

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

Elis Dionisio da Silva

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E NA COINFEÇÃO EM PESSOAS
VIVENDO COM HIV**

RECIFE

2019

Elis Dionisio da Silva

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E NA COINFEÇÃO EM PESSOAS
VIVENDO COM HIV**

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

Orientadoras: Dr^a. Valéria Pereira Hernandes

Dr^a. Zulma Maria de Medeiros

Dr^a. Andresa Pereira de Oliveira Mendes

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- S586a Silva, Elis Dionisio da.
Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico da Leishmaniose Visceral humana e na coinfeção em pessoas vivendo HIV / Elis Dionisio da Silva. - Recife: [s.n.], 2019.
122 p. : il., graf., tab. ; 30 cm
- Tese (doutorado em biociências e biotecnologia em saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.
- Orientadoras: Valéria Pereira Hernandes, Zulma Maria de Medeiros, Andresa Pereira de Oliveira Mendes.
1. Leishmaniose Visceral. 2. Citometria de fluxo. 3. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 4. Infecções por HIV. I. Hernandes, Valéria Pereira. II. Medeiros, Zulma Maria de. III. Mendes, Andresa Pereira de Oliveira.

CDU 616.993.161

Elis Dionisio da Silva

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E NA COINFEÇÃO EM PESSOAS
VIVENDO COM HIV**

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

Aprovada em: 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a Valéria Pereira Hernandes (Orientadora – Membro interno)
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz

Dr^a Silvia Maria Lucena Montenegro (Membro interno)
Instituto Aggeu Magalhaes/ Fiocruz

Dr Luydson Richardson Silva Vasconcelos (Membro interno)
Instituto Aggeu Magalhaes/ Fiocruz

Dr^a Maíra Galdino da Rocha Pitta (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco

A minha doutora que tanto amo, Vovó Naide.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial as minhas mães Rosa, Lia e Naide, vocês serão sempre meu guia. A meu pai David, meus irmãos Rodolpho e Naide Maria, minhas tias Lili, Zezinha, Ângela (*in memoriam*), Dolores (*in memoriam*), Dona Teté, Tio Wvilde, Daniel, Carol, Giovani e Téo pelo amor incondicional e mais puro que existe. Vocês são meus exemplos de determinação, força, valores e fé. Obrigada por me ensinarem a ser o que sou hoje.

Aos amigos do colégio, em especial à Olívia, amiga de infância, companheira que a vida gentilmente colocou no meu caminho, agradeço por todo conhecimento e momentos compartilhados e pelo privilegio de tê-la sempre por perto.

A João Lucas, *por todo el amor y el compañerismo*, por me fazer compreender e enxergar além do senso comum.

À Zulma Medeiros, por todo incentivo e amizade, inserindo-me na vida acadêmica desde a graduação e por fazer o elo entre eu e minha orientadora, Valéria Pereira, a quem eu agradeço por ter aceitado me orientar, pela amizade e pelos esforços destinados ao meu projeto, em meio a tantas atividades que desenvolve. São exemplos de mulheres guerreiras que sempre guardarei comigo.

Aos grandes amigos que conquistei ao longo dessa jornada no Laboratório de Doenças Transmissíveis: Mércia, Cynthia, Raul, Amanda Viera, Alda, Luiz Dias, Fabio Melo, Ana Maria, Gilberto, Ana Emília, Júlia, Keila, Amanda Xavier, Morgana, Ellyda, Suellen, Leandro, Artur, Rhaíssa, Almerice e André. Em especial a Walter (sempre ao meu lado nessa jornada acadêmica), Patrícia (exemplo de vida, uma fortaleza), Élide (grande conselheira, mesmo longe fisicamente) e Diego (sempre com bons *insights* e tiradas engraçadas/inteligentes) por toda ajuda e momentos compartilhados. Com certeza, vocês trouxeram mais leveza durante esse processo.

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do IAM: Beatriz, Carol, Mayara, Andresa, Ana Catarina, Ailton, Allana, Sophia, Aline, Marton e Lucas. Agradeço por todo acolhimento e ajuda.

Às funcionárias do Departamento de Parasitologia, Dona Cleide e Dona Fátima, por todo apoio.

À Mácia Saturnino, funcionária da biblioteca do IAM, pela alegria e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos da graduação, em especial Fernanda, Dani, Jéssika, Eliete, Rodrigues, Marília e Diana. Obrigada por esse laço de amizade e companheirismo que perdura até hoje.

Aos pacientes com Leishmaniose Visceral pela disponibilidade em participar desse estudo, que me fizeram ter uma dimensão do quão desafiante é trabalhar em prol da sociedade. Espero que um dia essa tese contribua para a melhoria de vida de vocês.

Ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), pela infraestrutura e pela bolsa que foram essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço não só aqueles que me ajudaram diretamente no meu trabalho, mas também àqueles que, de alguma forma, entraram na minha vida e me deram forças, me fizeram acreditar e seguir em frente e, portanto contribuíram de alguma forma para que esse trabalho fosse desenvolvido.

"Não te rendas, ainda estás a tempo
de alcançar e começar de novo,
aceitar as tuas sombras,
enterrar os teus medos,
largar o lastro, retomar o voo.

Não te rendas que a vida é isso,
continuar a viagem,
perseguir os teus sonhos,
destravar os tempos,
arrumar os escombros
e destapar o céu.

Não te rendas, por favor, não cedas,
ainda que o frio queime,
ainda que o medo morda,
ainda que o sol se esconda,
e se cale o vento: ainda há fogo na tua alma
ainda existe vida nos teus sonhos.

Porque a vida é tua,
e teu é também o desejo,
porque o quiseste e eu te amo,
porque existe o vinho e o amor,
porque não existem feridas que o tempo não cure.

Abrir as portas,
tirar os ferrolhos,
abandonar as muralhas que te protegeram,
viver a vida e aceitar o desafio,
recuperar o riso,
ensaiar um canto,
baixar a guarda
e estender as mãos,
abrir as asas
e tentar de novo celebrar a vida
e relançar-se no infinito [..]”.

Não te rendas (Mario Benedetti)

SILVA, Elis Dionisio da. **Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico da Leishmaniose Visceral humana e na coinfeção em pessoas vivendo HIV**. 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença grave causada por protozoários do gênero *Leishmania* que tem como agentes etiológicos as espécies *L. infantum* e *L. donovani*. Entre os principais desafios apresentados para o controle da LV está a correta identificação dos casos, principalmente no quadro de coinfeção LV-HIV/AIDS. A presente pesquisa avaliou o uso da citometria de fluxo como uma metodologia alternativa na avaliação diagnóstica de portadores de LV e coinfectados LV-HIV/AIDS. Como resultados foram produzidos três artigos, no primeiro artigo foi realizado um estudo de prevalência de LV em pessoas vivendo com HIV, que identificou um percentual de 16,9%. Esse estudo também demonstrou uma baixa concordância entre os testes convencionais utilizados para o diagnóstico de LV. No segundo artigo, avaliamos a aplicação da citometria de fluxo na identificação de LV em pessoas vivendo com HIV/AIDS, A análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) indicou uma porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) de 1,26% como ponto de corte ideal para segregar os resultados positivos e negativos. E com uma diluição 1:2048, a citometria de fluxo apresentou bom desempenho com uma sensibilidade de 89% e especificidade de 83%. Os índices de concordância *kappa* demonstraram um desempenho substancial entre os testes DAT ($\kappa=0,6$) e ELISA ($\kappa=0,6$). O terceiro artigo avaliou o desempenho da citometria de fluxo na identificação dos casos de LV. A análise da curva ROC indicou um PPFP de 2% e a diluição 1:4096 foi identificada como ponto de corte ideal. A citometria de fluxo teve o melhor desempenho para o grupo de LV diagnosticado pelo teste parasitológico (sensibilidade de 96%), enquanto o rK39 (teste rápido imunocromatográfico) e o DAT (Teste de aglutinação direta) também apresentaram alto desempenho. Esses achados mostram que a citometria de fluxo pode ser uma alternativa sorológica segura para o diagnóstico de LV e da coinfeção LV-HIV/AIDS.

Palavras-Chaves: Leishmaniose Visceral. Citometria de fluxo. AIDS. Infecções por HIV.

SILVA, Elis Dionisio da. **Application of flow cytometry in the diagnosis of human Visceral Leishmaniasis and in coinfection in people living with HIV**. 2019. Thesis (Doctor's Program in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a serious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* that has the etiological agents *L. infantum* and *L. donovani*. Among the main challenges presented for VL control is the correct identification of cases, especially in the context of VV-HIV / AIDS co-infection. The present study evaluated the use of flow cytometry as an alternative methodology in the diagnostic evaluation of VL and VL-HIV / AIDS coinfecting patients. As results were produced three articles, in the first article a study of the prevalence of VL in people living with HIV was carried out, which identified a percentage of 16.9%. This study also demonstrated a low agreement between the conventional tests used for the diagnosis of VL. In the second article, we evaluated the application of flow cytometry in the identification of VL in people living with HIV / AIDS. The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve indicated a percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) of 1.26% as a point ideal for segregating positive and negative results. And at a 1: 2048 dilution, flow cytometry showed good performance with a sensitivity of 89% and specificity of 83%. The kappa concordance indices demonstrated a substantial performance between DAT ($\kappa = 0.6$) and ELISA ($\kappa = 0.6$). The third article evaluated the performance of flow cytometry in the identification of VL cases. Analysis of the ROC curve indicated a 2% PPFP and the 1: 4096 dilution was identified as the ideal cut point. Flow cytometry had the best performance for the VL group diagnosed by the parasitological test (sensitivity of 96%), while rK39 (immunochromatographic rapid test) and DAT (Direct agglutination test) also showed high performance. These findings show that flow cytometry may be a safe serologic alternative for the diagnosis of VL and VL-HIV / AIDS coinfection.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Flow cytometry. AIDS. HIV infection

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose Visceral no mundo	18
Figura 2 -	Áreas com sobreposição da coinfeção LV-HIV/AIDS no mundo	20
Figura 3 -	Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i> spp	22
Figura 4 -	Caracterização da resposta imune na Leishmaniose Visceral	23
Figura 5 -	Caracterização da resposta imune na coinfeção LV-HIV/AIDS	26
Figura 6 -	Teste de Aglutinação do Látex (KAtex)	32
Figura 7 -	Reação de Imunofluorescência indireta positiva mostrando as formas promastigotas de <i>L.infantum</i> em microscopia de fluorescência	34
Figura 8 -	Teste de Aglutinação Direta (DAT)	35
Figura 9 -	Teste Rápido Imunocromatográfico OnSite™	36
Figura 10 -	Representação esquemática do citometro de fluxo	37
Quadro 1 -	Levantamento bibliográfico de artigos que fizeram uso da citometria de fluxo para o diagnóstico de tripanossomatídeos com ênfase nas Leishmanioses	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CF	Citometria de Fluxo
DAT	<i>Direct Agglutination Test</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FITC	<i>Flurescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward SCatter</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFI	Imunofluorescência indireta
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase chain Reaction</i>
PPFP	Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos
RMR	Região Metropolitana do Recife
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	<i>Side SCatter</i>
TGF- β	<i>Tumor growth factor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral	17
2.2	Classificação taxonômica	20
2.3	Aspectos biológicos do ciclo	21
2.4	Resposta Imune na Leishmaniose Visceral humana	22
2.5	Tratamento da Leishmaniose Visceral humana	27
2.6	Manifestações clínicas e diagnóstico Clínico da Leishmaniose Visceral humana	28
2.7	Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral humana	30
2.7.1	<i>Diagnóstico parasitológico</i>	30
2.7.2	<i>Diagnóstico molecular</i>	31
2.7.3	<i>Diagnóstico imunológico</i>	32
2.7.3.1	Detecção de antígenos	32
2.7.3.2	Detecção de anticorpos	33
2.8	Citometria de fluxo aplicada ao diagnóstico	36
3	JUSTIFICATIVA	41
4	OBJETIVO GERAL	43
4.1	Objetivos específicos	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Artigo 1 publicado - “Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV Infected Patients in Pernambuco, Brazil”	44
5.2	Artigo 2 em redação – Flow cytometry for the detection of antibodies anti -<i>Leishmania infantum</i> in HIV-infected patients	51
5.3	Artigo publicado 3 - <i>Performance evaluation of anti-fixed Leishmania infantum promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral leishmaniasis</i>	73
6	CONCLUSÃO	82
7	PERSPECTIVAS	83
	REFERÊNCIAS	84

APÊNDICE A – TCLE: GRUPO PACIENTE	99
APÊNDICE B – TCLE: GRUPO PACIENTE MENOR DE IDADE	101
APÊNDICE C – TCLE: GRUPO PACIENTE (12 ANOS A 18 ANOS INCOMPLETOS)	103
APÊNDICE D – TCLE: GRUPO CONTROLE	105
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	107
ANEXO B – “DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS LEISHMANIOSES: COMPARAÇÃO ENTRE A CITOMETRIA DE FLUXO E MÉTODOS CONVENCIONAIS” (CAPÍTULO DO EBOOK PATOLOGIA DAS DOENÇAS PUBLICADO NA EDITORA ATENA)	108

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença negligenciada endêmica em 76 países do mundo, onde 90% dos casos encontram-se na Índia, Etiópia, Sudão, Brasil, Bangladesh e Sudão do Sul. No Brasil, a doença é causada pela espécie *Leishmania infantum*, protozoário do complexo *Leishmania donovani* (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018).

O desenvolvimento da pandemia do HIV/AIDS durante os últimos 40 anos modificou o espectro da leishmaniose nos campos clínico e epidemiológico. A partir de meados da década de 1980, foi publicado o primeiro caso de Leishmaniose Visceral associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), caracterizando a coinfeção LV-HIV/AIDS. A disseminação da infecção pelo HIV para áreas rurais e a urbanização do ciclo de transmissão de *L. infantum* podem ter influenciado a história natural dessas doenças, incluindo a aceleração da progressão clínica de ambas devido à imunossupressão cumulativa. Além disso, a presença de infecção pelo HIV em áreas endêmicas de LV acarretou o aumento do risco de desenvolvimento desta doença (ALVAR et al., 2008).

A identificação da LV associados ou não a outras comorbidades é crucial para o correto direcionamento da terapêutica e, conseqüentemente, um melhor prognóstico, além de direcionar de forma mais efetiva as medidas para o controle da doença. O diagnóstico da LV consiste nos sinais e sintomas clínicos e é amparado por testes laboratoriais (CHAPPUIS et al., 2006). A identificação de *Leishmania* em aspirados de medula óssea é o padrão ouro para o diagnóstico da LV, porém sua execução na rotina é dificultada, pois requer profissionais treinados, assim como há riscos associados a coleta, como hemorragia, limitando-a a serem realizadas nos hospitais de referência (MAIA et al., 2012). Devido a marcante hiperglobulinemia policlonal característica da doença e pela redução dos riscos associadas a coleta do material biológico, os testes sorológicos são amplamente utilizados no diagnóstico da LV. Entretanto, os testes convencionalmente utilizados no diagnóstico da doença apresentam limitações que comprometem o seu desempenho. Dentre elas estão: alta taxa de reatividade cruzada com outros parasitas, impossibilidade de discriminação entre infecções recentes e tardias e, nos casos de indivíduos com quadros de imunossupressão, a redução da sensibilidade, devido à redução da produção de anticorpos (BOELAERT et al., 2004; SAKKAS et al., 2016).

Nesse contexto, estudos estão sendo desenvolvidos buscando novas alternativas diagnósticas. Assim, a citometria de fluxo destaca-se devido a sua alta versatilidade em

investigações laboratoriais. Em doenças parasitológicas como a Doença de Chagas, Leishmaniose Cutânea, Leishmaniose Visceral humana e canina, a citometria de fluxo tem apresentado altos valores de sensibilidade e especificidade, sendo considerada uma ferramenta promissora para o uso no diagnóstico e critério de cura (ANDRADE et al., 2007; GARCIA et al., 2009; KER et al., 2013; LEMOS et al., 2007; MARTINS-FILHO et al., 1995; MATOS et al., 2011; PEREIRA et al., 2012; ROCHA et al., 2002; ROCHA et al., 2006).

Embora estudos preliminares com um número reduzido de amostras já foram desenvolvidos avaliando a aplicabilidade da citometria de fluxo na LV, nos casos de coinfeção LV-HIV/AIDS essa metodologia ainda não foi avaliada. Pesquisas ainda são necessárias para avaliar o seu desempenho frente às outras abordagens sorológicas utilizadas no diagnóstico da LV, permitindo uma melhor compreensão da resposta humoral da doença, pois o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania* ainda não está completamente esclarecido nos mecanismos imunopatológicos envolvidos na resistência e/ou patogênese da infecção.

