquer pessoa acometida por essa doença.

Caso aceite participar desta pesquisa, coletaremos cerca de 30 ml (6 colheres de chá) de urina para pesquisar uma substância liberada pelo parasita (detecção de antígeno: teste de aglutinação do látex), e 10 ml (2 colheres de chá) de sangue coletado em veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o parasita (exame de anticorpo: teste de aglutinação direta e teste rápido), para pesquisar material genético (DNA) do parasita causador da leishmaniose (reação em cadeia de polimerase - PCR) e para avaliar substâncias que o nosso organismo produz quando sofre alguma infecção (citocinas, imunoglobulinas). Caso haja indicação clínica, faremos a coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (aspirado de medula óssea), sendo esse recomendado pelo Ministério da Saúde como melhor exame no diagnóstico do parasita causador da leishmaniose visceral (também conhecida como calazar).

Informamos que todos os exames serão coletados com material estéril (“sem infecção”), sendo realizados por profissionais capacitados. O exame na veia não causa nenhum desconforto além da “picada” da agulha, que pode algumas vezes causar uma pequena mancha roxa (hematoma) que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento. É esperado que após a coleta do líquido presente dentro do

osso possa haver um pequeno sangramento e dor no local da punção que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento ou apenas com o uso de remédio para dor.

Informamos que esses exames serão importantes para o diagnóstico e para o seu tratamento, pois o diagnóstico de leishmaniose visceral (associada ou não à infecção pelo HIV), quando feito cedo, contribui para que o seu tratamento seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida. Os resultados desses exames serão entregues ao senhor(a) e também para o(a) médico(a) assistente, que deixará o resultado no seu prontuário. Se houver necessidade, de acordo com sintomas ou resultados de exames, o(a) senhor(a) será informado(a) e encaminhado(a) para tratamento da leishmaniose visceral em uma unidade de saúde mais próxima possível de onde o(a) senhor(a) reside ou, em comum acordo, em outra unidade apta para esse tratamento.

O(a) senhor(a) é livre para interromper a qualquer momento sua participação na pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico. Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para exames de laboratório, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas, entraremos em contato para que seja autorizada pelo(a) senhor(a) com novo termo de consentimento. Também solicitamos a sua autorização para coletarmos informações médicas para que sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas, não sendo divulgada de nenhuma maneira seu nome ou qualquer outra informação que possa identificá-lo(a).

Caso o(a) senhor(a) tenha compreendido e concordado com todos os termos deste consentimento informado, solicitamos, por favor, que assine duas vias desse documento, pois uma ficará conosco e outra com o senhor(a).

Recife, ____ de _____ de 20 ____

Assinatura do participante

Endereço - Rua (usuário ou responsável)

Nº/Apt

Bairro

Cidade

- _____
- Estado

Testemunha: _____

Assinatura Membro da Equipe de Pesquisa

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Diego Lins Guedes, Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães.

Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo telefone (81) 2101-2695.

Dra. Zulma Medeiros, Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães

Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo telefone (81) 2101-2662.

Este projeto, antes de ser iniciado, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site <http://plataformabrasil.saude.gov.br>