Nesta tese, foi elaborada uma revisão bibliográfica que abrange desde aspectos gerais da LV até particularidades dos tipos de diagnóstico que foram desenvolvidos para a identificação do parasito, sendo o mesmo publicado em um capítulo de livro. E foram realizados dois estudos: um de prevalência para identificação dos casos de coinfeção LV-HIV/AIDS e outro de avaliação diagnóstica com o uso da citometria de fluxo nos casos de LV e coinfeção LV-HIV/AIDS. Assim, os procedimentos metodológicos, os resultados obtidos e suas respectivas discussões foram apresentados nos três artigos, produtos do projeto de doutorado. O primeiro, publicado na revista *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, mostrou a prevalência da coinfeção LV-HIV/AIDS em pacientes internos em hospitais na cidade do Recife em Pernambuco. O segundo artigo que será submetido na revista *Microbial Pathogens* avaliou a citometria de fluxo na identificação de coinfeção LV-HIV/AIDS, utilizando alguns pacientes identificados no estudo de prevalência. E o terceiro artigo, aceito para publicação na revista *Journal of Immunological Methods* avaliou o desempenho da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por citometria de fluxo na identificação da LV. Dessa maneira, os resultados exibidos nesta tese tem o propósito de mostrar a citometria de fluxo como uma ferramenta sorológica alternativa e efetiva para identificação dos casos da Leishmaniose Visceral humana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

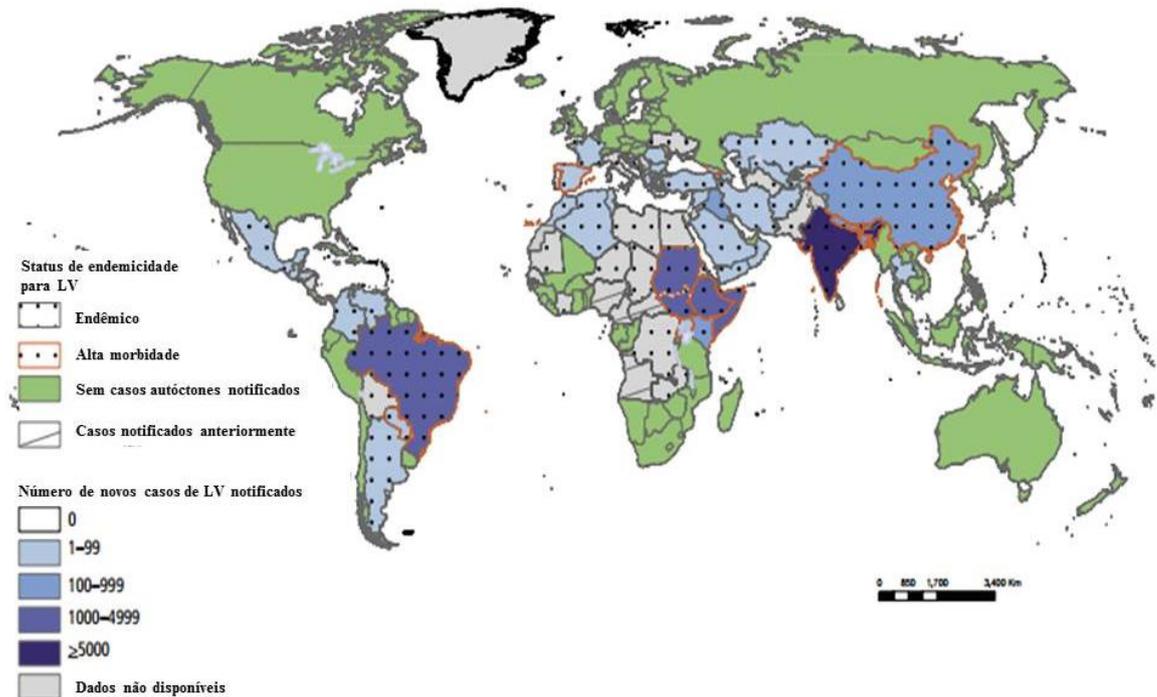
A Leishmaniose Visceral é uma doença grave que atinge principalmente a população dos países em desenvolvimento. A LV e quando associada a infecção pelo HIV, pode acarretar graves comprometimentos ao paciente. Nesse contexto o referencial teórico da tese consistiu na descrição teórica dos aspectos epidemiológicos, classificação taxonômica do agente etiológico, aspectos biológicos do ciclo do parasita, aspectos da resposta imune, tratamento, manifestações clínicas e diagnóstico clínico e laboratorial da LV e da coinfeção LV-HIV/AIDS.

2.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

As Leishmanioses compreendem um grupo de doenças negligenciadas endêmicas em 98 países que são transmitidas por vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (ALVAR et al., 2012). As leishmanioses apresentam as manifestações clínicas nas formas: Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC) e Visceral (LV) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A LV é uma doença grave, com distribuição mundial principalmente nas zonas tropicais e subtropicais, onde a estimativa de incidência mundial é de 0,2 a 0,4 milhões de casos com aproximadamente 50 mil mortes ao ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose Visceral no mundo



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2017, tradução nossa).

Na América Latina, 96% dos casos encontram-se no Brasil, estando a doença em expansão nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2018). A região Nordeste do Brasil possui 47,5% das notificações do país (BRASIL, 2014). No país, a importância da LV reside não somente na sua alta incidência, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes, atingindo principalmente pessoas que vivem em situações socioeconômicas precárias (ALVARENGA et al., 2010; DESJEUX, 2004). Crianças do sexo masculino de regiões rurais é o grupo populacional mais afetado, porém existe a tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens em regiões urbanas (BRASIL, 2014; SILVA et al., 2001; WERNECK, 2008).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN houve uma evolução na distribuição geográfica da LV no Estado de Pernambuco entre os anos de 2006 e 2016 com um total de 1089 casos registrados em 130 municípios, representando praticamente todo o território pernambucano. O sertão ainda apresenta a grande concentração dos casos, entretanto houve um evidente crescimento dos casos na Região Metropolitana do Recife neste mesmo período.

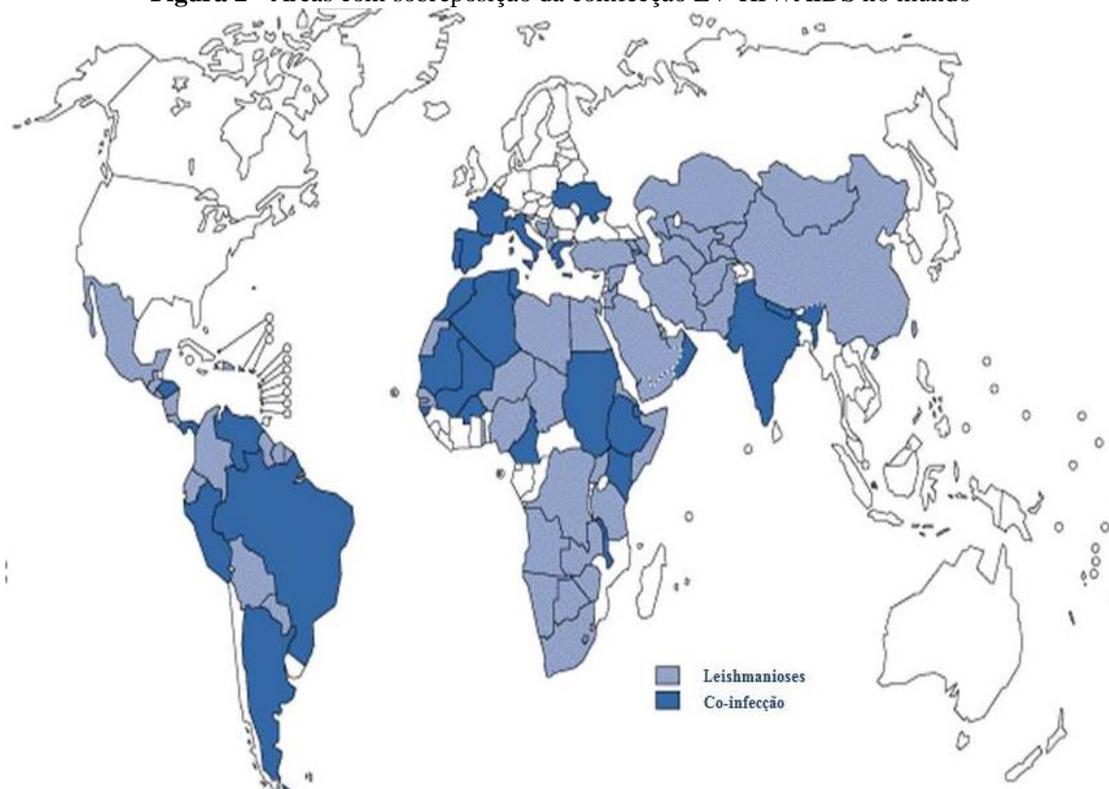
O desenvolvimento da pandemia do HIV/AIDS durante os últimos 40 anos modificou o espectro da LV nos aspectos clínico e epidemiológico. A partir de meados da década de 1980, foi publicado o primeiro caso de leishmaniose associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LOMA et al., 1985). Desde 2001, 35 países (Figura 2) relataram que entre 2 a 30% dos casos de LV eram coinfectados com HIV, mas estes percentuais são provavelmente subestimados (ALVAR et al., 2008; CRUZ et al., 2006, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

O aumento no número de casos de coinfeção surge da sobreposição com a epidemia de AIDS, principalmente em áreas onde a LV é endêmica, onde a infecção pelo HIV aumenta o risco do desenvolvimento da LV de 10-100 vezes. Mudanças epidemiológicas, tais como o aumento da população em zonas suburbanas, onde o vetor e o reservatório são abundantes, aumentaram esta sobreposição (BRASIL, 2014; CRUZ et al., 2006). A LV acelera a progressão a condição da AIDS, o que aumenta a letalidade, tornando-se cinco vezes maior durante a coinfeção (PINTADO; LOPES-VELEZ, 2001). Uma justificativa plausível é que as formas amastigotas possam induzir a replicação viral durante a infecção dos macrófagos (CRUZ et al., 2006; GUERIN et al., 2002).

No Brasil, esta associação também tem sido descrita de maneira crescente, sendo o país que apresenta mais de um terço dos casos de coinfeção da América Latina. No país, estudos referentes à coinfeção estão concentrados em relatos de casos locais e estudos de revisão (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA et al., 2010; BARBOSA-JÚNIOR et al., 2015; BERMAN, 2006; BORGES et al., 1999; CALICH et al., 1991; CAVALCANTI et al., 2012; CARNAÚBA et al., 2009; COTA et al., 2011; COTA et al., 2012; COTA et al., 2013; COTA et al., 2014; DAHER et al., 2009; DIEHL et al., 2004; FERREIRA et al., 2001; LINDOSO et al., 2016; LINDOSO et al., 2018; MACHADO et al., 1996; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; MALAFAIA, 2009; RABELLO et al., 2003; SOUSA-GOMES et al., 2011; SILVA et al., 2013; VIANA et al., 1994; SILVA et al., 2002), e ainda poucos são os estudos de prevalência (CARRANZA-TAMAYO et al., 2009; GUEDES et al., 2018; ORSINI et al., 2002).

Segundo dados do SINAN no período de 2007 a 2017, foram confirmados 41.263 casos para LV no Brasil, dos quais 3.037 apresentavam a coinfeção LV-HIV/AIDS o que revela o aumento progressivo do número de casos no país.

Figura 2 - Áreas com sobreposição da coinfeção LV-HIV/AIDS no mundo



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2007).

2.2 Classificação taxonômica

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae que abrange os protozoários unicelulares, digenéticos (heteróxeos) (NEVES, 2012). No Continente Americano, a espécie que se destaca por apresentar importância epidemiológica é a *Leishmania chagasi*, onde Cunha e Chagas (1938) a consideram idêntica a *Leishmania infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia; enquanto que a espécie responsável pela doença no Velho Mundo é *L. donovani*. (BRASIL, 2009; DOURADO et al., 2007; FAUCHER; PIARROUX, 2011; GONTIJO; MELO, 2004).

A taxonomia do gênero *Leishmania* é fundamentada em duas correntes científicas: A primeira é baseada em dados genéticos e enzimáticos que defendem a classificação de *L. infantum* e *L. chagasi* como mesma espécie, pelo fato de apresentarem diferenças mínimas a nível molecular (LUKES et al., 2007; MAURICIO et al., 2000) e, por isso, devendo ser utilizadas como sinônimas. A segunda considera que características fenotípicas e genotípicas as definem como espécies diferentes, separando em duas subespécies, atribuindo os nomes *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005), sendo esta, aceitável por alguns pesquisadores (SHAW, 2006).

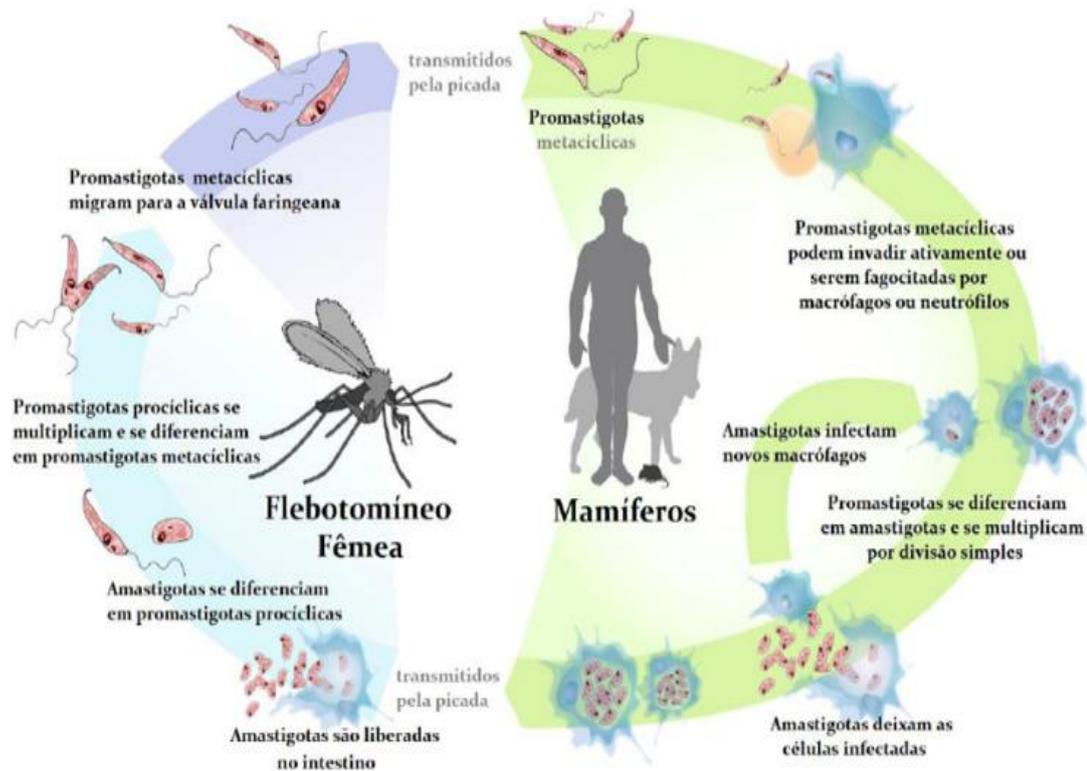
A definição de *L. infantum* e *L. chagasi* como sinônimas é a mais adotada, sendo recomendada até que uma nova classificação para o gênero *Leishmania* seja proposta. A nomenclatura utilizada para descrever a espécie responsável pela LV nas Américas é *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (DANTAS-TORRES, 2006; LUKES et al., 2007; MAURICIO, et al., 2000), sendo esta a forma utilizada no presente estudo.

2.3 Aspectos biológicos do ciclo

Os hospedeiros invertebrados capazes de transmitir a LV são as fêmeas dos insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (Diptera: Psychodidae da subfamília Phlebotominae), onde a espécie *Lutzomyia longipalpis* é a transmissora da doença no Brasil (BRASIL, 2009; REY, 2011).

A infecção do vetor ocorre durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ao ingerir macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania* spp. No intestino médio do inseto, o alimento é revestido por uma membrana quitinosa, a matriz peritrófica, onde ocorre a diferenciação das amastigotas em formas promastigotas, que se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária, seguindo pela porção torácica do intestino do vetor até a completa diferenciação em promastigotas metacíclicas (BRASIL, 2006; NEVES, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Ao realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e, entre estes, o homem) o inseto vetor libera pela probóscide as formas promastigotas metacíclicas, que serão fagocitadas pelas células dendríticas e macrófagos do hospedeiro. No interior dessas células ocorre a diferenciação das promastigotas em amastigotas, que irão se multiplicar intensamente até o rompimento das células hospedeiras, levando à liberação das amastigotas que poderão se disseminar pelo sistema vascular e linfático para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea ou ser ingeridas por novos insetos vetores, perpetuando, assim o ciclo de vida do parasita (Figura 3) (CHAPPUIS et al., 2007).

Figura 3 - Ciclo de vida do gênero *Leishmania* spp



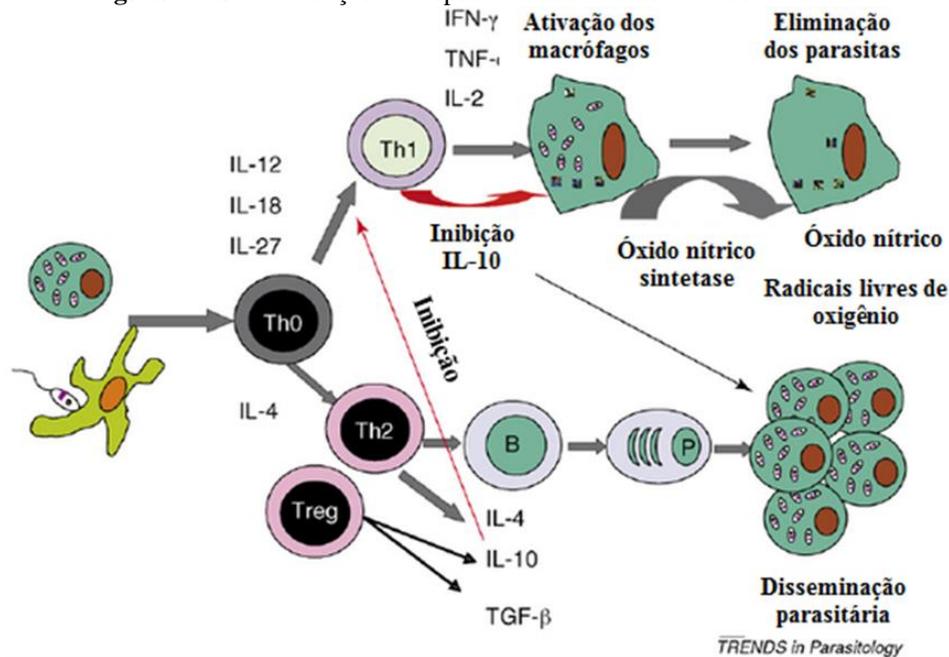
Fonte: Osado (2011, tradução nossa.)

2.4 Resposta Imune na Leishmaniose Visceral humana

A LV humana varia de um quadro fatal a uma infecção assintomática. Ainda não foi bem estabelecido quais os fatores determinantes para o desenvolvimento desses quadros da doença. Porém, observa-se uma relação com os fatores ambientais, status imune do hospedeiro e *background* genético do parasita e do hospedeiro (KUMAR et al., 2012).

No universo das leishmanioses, as diversas interações entre as células do hospedeiro e moléculas do sistema imunológico modulam a resposta imune (DUTHIE et al., 2012). Os modelos murinos ajudam a compreender o importante papel das citocinas pró-inflamatórias da via Th1 na resistência e das citocinas da via Th2 associadas à susceptibilidade (MULLER et al., 1989) (Figura 4). Em contrapartida, essa relação imunológica tem apresentado algumas discordâncias quando comparados os modelos murinos aos ensaios clínicos com seres humanos (RODRIGUES et al., 2016).

Figura 4 – Caracterização da resposta imune na Leishmaniose Visceral



Fonte: Baneth et al (2013, tradução nossa).

A resposta do tipo Th1 é caracterizada pela produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno (APC) e IFN- γ pelas células T (HEINZEL et al., 1989; SCOTT et al., 1989). A IFN- γ é uma citocina chave para a eliminação das amastigotas intracelulares nos macrófagos por meio da ativação da produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KIMA; SOONG, 2013). Pacientes com LV ativa possuem uma depleção da resposta imune celular, em consequência da falha das células mononucleares do sangue periférico em proliferar e/ou produzir IFN- γ em resposta a estimulação aos antígenos de *Leishmania* (NYLEN et al., 2007; SACKS et al., 1987).

Em contrapartida, o perfil Th2 tem sido relacionado a uma maior carga parasitária e inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos ativados por IFN- γ . Esse fato se deve principalmente pelas citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , levando também a uma inibição da diferenciação de linfócitos Th1, principalmente por IL-10 (GAUTAM et al., 2011).

Adicionalmente, os linfócitos Th17 são produtores de algumas citocinas, tais como a IL-22, IL-6 e principalmente a IL-27. Ainda que o papel dessas citocinas na infecção por *Leishmania* spp. não esteja completamente elucidado, têm sido observado que o perfil Th17 é um modulador crucial da imunidade adaptativa contra parasitas de *Leishmania* spp, atuando principalmente no recrutamento de neutrófilos e desempenhando um duplo papel no local da

infecção, esse papel está relacionado, principalmente, à espécie de *Leishmania* e aos fatores inerentes ao hospedeiro (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

As citocinas previamente descritas produzidas por células T ativadas induzem a troca de linfócitos B para as subclasses de IgG e são, portanto, obrigatórias para algumas respostas humorais. O IFN- γ , citocina do perfil Th1, regula positivamente os isotipos IgG2a e IgG3 em camundongos e provavelmente IgG1 e IgG3 em humanos. As citocinas IL-4 e IL-5, do perfil Th2, estimulam a produção de altos níveis de isotipos IgM, IgE e IgG, como IgG1 em camundongos e IgG4 em humanos (ABASS et al., 1996).

Pacientes com LV ativa apresentam altos níveis de IgE, IgM e IgG anti-*Leishmania*. Assim, sugere-se que a presença desses anticorpos seja um fator preditor da doença, mas isso ainda não foi confirmado (DA MATTA et al., 2000). Várias pesquisas em modelos experimentais observaram que a produção de células B e anticorpos contribui para a patologia da LV. Camundongos que não apresentavam células B tinham menos susceptibilidade à infecção por *L. donovani*. De fato, a hipergamaglobulinemia tem sido reconhecida há muito tempo como um dos sinais cardinais da LV e correlaciona-se positivamente com a gravidade da doença e diminui após o tratamento (CALDAS et al., 2005; DA MATTA et al., 2000; MILES et al., 2005). A teoria de que os anticorpos são prejudiciais para o hospedeiro é suportada pela observação de que, quando fagocitada por macrófagos, as amastigotas opsonizadas por IgG promovem a secreção de IL-10 e inibem a produção de IL-12 (BUXBAUM, 2008; MILES et al., 2005; THOMAS et al., 2008). Assim, altos níveis do título de anticorpos e complexos imunes formados na LV podem contribuir para o elevado nível de IL-10, que está relacionado ao progressivo declínio do status imune dos indivíduos. Porém, tem sido observado em indivíduos curados o declínio de isotipos como IgG1 e IgG3 (isotipos associados ao perfil Th1), assim, uma vez compreendido esse mecanismo, esses isotipos tem o potencial de serem utilizados como biomarcadores de cura (BHATTACHARYYA et al., 2014; GOMES et al., 2010).

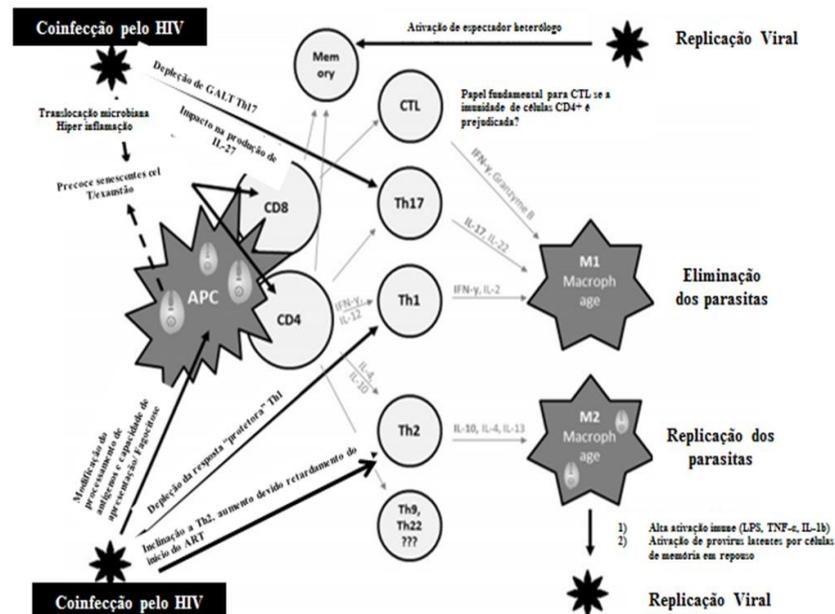
Em estudo utilizando primatas não humanos como modelo de LV, a hipergamaglobulinemia foi estabelecida logo após a infecção e persistiu durante a fase crônica. No entanto, a produção de IgG específica para *Leishmania* spp foi de curta duração e diminuiu na infecção crônica, implicando que a maioria dos anticorpos produzidos não são específicos para o parasita (RODRIGUES et al., 2014). Um estudo demonstrou que a IgG específica do parasita é necessária para a captação de *L. major* e a produção de IL-12 por células dendríticas (DCs), sugerindo que a captação mediada por Fc γ R. Além disso, em um modelo de coinfeção de *L. amazonensis* e *L. major* em camundongos, demonstrou-se que a

resolução da lesão necessitava de anticorpos específicos que fossem capazes de aumentar os mecanismos microbicidas nos macrófagos promovendo a produção de EROs (GIBSON-CORLEY et al., 2010; GIBSON-CORLEY et al., 2012). Como tal, o papel dos anticorpos e dos receptores *Fc* durante as infecções por *Leishmania* é mais complexo do que previamente visto, sendo o resultado da ligação *FcγR* claramente dependente do contexto. O que pode levar a mecanismos pro ou anti-inflamatórios, dependendo da identidade dos receptores *Fc* ativado, subclasse IgG ou tipo de célula (GALLO et al., 2010; GUILLIAMS et al., 2014).

O papel protetor dos anticorpos não pode ser excluído, pois já foi observado alta prevalência de indivíduos saudáveis positivos em áreas endêmicas (LEMOS et al., 2007), e os anticorpos anti-*Leishmania* podem persistir por longos períodos (mais de 15 anos) após a cura (GIDWANI et al., 2011; OZBILGE et al., 2006). Mesmo admitindo que a opsonização por IgG do parasita é deletéria para o hospedeiro, existem mecanismos alternativos pelos quais os anticorpos podem contribuir para a resposta protetora contra a *Leishmania* spp, por exemplo, a neutralização dos fatores de virulência do parasita. Anticorpos contra fatores de virulência de *Leishmania* spp, como a metaloprotease gp63, foram detectados nos soros de pacientes com LV (SHREFFLER et al., 1993), mas não está claro se eles são capazes de neutralizar ou desempenhar qualquer função protetora. Como tal, é imperativo identificar anticorpos com capacidade de neutralização e avaliar se a sua administração, como um imunoterápico, é capaz de modificar o curso da doença em benefício do hospedeiro. Em vez de considerar o papel dos anticorpos unicamente como patológico ou irrelevante, talvez seja mais coerente reconhecer que essas moléculas podem desempenhar papéis duplos (protetores e não protetores durante a LV) (RODRIGUES et al., 2016).

Na coinfeção LV-HIV/AIDS, macrófagos representam um importante reservatório comum para o HIV e para a *Leishmania*, servindo como veículos para disseminar os vírus e parasitas por todo o hospedeiro (BERNIER et al., 1995). Essa interação entre os patógenos leva a alteração das funções fisiológicas das células dendríticas e macrófagos, particularmente na capacidade de processamento e apresentação de antígenos (Figura 5) (ADRIAENSEN et al., 2018; KEDZIERSKA; CROWE, 2002).

Figura 5 – Caracterização da resposta imune na coinfeção LV-HIV/AIDS



Fonte: Adriaensen et al (2018, tradução nossa).

O HIV causa um vasto comprometimento da imunidade mediada por células, levando a baixos níveis de células CD4 + Th1, as principais células relacionadas a proteção na LV (ADRIAENSEN et al., 2018). Além disso, a infecção pelo HIV também demonstrou afetar a fagocitose e a replicação de parasitas de *Leishmania* spp por macrófagos (AZZAM et al., 2006; KEDZIERSKA; CROWE et al., 2002).

Além de alterar os estados de ativação de macrófagos infectados e células dendríticas, a infecção pelo HIV também altera sua resposta fisiológica. Por exemplo, a proteína de transativação de HIV-1 (Tat) aumenta a expressão de prostaglandina E2, ciclooxigenase 2 e factor de crescimento transformante beta (TGF- β) por macrófagos e células dendríticas, o que pode ser responsável pelo aumento da replicação de parasitas de *Leishmania* spp.

Em estudos *in vitro* foi demonstrado que a *L. infantum*, dentre outras citocinas, estimula a produção de IL-6 e TNF- α por células dendríticas e linfócitos T CD4+, e com isso há aumento da replicação do HIV (GARG et al., 2009). Ainda, relata-se que formas amastigotas de *Leishmania* spp que parasitam o intestino aceleram as lesões na mucosa intestinal já associadas à infecção pelo HIV, aumentando os níveis de translocação bacteriana para a corrente sanguínea, provocando uma resposta pró-inflamatória sistêmica e aumentando a ativação imunológica (CASADO et al., 2015)

Outros mecanismos de interação entre esses parasitas foram descritos como através do lipofosfoligano (LPG) da *Leishmania* spp que foi capaz de desencadear a transcrição de repetição terminal longa (RTL) do HIV-1 em células T através do motivo NF-kb, sugerindo

assim que a exposição de células T portadoras de HIV-1 para fagócitos infectados com *Leishmania* spp pode ser suficiente para iniciar a ativação de DNA do provírus latente (OKWOR; UZONNA, 2013).

Além disso, a estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados pelo HIV com antígeno de *Leishmania* spp resulta na produção de baixos níveis de IFN- γ , IL-12 e/ou IL-18 (citocinas-chave para induzir uma resposta Th1 robusta) quando comparados com os indivíduos saudáveis (WOLDAY et al., 2000).

Coletivamente, estas observações sugerem que o efeito inibitório do HIV e da *Leishmania* sobre a produção de IFN- γ pode não ser unicamente dependente do efeito anti-inflamatório da IL-10, mas pode estar relacionado com o efeito do HIV na regulação do IFN- γ por fatores indutores, tais como IL-12, IL-18 e IL-15 (WOLDAY et al., 2000).

2.5 Tratamento da Leishmaniose Visceral humana

As limitadas opções terapêuticas, o longo tempo de tratamento e a toxicidade dos medicamentos são um dos principais desafios para o controle das doenças negligenciadas como a LV. Nas últimas sete décadas, os antimonias pentavalentes são os medicamentos de primeira linha para o tratamento (CHAPPUIS et al., 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Ele está disponível em duas formas: Estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina.

A dose de antimoniato e o tempo de tratamento dependem da forma clínica e em alguns casos, os pacientes só evoluem para cura após a tentativa de vários esquemas terapêuticos (MELO; FORTALEZA, 2013). Na Índia e Nepal tem se observado um aumento dos casos de resistência aos antimonias, levando ao uso de regimes e tratamentos alternativos para essas regiões (VAN GRIENSVEN., et al 2010). Vários efeitos colaterais devido a toxicidade podem ser observada nos pacientes, como arritmias cardíacas, artralgia, mialgia e elevação de enzimas responsáveis pela função hepática e pancreática e, em indivíduos coinfectados LV-HIV/AIDS, a eficácia dessa medicação tende a ser menor, assim, como os efeitos adversos costumam ser mais frequentes (LAGUNA et al., 2003; SUNDAR et al., 2000).

A anfotericina B desoxicolato e a pentamidina são drogas de segunda linha, recomendadas para serem utilizadas na LV refratária. Apesar das altas taxas de cura, apresenta alta toxicidade com efeitos adversos como nefrotoxicidade, hipocalemia e miocardite. O que aumenta o tempo de internamento e os custos associados à terapia. Para

remediar esses efeitos várias formulações lipossomais foram desenvolvidas, como a anfotericina B lipossomal, anfotericina B complexo lipídico e a anfotericina B por dispersão coloidal. Apenas a anfotericina B lipossomal apresenta liberação para uso, porém apresenta um elevado custo e requer internação do paciente (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

O tratamento da LV em pessoas com HIV é feito utilizando-se a anfotericina B, preferencialmente na sua forma lipossomal, uma vez que essa apresenta menor toxicidade e melhor resposta do prognóstico quando comparada ao desoxicolato de anfotericina B e ao antimoniato, além de uma menor duração do tratamento (ROMERO et al., 2017). Entretanto, mesmo com o tratamento adequado e melhora clínica, a taxa de reativação e/ou recidivas nos indivíduos com HIV são superiores aos imunocompetentes (ARONSON et al., 2017; SILVA et al., 2013).

A miltefosina é uma droga antileishmanial de uso oral que se tornou uma das drogas mais utilizadas nos programas de eliminação da Leishmaniose Visceral na Índia, Nepal e Bangladesh. Porém, a taxa de recaída aumentou e a eficácia diminuiu após anos de uso do medicamento nessas regiões (MAHAJAN et al., 2015).

O surgimento de resistência ao uso das monoterapias fez surgir a necessidade do desenvolvimento de terapias combinadas com múltiplos fármacos, pois a atividade sinérgica ou aditiva desses compostos atuam em diferentes locais, assim possibilita uma diminuição de custo, pois diminui o tempo da terapia e a quantidade da dose utilizada.

Em estudo realizado na Índia, utilizando a combinação de drogas como a anfotericina B lipossomal e glucantime, foi observado altas taxas de cura com um reduzido tempo de tratamento (SUNDAR et al., 2008; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013).

Diante disso, o desenvolvimento de novos agentes anti-leishmanicida é de crucial importância visto as limitadas opções terapêuticas e o aumento da resistência às drogas convencionais, principalmente nos casos de coinfeção LV-HIV/AIDS. Entre as novas drogas que vem ganhando destaque com resultados promissores e com pesquisas desenvolvidas em fase 3 são o fexinidazole e o PA-824. (PONTE-SUCRE et al., 2017; RAETHER; HANEL, 2003; SUNDAR; SINGH, 2018; WINTER et al., 2013).

2.6 Manifestações clínicas e diagnóstico clínico da Leishmaniose Visceral humana

As manifestações clínicas na LV podem variar por inaparente ou assintomática, clássica, oligossintomática ou subassintomática, aguda e refratária (BRASIL, 2006). Na forma clássica o indivíduo apresenta um período de incubação assintomática e sintomas iniciais com

febre intermitente, mal estar e tremores. Posteriormente há o desenvolvimento de esplenomegalia acompanhada ou não com hepatomegalia. Fagócitos mononucleares no baço, fígado, medula óssea (MO) e linfonodos aparecem maciçamente parasitados, mas a infiltração é escassa. Células plasmáticas no baço são abundantes e associadas a elevada produção de anticorpos (WHO, 2010). Anemia, trombocitopenia e neutropenia são frequentes e refletem o sequestro esplênico e a supressão da função da medula óssea. Em estágios avançados, trombocitopenia e a depleção de protombina levam a severa hemorragia mucosa (FREITAS, 2016).

O amplo espectro de manifestações clínicas da LV reflete a complexidade da interação parasita-hospedeiro, na qual a genética do parasita, o *background* genético do hospedeiro e a sua resposta imune desempenham um papel importante (MEDDEB-GARNAOUI et al., 2001; PERUHYPE-MAGALHAES et al., 2005). Os principais fatores de riscos associados a progressão da doença para a forma sintomática são malnutrição, fatores genéticos e outras infecções associadas, como o HIV (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A apresentação clínica da LV envolve tipicamente febre a longo prazo, perda de peso, aumento do baço e do fígado, pancitopenia e hipergamaglobulinemia policlonal (IgG, IgE e IgM). A hipoalbuminemia observada na LV está associada ao edema e outras características da desnutrição. A diarreia pode ocorrer como resultado de parasitose intestinal e ulceração (SRIVASTAVA et al., 2011). A função hepática pode ser normal ou alterada e em fases posteriores da doença a produção de protrombina diminui. Com o tempo, a LV não tratada pode causar caquexia grave e hemorragia devido a trombocitopenia (BRASIL, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). A perda de trombócitos, bem como a diminuição da protrombina pode resultar em hemorragia mucosa grave que pode facilitar a sepse. Além disso, a perda de leucócitos eventualmente torna os pacientes LV imunossuprimidos e as infecções bacterianas são causa comum de morte (KUMAR et al., 2012).

O diagnóstico clínico da LV é complexo porque as características clínicas observadas podem ser compartilhadas com outras doenças febris hepatoesplênicas que são co-endêmicas com a LV. O diagnóstico clínico em pacientes com a coinfeção LV-HIV/AIDS é ainda mais complexo, devido a imunossupressão, a presença de doenças oportunistas podem atrapalhar o raciocínio clínico, além do aparecimento de um número maior de recidivas, há uma frequência maior de quadros atípicos, com o aparecimento de *Leishmania* em locais não convencionais como intestino, reto e pulmão (HERNANDEZ et al., 1995; NOCITO et al., 2002).

2.7 Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral humana

Diante das dificuldades apresentadas em relação ao diagnóstico clínico, principalmente nos casos de coinfeção LV-HIV/AIDS, torna-se imperativo o uso de testes laboratoriais eficientes, capazes de fornecer um diagnóstico precoce e preciso, para que haja a determinação da escolha do tratamento e direcione a vigilância epidemiológica. Nesse contexto, os testes que são convencionalmente utilizados para o diagnóstico da LV são descritos nas secções abaixo.

2.7.1 Diagnóstico parasitológico

O isolamento do agente etiológico é considerado o exame de primeira escolha, que consiste na visualização das formas amastigotas por microscopia. Geralmente é realizado em aspirado de medula óssea tendo sensibilidade entre 53% a 86%. A pesquisa de *Leishmania* pode ser realizada em a partir da punção de outros órgãos com sensibilidades variadas: baço (93%–99%) e gânglio linfático (52%–58%) (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). A ausência de parasita na pesquisa direta ou em cultura do aspirado de medula indica eficácia de tratamento, entretanto não assegura ausência de reincidência do quadro (BRASIL, 2015).

Apesar da alta especificidade, alguns fatores podem influenciar na sensibilidade do teste, como por exemplo: número reduzido de *Leishmania*, material hemodiluído devido uma coleta inadequada ou uso de antimoniais para o tratamento de micoses ou pneumocitoses (CRUZ et al., 2006). Esses ainda são considerados procedimentos invasivos que podem causar complicações sérias, exigindo ambiente apropriado e profissionais treinados para a coleta e identificação do parasita (FABER et al., 2003; MARQUES et al., 2006; SUNDAR; RAI, 2002; SINGH, 2003). Além disso, devido ao estado de imunodepressão dos indivíduos com HIV, o parasita pode não ser encontrado na medula óssea, mas sim em locais de apresentação menos comuns como estômago, cólon e pulmões (NIGRO et al., 2003; SRIVASTAVA et al., 2011).

Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico parasitológico direto, utiliza-se a cultura do material da biópsia ou do aspirado em meio de Nicolle-Novy-MacNeal (NNN) para identificação de formas promastigotas de *Leishmania* spp. (BRASIL, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Porém, além dos custos associados, é uma técnica que

demanda tempo, pois a duração média do crescimento do protozoário pode variar entre 2 dias a 6 semanas (BRASIL, 2014).

2.7.2 Diagnóstico molecular

Sistemas baseados em PCR (Reação em cadeia da Polimerase) em amostras de sangue periférico e medula óssea têm sido desenvolvidos para identificação de DNA de *Leishmania* spp. Diferentes sequências-alvo têm sido utilizadas: Espaçador transcrito interno ribossomal (ITS) (CUPOLILLO et al., 1995; NASEREDDIN et al., 2008; SCHÖNIAN et al., 2003;), gene mini-exon (HARRIS et al., 1998), sequências repetitivas de DNA nuclear (PIARROUX et al., 1993), gene da glucose-6-fosfato desidrogenase (CASTILHO et al., 2003), gene gp63 (MAURICIO et al., 2001), gene Hsp70 (FRAGA et al., 2010; GARCIA et al., 2004), gene do citocromo b (KATO et al., 2005) e sequências de RNA (ARORA et al., 2008; DEBORGGRAEVE et al., 2008; ZELAZN et al., 2005).

O ensaio de PCR baseado na amplificação do kDNA é considerado o mais sensível, porque este alvo molecular está presente em cerca de 10.000 a 20.000 cópias por parasita com sequências de 500 a 2.500pb (NUZUM et al., 1995).

Os alvos a partir do DNA ribossômico que apresentam cerca de 100 a 500 cópias do gene é composta por uma região promotora líder, o espaçador transcrito externo (ETS – External Transcribed Spacer), uma região codificadora do rRNA 18S, um espaçador não codificante interno (ITS-1), uma região codificadora de rRNA 5,8S, um outro espaçador não codificante interno (ITS- 2), uma região codificadora de rRNA 28S e, um segmento intergênico espaçador não transcrito, IGS (EL TAI et al., 2000). Apesar do baixo número de cópias do rDNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp., sendo esse alvo um dos mais utilizados na identificação de espécies (SCHÖNIAN et al., 2003).

O diagnóstico baseado em PCR tem como vantagens a rapidez na execução, a isenção de interpretação subjetiva e a capacidade de monitoramento terapêutico (ASSIS et al., 2016; NUNO MARQUES et al., 2007). O uso da PCR em tempo real (qPCR) permite a quantificação da carga parasitária num tempo de ensaio reduzido, assim torna-se uma ferramenta promissora para acompanhamento pós terapêutico de pacientes para o diagnóstico das recidivas (DANTAS-TORRES et al., 2017; REITHINGER; DUJARDIN, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). A PCR utilizando como substrato sangue

periférico tem sido recomendada como um teste pouco invasivo de primeira escolha, tanto para pacientes imunocompetentes como imunocomprometidos (ANTINORI et al., 2007).

Embora a reação em cadeia de polimerase (PCR) seja uma técnica altamente sensível e específica, há a necessidade de normalização, padronização e validação de ensaios de PCR e de diagnóstico para as comparações da sensibilidade e especificidade das diferentes abordagens sob condições de rotina (COTA, 2012; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Trata-se de um teste sofisticado para uso na rotina laboratorial, com exigências técnicas e custo elevado, limitando-se a laboratórios de referência e/ou clínica médica e seu desempenho dependem de algumas variáveis envolvidas como área endêmica, tipo de amostra, alvo utilizado para amplificação, método de extração do DNA, entre outros (CHAPPUIS et al., 2007).

2.7.3 Diagnóstico imunológico

O diagnóstico imunológico consiste na identificação de antígenos do parasita e na identificação de anticorpos produzidos em resposta a infecção parasitária.

2.7.3.1 Detecção de antígenos

A detecção de antígeno em urina por meio da aglutinação em látex (KAtex) é uma ferramenta de diagnóstico com venda comercial. Esse antígeno é um carboidrato termoestável de baixo peso molecular que foi detectado em pacientes com LV (Figura 4) (SARKARI et al., 2002).

Figura 6 – Teste de Aglutinação do Látex (KAtex).



Fonte: Silva, 2012

Legenda: 1- Controle positivo; 2- Amostra positiva; 3- Controle negativo.

Essa ferramenta é utilizada para o diagnóstico de LV, especialmente em áreas endêmicas de *L. donovani* (BOELAERT et al, 2008). No entanto, sua utilização em áreas endêmicas de *L. infantum* permanece limitada (BARBOSA-JUNIOR et al., 2015).

O KATEX apresenta uma sensibilidade de cerca 83% e especificidade de 98%, porém há uma alta heterogeneidade no desempenho dos trabalhos que avaliaram essa ferramenta (ASFARAM et al., 2018).

A detecção de antígenos parece ser uma alternativa promissora aos pacientes imunocomprometidos, os quais podem apresentar baixos níveis de anticorpos circulantes, principalmente em casos avançados, onde a resposta imune é prejudicada (ATTAR et al., 2001; GONTIJO; MELO, 2004). Além disso, há evidências de que a depuração antigênica na urina está correlaciona com a carga parasitária e a resposta ao tratamento (COTA et al., 2012). Porém, em estudo realizado na Etiópia com casos de coinfeção LV-HIV/AIDS, o KATEX apresentou baixa especificidade (49%) e baixo valor preditivo positivo (40%) para a avaliação dos casos durante o tratamento (VOGT et al., 2018). Assim, evidenciando a necessidade ajustes para a melhoria do desempenho da técnica.

2.7.3.2 Detecção de anticorpos

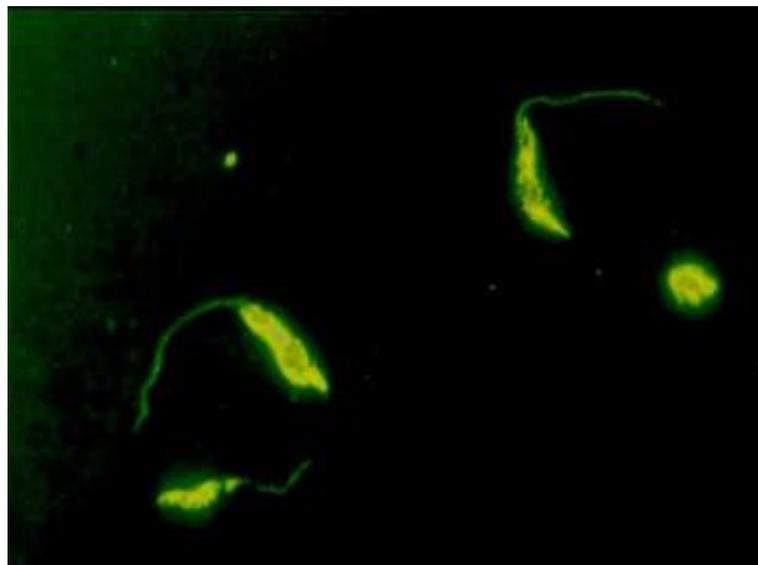
O diagnóstico sorológico é baseado na presença de resposta humoral específica, sendo considerado simples e pouco invasivo (BOELAERT et al., 2004). No entanto, a possibilidade de reações cruzadas com outros parasitas (*Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*) diminui a especificidade do teste (LOCKWOOD; SUNDAR, 2006). Portanto, é recomendável que utilize pelo menos dois testes sorológicos diferentes para cada paciente a fim de aumentar a sensibilidade e especificidade da detecção de anticorpos (PINTADO et al., 2001).

Em casos de pacientes portadores de HIV-AIDS, esse diagnóstico tem valor limitado, devido a imunossupressão, ocasionando uma redução de cerca de 40% na detecção de anticorpos anti-*leishmania* pelos testes (ALVAR et al., 1997; DIRO et al., 2014). Desta maneira, os testes sorológicos não devem ser usados para excluir um diagnóstico de *Leishmania* entre os infectados pelo HIV. Um resultado positivo em títulos baixos pode ter valor diagnóstico quando combinada com o perfil clínico-epidemiológico (COTA et al., 2012).

A reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) tem sido amplamente usada no diagnóstico da LV e é, atualmente, fabricada pela Bio-Manguinhos, Unidade da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro – RJ e disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde no Brasil

(SUS) (Figura 4) (ASSIS et al., 2012; BRASIL, 2014). É o teste sorológico mais utilizado para investigação da LV na América do Sul, mesmo entre os infectados pelo HIV (COTA et al., 2012; SAKKAS et al., 2016). Porém, apresenta baixa especificidade, exige na sua execução profissional bem treinado e é um procedimento laborioso (BRASIL, 2014; SUNDAR; RAI, 2002). A sensibilidade e especificidade são de 88-92% e 81-92%, respectivamente (BRASIL, 2014).

Figura 7 – Reação de Imunofluorescência indireta positiva mostrando as formas promastigotas de *L. infantum* em microscopia de fluorescência.



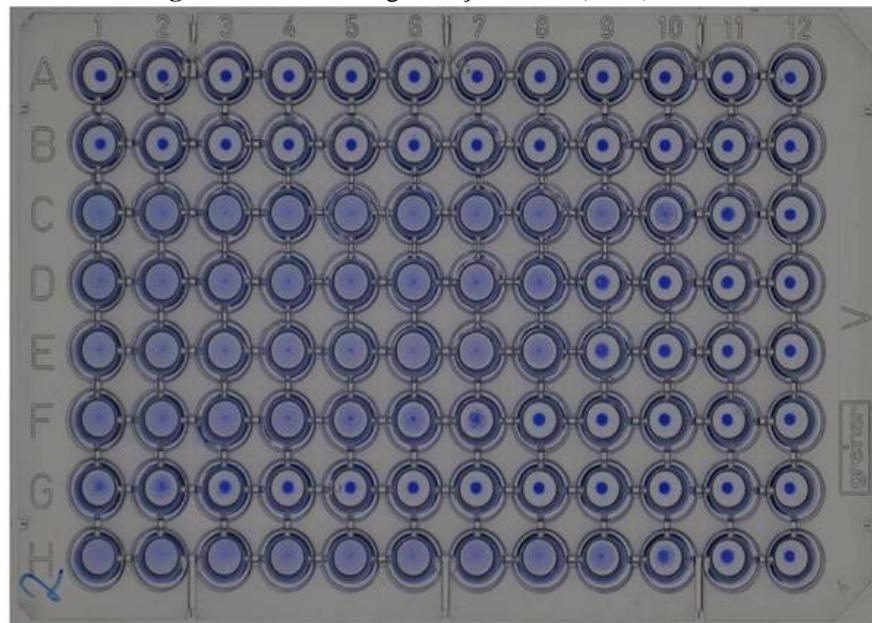
Fonte: Laurenti (2009).

O ensaio imunoenzimático, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) tem sido utilizado no diagnóstico da LV pela sua sensibilidade, considerada alta, mas sua especificidade depende do antígeno utilizado, sendo comercializado. O antígeno bruto solúvel a partir do cultivo de *Leishmania* spp apresenta sensibilidade de 80 a 100% (PEDRAS et al., 2008; WHO, 2010). Resultados promissores têm sido obtidos com o uso do antígeno recombinante rK39 (antígeno que contém 39 aminoácidos codificados por um gene de 117 pares de base em região altamente conservada da cinesina de *L. infantum*) (SAKKAS et al., 2016; SUNDAR; RAI et al., 2002).

Porém, em casos de pacientes portadores da coinfeção LV-HIV/AIDS, a pesquisa de anticorpos por ELISA apresenta, em geral, resultados menos satisfatórios, devido à baixa produção de anticorpos (COTA et al., 2012). Além disso é um método que exige profissional especializado, e assim como os demais testes sorológicos utilizados, não permite a distinção de uma infecção passada e uma ativa, limitando seu uso como critério de cura (SRIVASTAVA et al., 2011).

O Teste de Aglutinação Direta, do inglês Direct Agglutination Test (DAT) é um dos testes mais simples e de baixo custo já desenvolvido e comercializado para o diagnóstico da LV. Neste teste, as formas promastigotas são tripisinizadas, fixadas com formalina e coradas com azul brilhante. O soro do paciente após diluições seriadas é incubado com o antígeno, e a aglutinação é observada no dia seguinte (SUNDAR; RAI, 2002) (Figura 6). Um estudo de meta-análise avaliando o desempenho do DAT em pacientes com LV apresentou estimativas de sensibilidade e especificidade de 94,8% (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Figura 8 – Teste de Aglutinação Direta (DAT)



Fonte: Adams et al. (2012).

O teste apresenta elevada sensibilidade e especificidade, porém apresenta problemas no controle de qualidade do antígeno, além da necessidade de refrigeração e falta de padronização da leitura do teste (GONTIJO; MELO, 2004; SUNDAR; RAI, 2002). Tem-se observado que o DAT, dentre os testes sorológicos tradicionais, como a IFI e a ELISA-*L.infantum*, apresenta um melhor desempenho em coinfectados LV-HIV/AIDS, entretanto, seu desempenho pode ser influenciado pela diferença de região geográfica, ou seja, diferentes espécies de *Leishmania* spp. (COTA et al., 2012).

No caso da técnica de Imunocromatografia, o teste rápido, baseado na reação com o antígeno rK39 fixado em papel de nitrocelulose, utiliza-se uma gota de soro ou de sangue e em cerca de 15 minutos é possível fazer a leitura do teste. Portanto, é considerado como uma ferramenta simples e aplicável em trabalhos de campo (PASSOS et al., 2005). Desde 2018, tem-se disponível para comercialização e é ofertado pelo Ministério da Saúde o teste rápido

imunocromatográfico OnSite™ (Figura 7) que permite a diferenciação simultânea de Imunoglobulinas da classe G e M e é produzido pela empresa Bio Advance Diagnóstico, em substituição ao teste rápido imunocromatográfico IT-LEISH®, produzido pelo laboratório Bio-Rad (ASSIS et al., 2016, FREIRE et al., 2018).

Figura 9- Teste Rápido Imunocromatográfico OnSite™



Fonte: SabreSafety (2018).

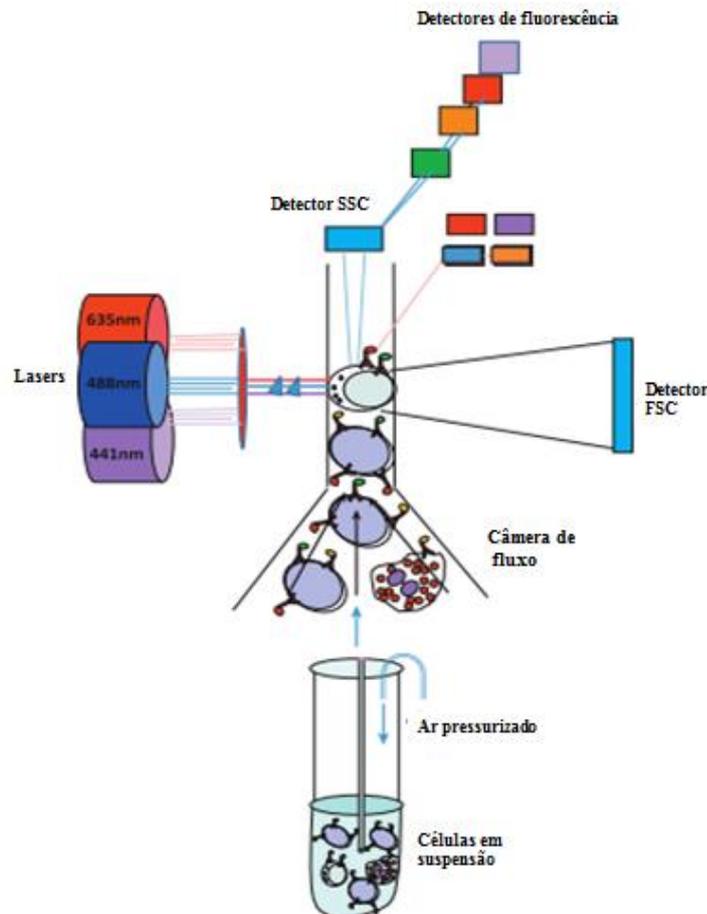
O desempenho do teste foi avaliado em um estudo prospectivo no Brasil, apresentando cerca de 91,2% de sensibilidade e 94,5% de especificidade. Apesar do alto desempenho, estes resultados indicam a necessidade de análises e comparações adicionais com o desempenho de outros testes comerciais disponíveis, a fim de definir o impacto deste novo teste na qualidade do diagnóstico da LV no Brasil, principalmente no quadro de coinfeção LV-HIV/AIDS (FREIRE et al., 2018).

2.8 Citometria de fluxo aplicada ao diagnóstico

A citometria de fluxo (CF) é uma tecnologia que permite a análise simultânea e multiparamétrica de células ou partículas em suspensão, avaliando-as individualmente. À medida que o fluxo passa por um ou mais feixes de luz (gerados por um ou mais lasers), o sistema óptico-eletrônico registra a forma como as estruturas dispersam a luz e a fluorescência do laser incidente, captando, assim, as luzes emitidas. O equipamento obtém informações de

diversos parâmetros, como tamanho relativo, complexidade interna e intensidades de fluorescências de cada célula ou partícula avaliada (DU et al., 2015; SHAPIRO, 2003).

Figura 10- Representação esquemática do citômetro de fluxo.



Fonte: Pedreira et al (2013, tradução nossa).

Em vista disso, a CF surge como uma tecnologia versátil, associando funcionalidade e precisão. Desde os anos 80, a CF estendeu-se progressivamente da pesquisa básica aos laboratórios de diagnóstico clínico, devido ao desenvolvimento da tecnologia de hibridoma e produção de anticorpos monoclonais, juntamente com a produção de uma ampla variedade de fluorocromos. Assim, houve o desenvolvimento de diversas investigações laboratoriais que incluem biologia molecular, patologia e imunologia com ampla aplicação na medicina, especialmente em transplantes, hematologia, avaliações do sistema imune, imunologia do tumor e quimioterapia (KALINA et al. 2012; COZZOLINO et al., 2016; PILLAI; DORFMAN 2016). Essa ferramenta revolucionou o diagnóstico, uma vez que proporciona uma avaliação precisa de múltiplos processos biológicos. Em virtude da expansão do uso da

CF, em 2006 foi criado um consórcio internacional, visando padronizar procedimentos e protocolos diagnósticos para leucemias e linfomas (KALINA et al., 2012). Além da investigação de doenças hematológicas com características de malignidade, bem como no desenvolvimento de fármacos, essa tecnologia é usada também na rotina dos Laboratórios Centrais (LACEN) de referência nacional como, por exemplo, para diagnóstico e acompanhamento de indivíduos soropositivos para HIV através da dosagem de células T CD4+ (DU et al. 2015; MOLINARO et al., 2009).

Atualmente, já existem trabalhos utilizando a citometria de fluxo como um método alternativo e auxiliar para o diagnóstico das Leishmanioses, possuindo vantagens sobre os métodos convencionais utilizados (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013; ROCHA et al., 2002; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015). A CF permite a análise quantitativa dos anticorpos anti-*Leishmania* e o procedimento de marcação é simples, através da utilização de anticorpos conjugados diretamente a fluorocromos (MARTINS-FILHO et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2013; PEDRAL-SAMPAIO et al., 2016).

Em metodologia desenvolvida originalmente por Martins-Filho et al., (1995) para a Doença de Chagas e aplicada por Rocha et al (2002) para a LTA, os dados são expressos sob a forma de percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) após a incubação de formas promastigotas de *Leishmania* com soros obtidos dos pacientes.

O uso da citometria de fluxo também já vem sido demonstrado como promissor no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) por apresentar elevada especificidade e sensibilidade, redução dos resultados falso-positivos em cães vacinados e menor reatividade cruzada contra outros patógenos caninos, além da distinção em cães assintomáticos e sintomáticos (ANDRADE et al; 2007; KER et al, 2013). Para a LVC, Carvalho Neta et al. (2006) estabeleceu a utilização da citometria de fluxo no diagnóstico pela detecção de anticorpos antipromastigotas fixadas de *L.infantum*, garantindo uma alta sensibilidade (99%) e especificidade (100%). Posteriormente, estudos utilizando uma série de casos de LV humana aprimoraram a técnica utilizando a ferramenta como um critério de cura pós-terapêutico (LEMOS et al., 2007; GOMES et al., 2010). Também foi observado que a quantificação das subclasses de IgG por ELISA ou citometria de fluxo levou a um aumento na acurácia dos testes para o diagnóstico da LTA. Demonstrando que a quantificação de IgG1 e IgG3 parece ser uma boa metodologia para o acompanhamento de pacientes de LTA e LV tratados (GOMES et al., 2010; SOUZA et al., 2005; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015).

Quadro 1 - Levantamento bibliográfico de artigos que fizeram uso da citometria de fluxo para o diagnóstico de tripanossomatídeos com ênfase nas Leishmanioses.

Ano	Autores	Objetivo	(continua)
			Aplicação diagnóstica
1995	MARTINS-FILHO et al.,	Estudo pioneiro que utilizou a citometria de fluxo para detectar anticorpos anti-tripomastigotas vivas em indivíduos com doença ativa e curados.	Doença de Chagas
2006	CARVALHO NETA et al.,	Padronizou uma nova metodologia para detecção de anticorpos antiformas promastigotas fixadas de <i>L. (L.) chagasi</i> , por citometria de fluxo (AAPF-IgG), e avaliou sua aplicabilidade e desempenho na identificação de casos de leishmaniose visceral canina (LVC).	Leishmaniose Visceral canina
2007	ANDRADE et al.,	Descreveu uma metodologia baseada em citometria de fluxo para detecção de anticorpos anti promastigotas fixadas de <i>L. (L.) chagasi</i> (FC-AFPA-IgG, FC-AFPA-IgG1 e FC-AFPA-IgG2) em amostras de soro de cães com doença ativa e vacinados.	Leishmaniose Visceral canina
2007	LEMOS et al.,	Analizou o desempenho de anticorpos IgG anti formas promastigotas vivas e fixadas de <i>L.chagasi</i> por citometria de fluxo como ferramenta de monitoramento da cura pós-quimioterapia	Leishmaniose Visceral humana
2008	PISSINATE et al.,	Analizou o desempenho de anticorpos IgG anti formas promastigotas fixadas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> por citometria de fluxo	Leishmaniose Tegumentar americana
2009	GARCIA et al.,	Avaliou o desempenho da citometria de fluxo para a detecção de anticorpos IgG anti promastigotas fixadas de <i>Leishmania chagasi</i> (FC-AFPA-IgG) para sorodiagnóstico da LV e avaliação da cura pós-terapêutica.	Leishmaniose Visceral humana
2010	GOMES et al.,	Avaliou subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) utilizando promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> como antígeno para aumentar o desempenho da citometria de fluxo para monitorar a eficácia do tratamento em LV.	Leishmaniose Visceral humana

Quadro 1 - Levantamento bibliográfico de artigos que fizeram uso da citometria de fluxo para o diagnóstico de tripanossomatídeos com ênfase nas Leishmanioses.

Ano	Autor	Objetivo	(conclusão) Aplicação diagnóstica
2012	PEREIRA et al.,	Avaliou por citometria de fluxo a detecção de IgG anti formas promastigota vivas e fixadas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> como meio de monitorar a cura pós-terapêutica de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL).	Leishmaniose Tegumentar Americana
2013	KER et al.,	Avaliou a citometria de fluxo como uma ferramenta diagnóstica sorológica, utilizando antígenos que haviam sido armazenados por 1 ano a 4°C, em uma ampla gama de amostras de soro.	Leishmaniose Visceral humana
2013	OLIVEIRA et al.,	Comparou as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e citometria de fluxo na avaliação clínica e laboratorial de pacientes antes e após a cura clínica e avaliou a aplicabilidade da citometria de fluxo na monitorização pós-terapêutica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA)	Leishmaniose Tegumentar Americana
2015	TEIXEIRA-CARVALHO et al.,	Desenvolver e avaliar o desempenho de um novo método sorológico por citometria de fluxo, denominado FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1, para a classificação de testes inconclusivos	Leishmaniose Tegumentar Americana, Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral Humana
2016	PEDRAL-SAMPAIO et al.,	Desenvolveu uma nova técnica sorológica utilizando microesferas de poliestireno sensibilizadas com antígenos de <i>Leishmania</i> solúveis como ferramenta para detecção de IgG no soro de pacientes com LTA por citometria de fluxo	Leishmaniose Tegumentar Americana

Fonte: A autora.

3 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral é uma doença grave que atinge principalmente a população dos países em desenvolvimento. A LV e quando associada a infecção pelo HIV, pode acarretar graves comprometimentos de órgãos essenciais ao funcionamento corporal, levando a uma grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo acometido e, conseqüentemente, desencadear um alto investimento do governo para cada internamento. Portanto, a LV consiste em um sério problema de saúde pública nos cenários mundial e nacional, e torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias para o seu controle efetivo.

Os testes sorológicos convencionais, utilizados para o diagnóstico, apresentam limitações e o critério de cura pós-terapêutico em pacientes com LV é baseado em parâmetros clínicos. Assim, torna-se imprescindível o aperfeiçoamento e/ou desenvolvimento de abordagens alternativas de sistemas de diagnóstico para o controle da LV. Um dos grandes desafios enfrentados tem sido a escolha de uma análise sorológica, tanto no que se refere a aplicação para estudos dos mecanismos moduladores/indutores de doença, bem como para o diagnóstico, prognóstico e critérios de monitoramento.

O grupo de pesquisas em Imunologia de doenças infecciosas e parasitárias vêm demonstrando a aplicação da citometria de fluxo na investigação diagnóstica de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e sua potencial aplicação no monitoramento da cura pós-terapia em Pernambuco (OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012). Além disso, o Laboratório de Doenças Transmissíveis (Departamento de Parasitologia/IAM) vem desenvolvendo pesquisas que visam auxiliar na correta identificação de casos de LV e coinfeção LV-HIV/AIDS (CAVALCANTI et al, 2012; SILVA et al 2013; BARBOSA-JÚNIOR et al., 2015).

São escassos os estudos que avaliem a prevalência da LV em indivíduos acometidos com HIV/AIDS no mundo e há uma clara necessidade de evidenciar o panorama da coinfeção LV-HIV-AIDS no estado de Pernambuco, algo até então desconhecido.

Apesar de terem estudos que avaliem a resposta humoral da doença, ainda não está completamente esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania*. A análise deste tipo de resposta na LV tem abordado o papel das imunoglobulinas em mecanismos imunopatológicos envolvidos na resistência e/ou patogênese da infecção.

Assim, a avaliação por citometria de fluxo, quanto à capacidade de detectar anticorpos IgG de *L. infantum* pretende contribuir para o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico alternativo inédito no estado de Pernambuco. E sua aplicabilidade poderá contribuir na identificação mais eficiente e precisa dos indivíduos acometidos por LV e coinfectados LV-HIV/AIDS.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso da citometria de fluxo no diagnóstico de portadores de Leishmaniose Visceral e na coinfeção com HIV/AIDS.

4.1 Objetivos específicos

- a) Identificar a prevalência da Leishmaniose Visceral humana em indivíduos vivendo com HIV/AIDS em Pernambuco;
- b) Avaliar o desempenho da citometria de fluxo no diagnóstico da LV em indivíduos vivendo com HIV/AIDS;
- c) Avaliar o desempenho da citometria de fluxo e comparar com outros quatro testes sorológicos (teste rápido rk39, ELISA, IFI e DAT) para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral humana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e suas respectivas discussões da tese foram apresentados em três artigos, produtos do projeto de doutorado. O primeiro, publicado na revista *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, mostrou a prevalência da coinfeção LV-HIV/AIDS em pacientes internos em hospitais na cidade do Recife em Pernambuco. O segundo artigo que será submetido na revista *Microbial Pathogens* avaliou a citometria de fluxo na identificação de coinfeção LV-HIV/AIDS, utilizando alguns pacientes identificados no estudo prevalência. E o terceiro artigo, aceito para publicação na revista *Journal of Immunological Methods* avaliou o desempenho da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por citometria de fluxo na identificação da LV.

5.1 Artigo 1 publicado - “*Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV-Infected Patients in Pernambuco, Brazil*”

Comum em quatro continentes, a leishmaniose visceral (LV) é uma doença importante, mas negligenciada. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumenta o risco de desenvolvimento de LV em pessoas de áreas endêmicas de leishmaniose, e há uma piora no prognóstico quando há coinfeção. Realizamos um estudo transversal para determinar a prevalência de coinfeção HIV/LV em pacientes admitidos em três hospitais de referência para HIV/síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em Pernambuco, Brasil, e comparamos características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais entre coinfectados HIV/LV e indivíduos mono-infectados pelo HIV. A amostra foi composta por pacientes com HIV com 18 anos ou mais, em um período de coleta de dados de 6 meses. Realizamos quatro testes de *Leishmania* - reação em cadeia da polimerase (PCR), teste de aglutinação direta, rK39, e teste de aglutinação em látex - e indivíduos com pelo menos um teste positivo foram considerados coinfectados. A prevalência de coinfeção HIV/LV encontrada foi de 16,9%. Observamos grande variação na prevalência segundo o teste de *Leishmania* utilizado, com baixa coincidência de testes positivos. Os sintomas mais frequentes encontrados foram perda de peso (75,6%), febre (67,6%) e tosse (55,3%). Quando comparamos os grupos co-infectados pelo HIV/LV e monoinfectados pelo HIV, não observamos diferenças estatisticamente significantes. Baixo nível educacional ($p = 0,004$) e palidez ($p = 0,009$) foram mais frequentes no grupo coinfectado. O nível sérico de albumina foi maior em indivíduos coinfectados ($P = 0,009$). É importante acompanhar esses indivíduos para entender a dinâmica da LV em

peessoas que vivem com o HIV. Novos testes são necessários, idealmente diferenciando a infecção ativa da latente. Testes para LV em pessoas com HIV é importante e deve ser considerado como parte da investigação inicial nesses indivíduos.

Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV-Infected Patients in Pernambuco, Brazil

Diego Lins Guedes,^{1,2*} Zulma Medeiros,^{2,3} Elis Dionísio da Silva,² Audrey Violeta Martins de Vasconcelos,⁴
 Mariana Santana da Silva,² Maria Almerice Lopes da Silva,² Paulo Sérgio Ramos de Araújo,²
 and Demócrito de Barros Miranda-Filho⁵

¹Curso de Medicina, Núcleo de Ciências da Vida, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brazil; ²Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil; ³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil; ⁴Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Recife, Brazil; ⁵Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract. Common in four continents, visceral leishmaniasis (VL) is an important but neglected disease. Human immunodeficiency virus (HIV) infection increases the risk of developing VL in people from leishmaniasis-endemic areas, with worse prognosis when there is coinfection. We conducted a cross-sectional study to determine the prevalence of HIV/VL coinfection in patients admitted in three referral hospitals for HIV/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Pernambuco, Brazil, and to compare epidemiological, clinical, and laboratory characteristics among HIV/VL coinfecting and HIV mono-infected individuals. The sample consisted of HIV patients aged 18 years or more, in a period of data collection of 6 months. We performed four *Leishmania* tests—polymerase chain reaction (PCR), direct agglutination test, rK39, and latex agglutination test—and individuals with at least one positive test were considered coinfecting. The HIV/VL coinfection prevalence we found was 16.9%. We observed large variation in prevalence according to the *Leishmania* test used, with low coincidence of positive tests. The most frequent symptoms found were weight loss (75.6%), fever (67.6%), and cough (55.3%). When we compared HIV/VL coinfecting and HIV mono-infected groups we did not observe statistically significant differences. Low educational level ($P = 0.004$) and pallor ($P = 0.009$) were more frequent in the coinfecting group. Serum albumin level was higher in coinfecting individuals ($P = 0.009$). It is important to follow-up these individuals to understand the dynamics of VL in people living with HIV. New tests are necessary, ideally differentiating active from latent infection. Testing for VL in people with HIV is important and should be considered as part of the initial investigation in these individuals.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is the clinical form of leishmaniasis more associated with HIV, and it is considered a public health problem.¹ Although it is widespread in 88 countries on four continents,² visceral leishmaniasis is one of the most neglected diseases.³ Six countries are responsible for 90% of all cases—Bangladesh, Brazil, Ethiopia, India, South Sudan, and Sudan.⁴ It is known that in endemic areas, the risk of developing VL in people living with HIV rises from 100 to 2,320 times.² Because this coinfection has a potentially poor prognosis, it deserves special attention.^{2,4}

Infection with *Leishmania* spp. in people living with HIV produces pronounced activation of cells from the immunological system and higher production of pro-inflammatory cytokines, turning these cells into targets of the virus and these accelerate the progression to AIDS.^{5,6} In some cases, it was observed activation or re-activation of latent infections by *Leishmania* spp., which occurs in a more immunocompromised stage caused by HIV.^{7,8}

Visceral leishmaniasis may be diagnosed from classic symptoms such as fever, pallor, and hepatosplenomegaly, associated with a positive serological or parasitological test. However, this classic presentation is not always observed in people living with HIV, leading to a delay in diagnosis and often making it a challenge.^{9,10}

No one method currently available to diagnose VL in people with HIV has optimal sensibility and specificity associated with low cost and ease of use. Because of this, it is suggested

to combine different methods to better positivity ratios and make more precise diagnoses.¹¹

This research aims to investigate the prevalence of this coinfection in hospitalized HIV individuals in Pernambuco, Brazil, and to compare HIV/VL coinfecting with HIV mono-infected individuals regarding epidemiological, clinical, and laboratorial aspects.

MATERIALS AND METHODS

This was a cross-sectional study with comparison of groups. It was conducted in Recife, capital of the state of Pernambuco, Brazil, with inpatients from three referral hospitals for infectious diseases—Hospital Correia Picanço, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, and Hospital das Clínicas. These three hospitals together represent about 70% of all hospital admissions related to HIV/AIDS in Pernambuco.

There was no sample calculation. The sample consisted of individuals aged 18 years or older, diagnosed with HIV at any time, and who agreed to participate in the study. The researchers went to the hospitals once a week, during a pre-established period (June 2014–November 2014 at hospital #1; July 2014–December 2014 at hospital #2; and October 2014–January 2015 at hospital #3), to collect data. We included anyone with HIV who agreed to participate in the survey. There was no exclusion criterion. The data were obtained from questionnaires, physical examination, and blood and urine samples.

The definition of HIV/VL coinfection was the presence of at least one positive test for leishmaniasis. Thus, the patients were divided into two comparison groups: those with at least one positive test for VL (HIV/VL coinfecting group) and those with negative results for all tests for leishmaniasis (HIV mono-infected group).

* Address correspondence to Diego Lins Guedes, Curso de Medicina, Universidade Federal de Pernambuco, Rodovia BR-104, Km 59, s/n—Nova Caruaru, Caruaru 55002-970, Brazil. E-mail: diego.linsguedes@ufpe.br

Data about gender, age, educational level, historical facts related to VL, and clinical signs were collected from questionnaires and from medical records. In addition, results from leukocyte count, hemoglobin, hematocrit, platelets, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea, creatinine, serum albumin, HIV viral load, and CD4 cells count were obtained from medical records.

We used four diagnostic tests for VL: two serological, rK39-immunochromatographic test (rK39-ICT) and direct agglutination test (DAT); one for detection of antigens in urine, using the latex agglutination test (KAtex); and one molecular test (PCR) in peripheral blood.

For the rK39-ICT, we used the DiaMed-IT LEISH kit (InBios International Inc., Seattle, WA). For DAT we used the DAT kit from Biomedical Research, Amsterdam, The Netherlands, and we considered a positive test when the result was equal to or greater than 1:6,400.¹² The search for antigens in urine was made using KAtex kit (Kalon Biological Ltd., Guildford, United Kingdom).

For the PCR from peripheral blood, DNA was extracted with the commercial kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). The process was performed according to the conditions described by Schönian et al.,¹³ targeting the internal transcript spacer 1, which produces a fragment with 300 pb–350 pb, depending on the *Leishmania* species, and primers LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') and L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'). The polymorphism analysis of the restriction fragment was performed with the products from PCR (15 µL) digested with 1 µL of *Hae*III at 37°C for 90 minutes, according to recommendations from the supplier (Invitrogen, Carlsbad, CA). Fragments from restriction were submitted to electrophoresis on a 3% agarose gel at 100 V in 1× Tris-acetate-EDTA buffer and visualized and photographed by using a transilluminator after they were colored with ethidium bromide (0.5 µg/mL). The band patterns were compared according to those described by Schönian et al.¹³ for each species.

For patients with one or more positive tests, we offered a bone marrow aspirate for parasitological analysis to clarify whether the leishmanial infection was active. From this aspirate we also performed PCR.

Data were stored on a Microsoft Excel® 2013 spreadsheet (Microsoft Corp., Redmond, WA) in double entry, with subsequent verification of the quality of the information entered using Epi Info™ 3.5.4 software (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). For data analysis, we used Stata® SE 12.0 (StataCorp, College Station, TX) for Windows.

For the general characterization of the sample, simple frequencies and means of the variables of interest were obtained. To compare the categorical variables such as presence of fever, origin, and schooling, the χ^2 test was performed, with significance level $P < 0.05$, in a univariate analysis. For all continuous variables, such as age and CD4 cells count, we applied the Skewness/Kurtosis normality test. To compare those with normal distribution, we used the *t* test. To compare the others with not normal distribution, we used the Kruskal–Wallis test.

The ethics committee on research from the Aggeu Magalhães Research Center approved this study with the number 13197313.6.0000.5190. All subjects were adults and provided written, informed consent.

RESULTS

The sample was composed of 207 participants (Figure 1). None of the individuals refused to participate in the study after signing the consent form. Three patients did not want to undergo bone marrow aspirate but remained in the study. According to our criteria, which was to have at least one positive test for *Leishmania*, the prevalence of HIV/VL coinfection in our study was 16.9%. Table 1 shows the positivity for each *Leishmania* test we used. All participants that were not tested with KAtex (22) and rK39 (3) were investigated with PCR for *Leishmania* test and had negative results.

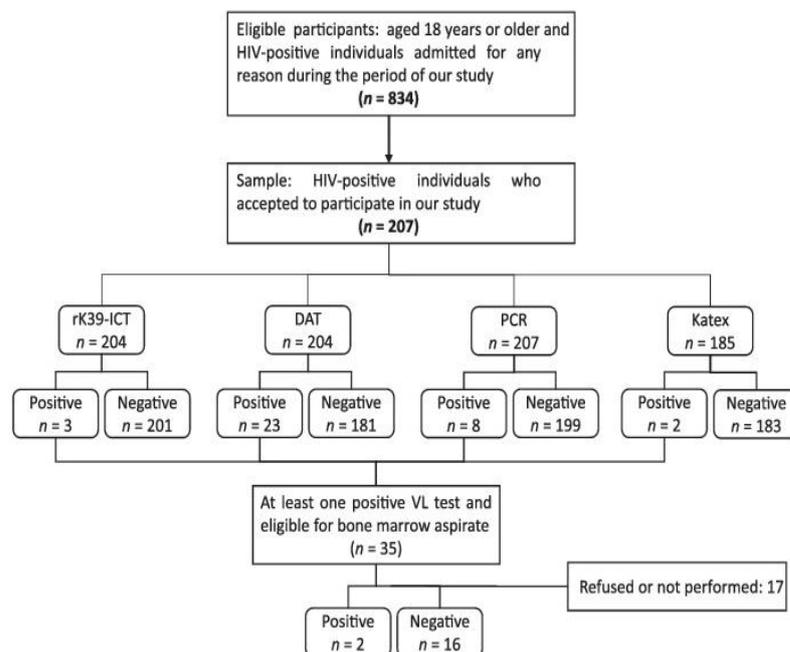


FIGURE 1. Flowchart with the sample and the positivity for each *Leishmania* test used.

TABLE 1

Prevalence of HIV/VL coinfection according diagnostic test for *Leishmania* spp.

VL test	Positivity	Prevalence (%)
rK39-ICT	3/204	1.5
Direct agglutination test	23/204	11.3
Latex agglutination test	2/185	1.1
PCR in peripheral blood	8/207	3.9
Total (at least one positive test)*	35/207	16.9

rK39-ICT = rK39-immunochromatographic test; VL = visceral leishmaniasis.

Note: from 18 investigated with bone marrow aspirate, two were positive (11.1%).

* Only one participant had two positive tests.

More than half of the sample was composed of young males with low education. The coinfecting group had a higher frequency of individuals with less than eight years of schooling ($P = 0.004$). Among the participants, 1.45% reported cases of VL in the family and 1.93% reported cases of VL in the neighborhood (Table 2). The most frequent symptoms in the study population were weight loss (75.6%), fever (67.6%), and cough (55.3%). The Table 3 shows the results of the comparison between HIV/VL coinfecting and HIV mono-infected individuals regarding clinical and laboratory characteristics. In univariate analysis we found statistically significant difference between groups with regard to presence of pallor, more frequent in coinfecting individuals ($P = 0.009$), and serum albumin, higher in coinfecting individuals ($P = 0.009$).

There was no statistically significant difference between groups regarding aspects of HIV infection, such as CD4 cells count or HIV viral load (Table 4).

Bone marrow aspirate was performed in 18 of the 35 cases, with two positive results for *Leishmania*. One of them was positive by DAT and the other was positive by PCR in peripheral blood. Three participants refused the bone marrow aspirate. The other 14, given their clinical condition, were discharged before the bone marrow aspirate had been offered.

Three (8.6%) of the 35 coinfecting patients had all the classic signs and symptoms of VL: fever, loss of weight, hepatomegaly or splenomegaly, and some cytopenia. These three patients had anemia and thrombocytopenia, and two of them had leukopenia. From these three patients, one had 11 CD4 cells/mm³, 118,999 copies/mL of HIV-RNA, and positive DAT; another had 209 CD4 cells/mm³, 6,317 copies/mL

of HIV-RNA, and positive PCR for *Leishmania* in peripheral blood; and the third had 406 CD4 cells/mm³, 173,209 copies/mL of HIV-RNA, and positive rK39-ICT. Bone marrow aspirate was performed in two of these three patients with negative results for *Leishmania* in both.

From the 207 individuals in the sample, 40 (19.3%) died during the period of the study. The mortality was 14.3% in the HIV/VL coinfecting group, whereas in the HIV mono-infected group it was 20.3% ($P = 0.408$).

DISCUSSION

The prevalence we found in this study (16.9%) was similar to the 16% observed by Carranza-Tamayo et al.¹⁴ in the city of Brasilia and approximated to the 20.2% found by Orsini et al.¹⁵ in Minas Gerais, Brazil. It is important to emphasize that despite the similarity in prevalence, there seem to be differences in the populations of each study. Our findings represent the prevalence of HIV/VL coinfection in patients hospitalized in referral services for infectious diseases in Pernambuco, which may imply the possibility of finding symptomatic and asymptomatic individuals for VL, whereas for Orsini, and probably also for Carranza-Tamayo, the study population consisted of asymptomatic individuals.

The prevalence found in our study and by two other Brazilian authors is comparable with that reported in the European Mediterranean region, which varies from 10% to 30% in asymptomatic individuals.¹⁶ In East Africa, however, prevalence ranged from 11.1% to 48.5% as shown in different studies in Ethiopia.¹⁷

Our study did not aim to evaluate the sensitivity and specificity of tests for VL. However, we observed a wide variation of positivity, depending on the diagnostic method used. Furthermore, the coincidence of positivity in the tests was low. Similar findings were reported by Carranza-Tamayo et al. and Orsini et al.^{14,15} We observed a considerable difference in positivity between the serological tests used in this study—DAT and rK39. This difference can be explained by the fact that DAT uses a crude antigen, which gives greater sensitivity to the test, whereas rK39 uses a recombinant antigen, with lower sensitivity and higher specificity, as suggested by Cota et al.¹¹

TABLE 2

Epidemiological characteristics of the sample of individuals seropositive for HIV investigated for VL in three referral hospitals of Pernambuco, Brazil, and results from the univariate analysis of the comparison between the HIV/VL coinfecting and HIV mono-infected groups

Variables	Total (N = 207)	HIV-VL (N = 35)	HIV (N = 172)	P value
Gender				
Male	140/207 (67.63%)	22 (62.86%)	118 (68.60%)	
Female	67/207 (32.37%)	13 (37.14%)	54 (31.40%)	0.508
Age				
18 to 39 years	115/207 (55.56%)	21 (60.00%)	94 (54.65%)	
40 years or older	92/207 (44.44%)	14 (40.00%)	78 (45.35%)	0.562
Mean (in years)*	39.66 ± 11.03	39.54 ± 11.27	39.68 ± 10.99	0.946
Educational level				
0-8 years	134/207 (64.73%)	30 (85.71%)	104 (60.47%)	
9 years or more	73/207 (35.27%)	5 (14.29%)	68 (39.53%)	0.004†
Prior leishmaniasis disease	2/207 (0.97%)	1 (2.86%)	1 (0.58%)	0.173
Leishmaniasis cases at home	3/207 (1.45%)	1 (2.86%)	2 (1.16%)	0.230
Leishmaniasis cases in the neighborhood	4/207 (1.93%)	1 (2.86%)	3 (1.74%)	0.365
Presence of domestic animals at home	97/207 (46.86%)	14 (40.00%)	83 (48.26%)	0.372

VL = Visceral leishmaniasis.

* Mean ± standard deviation.

† Statistically significant difference ($P < 0.05$).

TABLE 3

Clinical and laboratorial finds of HIV seropositive individuals investigated for VL in three referral hospitals in Pernambuco, Brazil, and results from the univariate analysis of the comparison between the HIV/VL coinfecting and HIV mono-infected groups

Variables	Total	HIV-VL	HIV	P value
Symptoms				
Fever	140/206 (67.63%)	24 (70.59%)	116 (67.44%)	0.719
Time of fever (in days)*	11.69 ± 11.44	11.47 ± 12.08	11.74 ± 11.37	0.948
Shortness of breath	101/206 (49.03%)	16 (47.06%)	85 (49.42%)	0.801
Bleeding	30/206 (14.56%)	6 (17.65%)	24 (13.95%)	0.577
Cough	114/206 (55.34%)	18 (52.94%)	96 (55.81%)	0.758
Diarrhea	97/206 (47.09%)	16 (47.06%)	81 (47.09%)	0.997
Loss of weight	152/201 (75.62%)	24 (70.59%)	128 (76.65%)	0.453
Loss of weight (kg)*	8.11 ± 4.95	7 ± 5.67	8.33 ± 4.80	0.110
Hepatomegaly	25/139 (17.99%)	3 (11.54%)	22 (19.47%)	0.342
Splenomegaly	14/139 (10.07%)	1 (3.85%)	13 (11.50%)	0.242
Rarefaction of hair	49/189 (25.93%)	6 (20.00%)	43 (27.04%)	0.419
Pallor	84/187 (44.92%)	20 (66.67%)	64 (40.76%)	0.009†
Laboratorial results*				
Leukocytes	5,993 ± 4,321	5,720 ± 3,484	6,054 ± 4,494	0.956
Neutrophils	4,054 ± 3,344	3,762 ± 2,760	4,121 ± 3,468	0.607
Lymphocytes	1,049 ± 825	1,072 ± 747	1,044 ± 843	0.499
Hemoglobin	10.03 ± 2.32	10.51 ± 2.53	9.92 ± 2.26	0.214
Hematocrit	29.89 ± 6.78	31.57 ± 7.41	29.51 ± 6.59	0.114
Platelets (×10 ³)	235.591 ± 135.871	244.9 ± 139	233.4 ± 135	0.627
AST	68.39 ± 103.74	54.72 ± 54.84	71.28 ± 111.3	0.367
ALT	58.60 ± 88.90	46.96 ± 45.42	61.00 ± 95.38	0.359
Urea	35.68 ± 27.21	32.47 ± 18.09	36.36 ± 28.80	0.987
Creatinine	0.97 ± 1.05	0.87 ± 0.53	0.98 ± 1.12	0.618
Albumin	3.13 ± 0.88	3.57 ± 0.79	3.01 ± 0.87	0.009†

VL = Visceral leishmaniasis.

* Mean ± standard deviation.

† Statistically significant difference ($P < 0.05$).

In coinfecting HIV/VL individuals, molecular tests are described as having better accuracy than serological tests such as DAT and rK39-ICT.¹⁸ We believe that this difference between prevalence based on DAT (11.2%) and PCR (3.8%) occurred because the study was performed with individuals hospitalized for any reason, not only with clinical suspicions of active VL. Therefore, positive serological tests may mean active disease or latent infection. Differences in prevalence values according to diagnostic tests also were observed in other studies.^{14,15}

Mortality rate is high in HIV/VL individuals.^{16,17,19} The lethality found in our study in the coinfecting group was 14.3%, being between the 8.7% observed by Cota et al.²⁰ and the 23.5% by Nascimento et al.,²¹ and approaching the 16.8% described by Lima et al.⁹ We did not find a statistical difference

when we compared the HIV/VL coinfecting group with the HIV mono-infected group. However, it is important to emphasize that the HIV mono-infected group were composed of hospitalized people with diseases in different levels of severity. On the other hand, we do not know the proportion of individuals who had active VL disease among the coinfecting, which, in fact, could result in higher lethality in the group.

The largest part of the sample were males with a mean age of 39 years. There was no difference from other studies and it probably reflects the proportion of HIV cases between men and women in the general population.^{9,15,22,23} Gil-Prieto et al.,²⁴ in Spain, observed that 90% of the HIV/leishmaniasis coinfecting individuals were aged between 25 and 49 years, not so far from the 75% in our study in the same age group. This is an important aspect because that is an economically active age.

TABLE 4

Characteristics relative to the HIV infection in the sample of HIV seropositive individuals investigated for VL in three referral hospitals in Pernambuco, Brazil, and results from the univariate analysis of the comparison between the HIV/VL coinfecting and HIV mono-infected groups

Variables	Total	HIV-VL	HIV	P value
Time since HIV diagnosis (in months)*	60.34 ± 68.08	75.25 ± 87.49	57.45 ± 63.57	0.259
In use of antiretroviral (ARV)	151/207 (72.95%)	22 (62.86%)	129 (75.00%)	0.140
Time using ARV (in months)*	44.06 ± 66.75	54.44 ± 89.05	42.16 ± 62.10	0.609
Viral load				
Undetectable (< 50 copies)	24/169 (14.20%)	5 (16.67%)	19 (13.67%)	
Up to 100,000 copies	85/169 (50.30%)	14 (46.67%)	71 (51.08%)	
More than 100,000 copies	60/169 (35.50%)	11 (36.67%)	49 (35.25%)	0.876
CD4				
Up to 200	107/174 (61.49%)	16 (51.61%)	91 (63.64%)	
200–500	46/174 (26.44%)	9 (29.03%)	37 (25.87%)	
500 or more	21/174 (12.07%)	6 (19.35%)	15 (10.49%)	0.308
Mean CD4*	219 ± 267	255 ± 282	211 ± 263	0.819

VL = visceral leishmaniasis.

* Mean ± standard deviation.

Regarding educational level, we observed a similar distribution in a study from Tocantins, Brazil.²⁵ Low educational level, although a majority in both HIV/VL and HIV groups, was higher in positive cases of VL, maybe because this disease affects the poorest areas.

More than half of the study participants had weight loss, fever, and cough. When comparing the two study groups with respect to clinical findings, we observed no difference, except for pallor, which was more frequent in the coinfecting group. Pallor was the third most frequent symptom in coinfecting individuals after fever and weight loss. This result was similar to that described by Albuquerque et al.²⁵ in Tocantins, Brazil. In another study in Teresina, Brazil, pallor was the most frequent symptom in HIV individuals with active VL.⁹ Although in our study, pallor had been more frequent in coinfecting than in mono-infected individuals, we cannot say that this difference is due to active VL because this prevalence investigation does not differentiate active disease from latent infection.

There was a statistically significant difference in the serum albumin level between the two groups. In the mono-infected group, the mean value was just less than the lower limit of normality, whereas in the coinfecting group, the mean value was at the lower limit of normal. Although this result seems contradictory to what we expected, it is important to consider that hospitalized patients with AIDS in our region usually have advanced disease and comorbidities, which are responsible for nutritional impairment that may result in a fall in serum albumin levels. On the other hand, patients who tested positive for *Leishmania* in our study did not necessarily have active VL.

A potential limitation of this study is the possibility of false-negative results especially when serological tests are used because of the immunodepression of some participants, and the biases associated with the time between infection and the tests. To minimize this possibility, we used a combination of tests that included antigenic (KAtex) and molecular ones. Another potential limitation is the use of serological tests that may imply cross-reactions to malaria, Chagas' disease, and other infections. Considering that malaria is not endemic in Pernambuco, this possibility is minimal.²⁶ Pernambuco has endemic areas of Chagas restricted to a specific region.²⁷ Although they are distant from the study city, this should be taken into account in interpreting positive tests. To minimize the possibility of cross-reaction generating false positive results, we used a higher cutoff point for the DAT and a specific target for PCR. We also used another serological test, rK39, which, although has lower sensitivity, is more specific.

Another potential limitation of this study was the impossibility of differentiating active disease from latent infection. However, this was not really a limiting factor because the main objective of the study was to investigate the prevalence of VL, regardless of the status of the infection. To identify patients with active disease, we advised bone marrow aspirate for participants with at least one positive test.

Follow-up of these patients with positive tests for *Leishmania* could help understand the dynamics of VL in people living with HIV. In addition, new laboratory techniques or improvement of current techniques, especially molecular tests, are necessary for faster and more accurate diagnosis, preferably with discrimination of active disease from latent infection. Studies with biomarkers may prove useful in anticipating reactivation in coinfecting individuals.²⁸ Thus, severe infections and mortality would likely decrease with early

intervention, and the high cost and the discomfort of unnecessary treatments would be avoided.

The prevalence of coinfection was high. In the group of coinfecting, pallor and low schooling were more frequent than in the mono-infected group. As coinfecting individuals may reactivate a latent leishmanial infection, we suggest that testing for VL in people living with HIV should be considered as part of the initial investigation, especially for individuals from endemic areas. The care team should be attentive to the appearance of symptoms during the follow-up of coinfection for early antileishmaniasis therapy.

Received October 8, 2017. Accepted for publication August 14, 2018.

Published online October 15, 2018.

Acknowledgments: We would like to thank Ulisses Ramos Montarroyos for statistical analysis support, and Luiz Dias de Andrade and Walter Lins Barbosa Junior for reviewing this manuscript.

Financial support: Support was provided by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (APQ-1284-4.01/08, 0052-4.00/13, and 1712-4.01/15). The authors received partial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (Scholarship 308590/2013-9 to D. B. M. F., 104573/2014-7 to M. S. S.).

Authors' addresses: Diego Lins Guedes, Curso de Medicina, Núcleo de Ciências da Vida, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brazil, E-mail: diego.linsguedes@ufpe.br. Zulma Medeiros, Elis Dionísio da Silva, Mariana Santana da Silva, Maria Almerice Lopes da Silva, and Paulo Sérgio Ramos de Araújo, Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil, E-mails: medeiros@cpqam.fiocruz.br, dionisio.elis@gmail.com, marianasantanape@gmail.com, almerice@cpqam.fiocruz.br, and psergiora@gmail.com. Audrey Violeta Martins de Vasconcelos, Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Recife, Brazil, E-mail: audrey_marcelino@hotmail.com. Demócrito de Barros Miranda-Filho, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil, E-mail: demofilho@gmail.com.

REFERENCES

- Desjeux P, Alvar J, 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (Suppl 1): 3–15.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet J-P, Gradoni L, Ter Horst R, Lopez-Velez R, Moreno J, 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334–359.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671.
- Faucher B, Piarroux R, 2011. Actualités sur les leishmanioses viscérales. *Rev Med Interne* 32: 544–551.
- Okwor I, Uzonna JE, 2013. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol Res* 56: 163–171.
- Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Eliás MJ, Moreno A, Bernardino JI, Vallejo A, 2015. 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 Med* 16: 240–248.
- Molina R, Gradoni L, Alvar J, 2003. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (Suppl 1): 29–45.
- Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, Lachaud L, 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.
- Lima IP, Müller MC, Holanda TA, Harhay M, Costa CHN, Costa DL, 2013. Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 156–160.

10. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S, 2011. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 1–6.
11. Cota GF, de Sousa MR, de Freitas Nogueira BM, Gomes LI, Oliveira E, Assis TSM, de Mendonça ALP, Pinto BF, Saliba JW, Rabello A, 2013. 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* 89: 570–577.
12. El Harith A, Kolk AHJ, Leewenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T, Kager P, 1988. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 26: 1321–1325.
13. Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDF, Presber W, Jaffe CL, 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 349–358.
14. Carranza-Tamayo CO, de Assis TSM, Neri ATB, Cupillo E, Rabello A, Romero GAS, 2009. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasilia, Federal District, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 743–748.
15. Orsini M, Canela JR, Disch J, Maciel F, Greco D, Toledo A, Rabello A, 2012. 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* 106: 283–288.
16. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R, 2014. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3021.
17. Diro E, Lynen L, Ritmeijer K, Boelaert M, Hailu A, van Griensven J, 2014. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in east Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2869.
18. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A, 2012. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1665.
19. Pasquau F et al.; HIV Mediterranean Co-operative Group, 2005. 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* 24: 411–418.
20. Cota GF, de Sousa MR, de Mendonça ALP, Patrocínio A, Assunção LS, de Faria SR, Rabello A, 2014. *Leishmania*-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2816.
21. Nascimento ET, Moura MLN, Queiroz JW, Barroso AW, Araujo AF, Rego EF, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM, 2011. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 298–300.
22. Rosenthal E, Marty P, del Giudice P, Pradier C, Ceppi C, Gastaut JA, Le Fichoux Y, Cassuto JP, 2000. HIV and *Leishmania* coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of *Leishmania*. *Clin Infect Dis* 31: 1093–1095.
23. Martins-Melo FR, Lima M da S, Alencar CH, Ramos AN, Heukelbach J, 2014. Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000–2011. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 108: 338–347.
24. Gil-Prieto R, Walter S, Alvar J, de Miguel AG, 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997–2008). *Am J Trop Med Hyg* 85: 820–825.
25. De Albuquerque LCP, Mendonça IR, Cardoso PN, Baldaçara LR, Borges MRMM, Borges J da C, Pranchevicius MC da S, 2014. HIV/AIDS-related visceral leishmaniasis: a clinical and epidemiological description of visceral leishmaniasis in northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 47: 38–46.
26. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT, 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115.
27. Dias JCP et al., 2016. Il Consenso Brasileiro em doença de chagas, 2015. *Epidemiol Serv Saude* 25: 1–10.
28. Ibarra-Meneses AV, Ghosh P, Hossain F, Chowdhury R, Mondal D, Alvar J, Moreno J, Carrillo E, 2017. IFN- γ , IL-2, IP-10, and MIG as biomarkers of exposure to *Leishmania* spp., and of cure in human visceral leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 200.

5.2 Artigo 2 em redação – Flow cytometry for the detection of antibodies anti - *Leishmania infantum* in HIV-infected patients

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença protozoária grave que surgiu como uma importante condição oportunista em pacientes infectados pelo HIV. Entre os principais desafios apresentados pela co-infecção LV-HIV está a correta identificação dos casos. O diagnóstico sorológico utilizado extensivamente na LV apresenta desempenho reduzido nos casos de coinfeção devido à baixa resposta humoral dos pacientes. No entanto, um teste positivo em títulos ainda baixos tem valor diagnóstico quando combinado com suspeita clínica. O objetivo deste estudo foi aplicar e avaliar o desempenho de uma alternativa diagnóstica por citometria de fluxo para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em pacientes infectados pelo HIV. Para isso, utilizamos uma cepa de referência de *L.infantum*, soros de 18 pacientes com coinfeção LV/ HIV caracterizados pelas técnicas padrões ouro, e 36 soros obtidos de indivíduos saudáveis e pacientes infectados pelo HIV. Os resultados da citometria de fluxo foram expressos como níveis de reatividade de IgG, com base em na Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos (PPFP). A análise da curva ROC da titulação sérica na citometria de fluxo indicou um PPFP de 1,26% como ponto de corte para segregar os resultados positivos e negativos. A diluição de 1: 2048, a citometria de fluxo apresentou bom desempenho com sensibilidade de 88,89% e especificidade de 83,33%. Os índices de concordância kappa observados sugeriram desempenho similar entre os testes DAT e ELISA. Juntos, esses achados sugerem o potencial da citometria de fluxo como alternativa sorológica para caracterizar a resposta humoral à *Leishmania infantum* em pacientes infectados pelo HIV e o protocolo aqui descrito pode ser útil para casos inconclusivos e onde há dificuldades na realização do exame parasitológico.

Flow cytometry for the detection of antibodies anti -*Leishmania infantum* in HIV-infected patients

Authors: Elis D. Silva^{a*}, Beatriz C. Oliveira^a, Wagner J. T. Santos^a, Osvaldo P. de Melo Neto^a, Carlos H.N. Costa^b, Mauro R. B. Silva^c, Zulma M. Medeiros^{a, d1}, Valéria R. A. Pereira^{a1}

^aInstituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Recife, Pernambuco, Brazil.

^bInstituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), Teresina, Piauí, Brazil

^cUniversidade Estadual do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^dUniversidade de Pernambuco - Faculdade de Ciências Médicas, Recife, PE, Brasil.

¹Co-senior authors.

Abbreviations:

PPFP = Percentage of positive fluorescent parasites

IFAT = Immunofluorescent antibody test

DAT = Direct agglutination test

PPV = Positive predictive value

NPV = Negative predictive value

AC = Accuracy

VL = Visceral Leishmaniasis

Abstract

Visceral Leishmaniasis (VL) is a severe protozoan disease that has emerged as an important opportunistic condition in HIV infected patients. Among the main challenges presented by VL-HIV coinfection is the correct identification of cases. Since the serological diagnostic tests used extensively in the diagnostic VL have a reduced performance in cases of coinfection due to low humoral response. However, a positive test in still low titers has diagnostic value when combined with the clinical case definition. Thus, the aims of this study were the application and performance evaluation of a diagnostic alternative by flow cytometry for the detection of antibodies anti-*Leishmania infantum* in HIV-infected patients. A reference strain of *L.infantum* and a bank of 18 sera from patients with VL/HIV coinfection were characterized using techniques considered gold standards, and 36 sera obtained from healthy individuals and HIV-infected patients were also assessed. The results from flow cytometry were expressed as levels of IgG reactivity, based on a percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). A ROC curve analysis of the serum titration on flow cytometry has indicated a PPFP of 1.26% as the cutoff point to segregate positive and negative results. In the present study at the dilution 1:2048, flow cytometry presented good performance with sensitivity of 88.89% and 83.33% specificity. The substantial kappa agreement indexes observed suggested similar performance between DAT and ELISA tests. Together, these findings suggest the potential of flow cytometry as a serological alternative to characterize the humoral response to *Leishmania* in HIV-infected patients and the protocol described here may be useful for inconclusive cases and where there are difficulties in performing the parasitological test.

Keywords: Visceral leishmaniasis, HIV infection, AIDS, diagnosis, flow cytometry

Introduction

Visceral Leishmaniasis (VL) is a chronic disease caused by the protozoan parasites *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. *Leishmania* are transmitted by the bite of phlebotomine sand flies, and replicate within macrophages of their mammalian hosts. It is most commonly seen in India, Bangladesh, Brazil, Sudan, and around the Mediterranean (WHO, 2016). VL is a potentially fatal disease that has emerged as an important opportunistic condition in HIV infected patients, resulting in several cases of VL–HIV coinfection. This framework generates impact in immunopathogenesis, clinical manifestation, therapeutic response and diagnosis (WHO, 2010).

The microscopic observation or isolation of *Leishmania* is considered the gold standard for laboratory confirmation of infection. This technique has high specificity, though their use in clinical laboratories has some limitations, mainly due to the low sensitivity of these procedures, which are also invasive, time-consuming and require experienced personnel (Sakkas et al., 2016). In addition, due to the immunodepression status of HIV-infected individuals, the parasite may not be found in the bone marrow, but rather in less common presentation sites such as the stomach, colon and lungs (LIMA et al., 2013; SRIVASTAVA et al. 2011). Serological approaches to detect specific antibodies against *Leishmania* constitute a valuable alternative for early, rapid, and user-friendly diagnostic tests, however, in the VL-HIV/AIDS coinfection, conventional serological investigation (indirect immunofluorescence test and the rapid test rK39) are considered not an accurate diagnostic method, due to low antibody production in these individuals (Cota et al., 2012; Lindoso et al., 2018; Silva et al., 2017). According to the Brazilian guidelines, the case definition is obtained based on parasitology (bone marrow aspiration) or serology and molecular assay, in addition to the observation of the clinical presentation (Brasil, 2015).

Therefore, the developments of an effective diagnosis represents a relevant challenge in the VL-HIV/AIDS coinfecting and are essential to establish a precise diagnosis, reducing the lethality and mortality of these cases. Due to the limitations of these techniques, alternative approaches have been employed (Abass et al., 2013; Bhattacharyya et al., 2014). One of them is the flow cytometry, a technology that simultaneously measures and analyzes various physical characteristics of individual particles, as the fluid flow passes through a light beam, thereby allowing the detection of anti-*Leishmania* antibodies. This technique possesses several advantages for immunoassays such as high throughput capacity, possibility of analytic quantification, reduced sample volume, high reproducibility and sensitivity and wide range

applications (Teixeira-Carvalho et al., 2015). Thus, the aims of this study were the application and performance evaluation of a diagnostic alternative by flow cytometry for the detection of antibodies anti-*Leishmania infantum* in HIV-infected patients.

2. Materials and Methods

2.1 Serum samples and study population

The population was defined by convenience of the sample size of northeastern Brazil (Pernambuco and Piauí) and consisted of VL-HIV/AIDS coinfection group (n=18) composed of true positive patients defined by the positive parasitological test for VL and positive HIV serology according to Brazilian guidelines (Brasil, 2015). The patient characteristics are described in Table 1. Thirty-six true negatives controls were studied. These included: Healthy individuals group (n=18) with no obvious signs and symptoms of any disease, and living in the non-endemic regions for VL and HIV mono-infected group (n=18) with positive HIV serology and negative serological (ELISA using crude antigen, DAT and/or IFAT) for VL.

Table 1. Epidemiological, clinical and laboratorial findings of study population

	VL-HIV/AIDS coinfection patients	HIV mono- infected patients	Healthy controls
Number	18	18	18
Gender			
Male	13/18 (72.2) ^a	12/18 (66.7)	10/18 (55.6)
Female	5/18 (27.8)	6/18 (33.3)	8/18 (44.4)
Age (years) [mean (SD)]	34.2 (9.1)	43.4 (12.4)	29.7 (7.7)
Clinical features			
Anemia	10/10 (100)	8/18 (44.4)	N/A ^b
Lymphopenia	12/13 (92.3)	7/18 (38.9)	N/A
Leucopenia	10/10 (100)	3/18 (16.7)	N/A
Irregular fever	16/18 (88.89)	13/18(72.2)	N/A
Hepatomegaly	6/18 (33.33)	0/18(0)	N/A
Splenomegaly	14/18 (77.78)	0/18(0)	N/A
Weight loss > 5 kg	14/18 (77.78)	13/18(72.2)	N/A
On HAART	10/10 (100)	16/18 (88.89)	N/A
Plasma viral load			
< 50 copies/mL	2/8 (25)	6/18(33.3)	N/A
50–500.000 copies/mL	6/8 (75)	12/18 (66.7)	N/A
CD4+ T-lymphocytes count			
≥ 200 cells/mm³	2/8 (25)	11/17(64.7)	N/A
< 200 cells/mm³	6/8 (75)	6/17 (35.3)	N/A

^a Values in parentheses represent frequency (%)

^b N/A = not applicable

All serum samples were collected in vacutainer tubes (BD Biosciences), processed by centrifugation (1000 g, 10 min, room temperature), inactivated by heating for 30 minutes at 56 °C and centrifuged at 4 °C, 1000 g for five minutes. After centrifugation, the supernatant was aliquoted and kept at –20 °C until use.

This study was approved by the Ethics Committee from the Federal University of Piauí (0116/2005) and from IAM-FIOCRUZ (CAEE 51603115.7.0000.5190).

2.2 Parasite preparation

The promastigote forms of *L. infantum* strain MHOM/BR/70/BH46 were cultured at 26 °C in vitro in Schneider's medium associated with Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium. Parasites were subjected to expansion and centrifuged at low speed (100 g, 10 min, room temperature). Then, the parasites were recovered from the supernatant after 10 minutes at room temperature.

The pellet for the flow cytometry assay was obtained by centrifugation (400 g for 10min) and washed three times with PBS containing 10% fetal bovine serum, pH 7.2 (871 g, 10min, 4 °C). The pellet formed was homogenized and re-suspended for fixation in 1% paraformaldehyde and incubated overnight. Then, they were washed with PBS + 10% FBS, pH 7.2 (871 g, 10min, 4° C). The parasite suspension was adjusted to 5×10^6 promastigotes/mL and used for the flow cytometry assay.

2.3 Direct Parasite Identification

Bone marrow (1 mL) aspirates for parasitological analysis were obtained in order to detect *Leishmania* parasites, preparing the smears by slide apposition. The slides were stained with a panoptic stain (Ranylab, Barbacena, Brazil) and evaluated under a light microscope (100×). At least three bone marrow smears were evaluated for each patient (Da Silva et al., 2005).

2.4 rK39 rapid test (IT LEISH)

The IT LEISH rapid test protocol was performed according to the manufacturer's instructions (Bio Rad Laboratories; Marnes-la-Coquette, France).

2.5 Direct agglutination test (DAT)

DAT was carried out according to the manufacturer's instructions (Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL). Sera with titers from 1:6400 were considered positive (El Harith et al., 1988).

2.6 Immunofluorescent Antibody Test (IFAT)

The IFAT test was performed with an in house protocol developed by Immunology of infectious and parasitic diseases research group at Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, PE, using 10 µl of the antigenic suspension of *L. infantum* promastigotes applied to the region delimited on the IFAT slides (PERFECTLAB, São Paulo, Brazil) and leaving it to rest for two hours at 37 °C. Subsequently, the slides were coated with 10 µl of the patients' serum samples in titers ranging from 1:20 to 1:320 in PBS, pH 7.2. Two control sera (positive and negative) were incubated in a humid chamber for 30 minutes at 37 °C. After incubation, the excess of serum was removed from the slides by washing them three times through immersion in PBS, pH 7.2, in intervals of 10 minutes. Anti-human IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) prepared in Evans blue (40 mg) in PBS buffer solution (previously diluted at 1:10 ratio in the same buffer) was added to the slides in a 1:50 dilution, incubating them under the same conditions as mentioned before. After the reaction, the slides were washed three times for 10 minutes 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 1:40 dilution.

2.7 ELISA

The ELISA test was performed as described by Oliveira et al. (2011). Briefly, 96-well plates (Greiner Bio One, Germany) were sensitized with 600 ng per well of crude *L. infantum* antigen and kept at 4 °C overnight. Plates were aspirated, blocked for one hour at 37 °C with 2% non-fat dried milk in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and washed four times with PBS-T. The sera were diluted at 1:900 in PBS-T containing 10% of non-fat dried milk and added to the wells in triplicates, and incubated for one hour at 37 °C. After three washes with PBS-T, the peroxidase-conjugated anti-IgG (Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, MA) diluted at 1:2000 was added and the plates incubated for one more hour at 37 °C. Plates were then washed three times and incubated 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 control sera were present on each plate in order to

standardize readings and variations. The cutoff point between non-reagent and reagent readings was calculated as the mean of the negative controls plus two standard deviations.

2.8 Flow Cytometry

The flow cytometry assay to detect antibodies against promastigote forms of *L. infantum* was performed according to Rocha et al. (2002). The parasite suspension (2.5×10^5 /well) was incubated in 96-well, U-bottom plates at 37 °C for 30 minutes in the presence of different serum dilutions (1:64 to 1:32.768). After incubation, the parasites were washed twice with 150µl of PBS-10% FBS ($1000 \times g$ for 10 min at 4 °C). The parasites were then incubated at 37 °C for 30 minutes, protected from light 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 the second wash, FITC labeled parasites were fixed with 200µL of fixing solution and kept from light for 30 minutes at 4 °C until read on the flow cytometer (FACScalibur, Becton Dickinson) using the software "Cell Quest Pro". The labeled parasites were submitted to the cytometer's acquisition with 20.000 events per sample. Promastigotes were identified based on their specific frontal (FSC) and lateral (SSC) light scattering properties. After FSC and SSC gain adjustments, the parasites assumed a characteristic distribution of these parameters. The relative FITC fluorescence intensity of each event was analyzed with a single histogram representation. A marker was set on the histogram representation of FITC-conjugated internal control and used in all data analyzes reported here to determine for each sample the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) as previously described by Rocha et al. (2002). After that, we selected the serum dilution and the PPFP cutoff point to gather the IgG reactivity data with the best performance indexes and plotted the values obtained as the mean of the individuals with VL 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 controls (a pool of negative sera samples) and positive controls (a pool of positive sera samples) were included to validate the assay.

2.10 Statistics

The sensitivity of the test was determined as the fraction of the VL-HIV/AIDS coinfecting confirmed sera that were test positive, and specificity was calculated as the fraction

negative sera (Healthy controls and HIV mono-infected groups) that were identified to be truly test negative. The positive and negative predictive values of the tests were calculated. These statistical analyzes were calculated using 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 receiver operating characteristic curve (ROC curve) was constructed by plotting sensitivity on the y-axis and the complement of specificity (100 – specificity) on the x-axis. The curve was used to select the cutoff value to discriminate negative from low positive and high positive PFP results. The tests' global accuracy was also evaluated, taking the area under the ROC curve (AUC) according to Swets (1988). 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 substantial agreement beyond chance, and a kappa-value of >0.80 represents almost perfect agreement beyond chance (Landis and Koch, 1977). The graphs were generated by the GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1 Establishing of flow cytometry serology parameters to be applied for the diagnosis of VL/HIV coinfection cases

In order to establish the flow cytometry serology to differentiate positive from negative samples, it was initially necessary to select the sera dilution to segregate the IgG reactivity data. Fig.1 shows the mean values of PFP of VL-HIV coinfection group and control group versus a dilution curve ranging from 1:64 to 1:32.768. The difference between the reactivity of positive and negatives sample (Δ) showed that the best performance in segregating these groups was at the dilution of 1:2048. Thus, we used the PFP values of this dilution for the other evaluations of the technique.

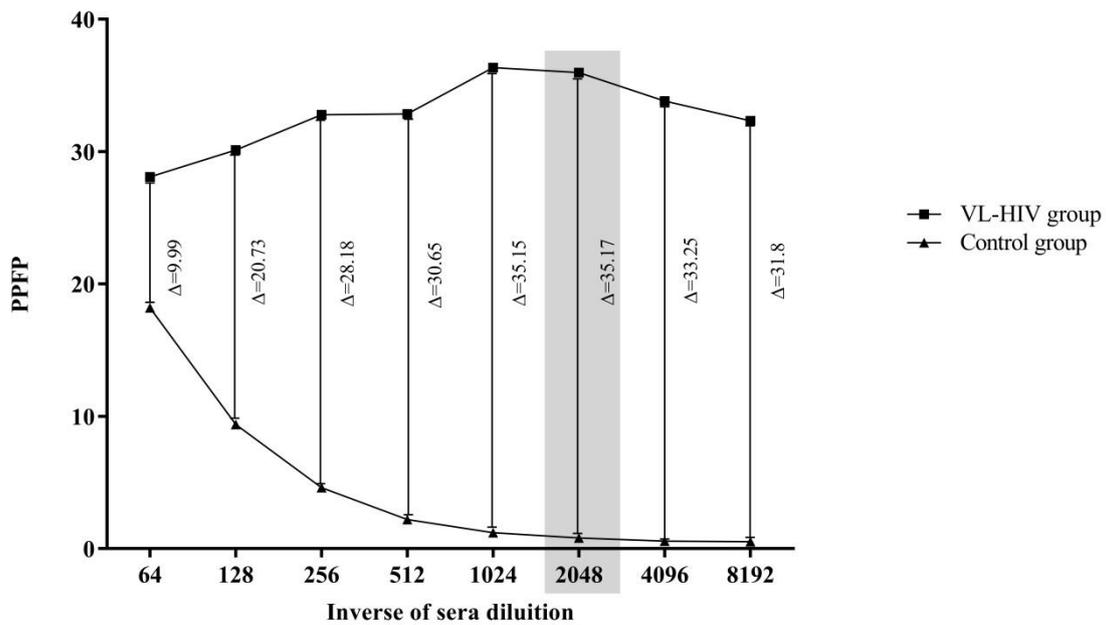


Fig 1. IgG antibody titration curve detected by flow cytometry of Anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes stratified by groups. VL-HIV/AIDS group (\blacktriangle n = 18 and control group (\blacksquare n=36. The gray rectangle corresponds to the titration of 1:2048 which was the region of greatest separation among groups. PFP = Percentage of Positive Fluorescent Parasites. Δ = Difference between the reactivity of groups.

3.2 Establishing of ideal cutoff to be applied for the diagnosis of VL-HIV/AIDS coinfection cases

Is necessary to select the PFP cutoff point able to segregate the IgG reactivity data with better performance indexes. Data analysis of ROC curve demonstrated that PFP of 1.26 was the most appropriated cutoff to distinguish negative (PFP $\leq 1.26\%$) from positive (PFP $> 1.26\%$) results (Fig 2). The values for the area under the curve were 0.93 (95%, with a confidence interval [CI] between 0.85 to 1.0). Using this approach the flow cytometry displayed 88.89% (CI 95%= 65–99%) sensitivity and 83% specificity (CI 95%= 67–94%) (Fig. 3). The mean PFP values for VL-HIV/AIDS coinfection group was 36% (CI 95%= 22–50%); 1.4% (CI 95%= 0.9–1.8%) for healthy control group and 0.2% (CI 95%= 0.1–0.35%) for mono-infected HIV group

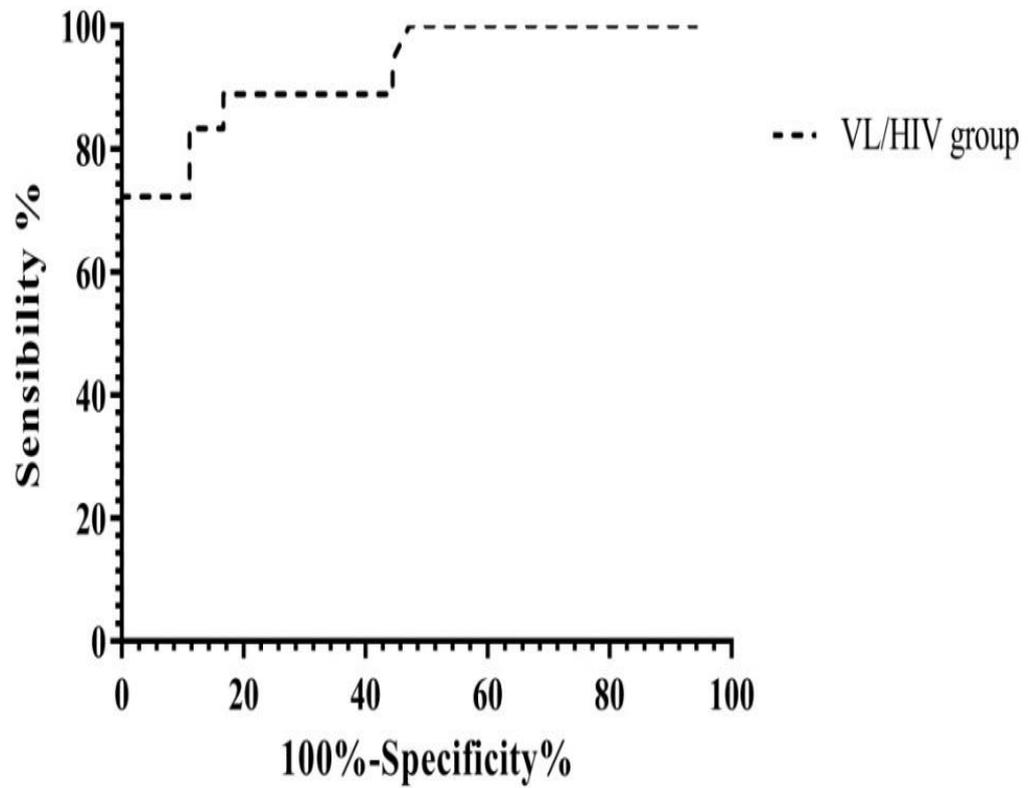


Fig 2. ROC curve by performance indexes, sensitivity and specificity of flow cytometry. The ROC curve analysis was applied to establish the best cutoff point to discriminate PPFV values from positive and negative samples and indicate the area under the curve (AUC = global accuracy). ROC curve of samples at dilution 1:2048 indicating a cutoff point of 1.26%.

($\kappa > 0.6$; Agreement $> 80\%$) and a moderate agreement between rK39 rapid test and IFAT ($\kappa < 0.6$; Agreement $< 80\%$) by the interpretation criteria proposed by Landis and Koch (1977).

Table 2. Values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of the serological tests used for the diagnosis of VL-HIV/AIDS coinfection.

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

^a CI = Confidence Interval.

^b PPV = Predictive Value Positive

^c NPV = Predictive Value Negative

Table 3. Laboratorial findings of 8 cases of group VL-HIV/AIDS coinfection.

Patient n°	Flow Cytometry (%PPFP)	DAT (Titre)	rK39 rapid test	ELISA (Absorbance-490nm)	IFAT (Titre)	T CD4+ (cells/mm ³)	Viral load (copies/mL)
1	Positive (1.37)	Positive (1:51200)	Positive	Positive (0.64)	Negative	399	3.722
2	Positive (23.47)	Positive (1:24600)	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 (1:102400)	Positive	Positive (3.5)	Positive (1:160)	2	<50
5	Positive (21.56)	Positive (1:51200)	Positive	Positive (0.85)	Positive (1:160)	<50	54
6	Positive (59.76)	Positive (1:51200)	Positive	Positive (0.65)	Positive (1:40)	157	45795
7	Positive (4.89)	Positive (1:6400)	Negative	Negative (0.04)	Negative	345	39529
8	Positive (88.32)	Positive (1:51200)	Positive	Positive (3.1)	Positive (1:320)	92	1027

Table 4. Comparison between flow cytometry and the serological tests used for the diagnosis of VL-HIV/AIDS coinfection.

	DAT	rK39 rapid test	ELISA	IFAT
<i>Agreement % (95%CI)^a</i>	83 (71-91)	80 (67-88)	83 (71-91)	80 (67-88)
<i>Kappa index (95%CI)</i>	0.6 (0.4-0.9)	0.5 (0.4-0.6)	0.6 (0.4-0.9)	0.5 (0.3-0.8)

^a CI = Confidence Interval.

4. Discussion

Our results show, for the first time, the applicability of flow cytometry to the investigation of visceral leishmaniasis in individuals living with HIV. Previous reports found a good performance of this technique in individuals with visceral leishmaniasis (Garcia et al., 2009; Lemos et al., 2007; Silva et al., 2019), American tegumentary leishmaniasis (Oliveira et al., 2013; Pereira et al., 2012) and Chagas disease (Matos et al., 2011). We found good but not perfect sensitivity. However, in relation to the conventional tests used for comparison, the sensitivity of flow cytometry was higher.

rk39 rapid test and IFAT are the widely used serological tests for the diagnosis of VL, but through latent class model analyses, presented the lowest sensitivity (less than 60%) in VL-HIV coinfecting individuals (Cota et al., 2012). Therefore, particularly in this group of patients, the diagnosis is a great challenge. Our results showed a higher sensitivity of these tests, but with inferior performance in relation to flow cytometry and DAT. Among the conventional serological diagnostic tests for VL-HIV/AIDS coinfecting individuals, the DAT stood out for having a high sensitivity and accuracy (Cota et al., 2012; Guedes et al., 2018; Lindoso et al., 2018), a performance corroborated by our study. Thus, like DAT, the flow cytometry uses a serial dilution which allows the identification of antibodies at low serum concentrations even in immunosuppressive conditions ($CD4^+$ T cell < 200 cells/mm³), allied to this the cytometer presents photo multiplier detectors coupled with the equipment give technical support for managing assay and the quantitative assessment removes the operator subjectivity that does exist with DAT. In this context, flow cytometry present the potential to be a serological alternative for the screening of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients, since a positive test at even low titers has diagnostic value when combined with the clinical case definition.

Despite the good sensitivity of our flow cytometry data, further investigations are encouraged in order to reduce the high occurrence of false positive results of healthy controls from non-endemic regions, besides the investigation of other VL co-endemic diseases. The high cross-reactivity with other trypanosomatidae infections still represents an important issue regarding the applicability of flow cytometry (Pissinate et al., 2008; Garcia et al., 2009). Therefore, In this field, one of the challenges has been the search for a more practical and safe antigen preparation that provides tests with greater sensitivity and specificity, with low cross-reactivity. Advances such as the use of fixed parasites and the use of solutions that preserve the morphology as formaldehyde are strategies already developed to facilitate the use of these

parasites and allow the elaboration of a diagnostic kit (Vitelli-Avelar et al., 2007; Ker et al., 2013) besides the development of algorithms that allow the elimination of cross-reactivity for the differential diagnosis of trypanosomatids (Teixeira-Carvalho et al., 2015). However, the use of molecularly defined antigens seems to be one of the future possibilities for this current limitation (Sousa et al., 2013).

With the advent of monoclonal antibodies and flow cytometry, there was elucidation of the role of CD4 + T cells in HIV infection and currently the CD4 dosage is one of the most widespread tests performed in reference diagnostic centers for the prognosis and evaluation of anti-retrovirals in HIV-infected people (Kagan et al., 2015). In this context, the use of flow cytometry for the evaluation of anti-*Leishmania* antibodies would be a further possibility to increase the evaluation of these individuals in endemic VL regions.

In conclusion, despite a preliminary evaluation with a reduced number of individuals, it might be emphasized flow cytometry could also help to characterize the humoral response to *Leishmania* in HIV-infected patients and the protocol described here may be useful for of inconclusive cases and with difficulties in performing the parasitological test.

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by a Brazilian grant from MCTI/CNPq/MS-SCTIE - DECIT N° 40/2012 - Pesquisa em Doenças Negligenciadas and FACEPE - PROEP (APQ-1712-4.01/15). We would like to thank Camila Queiroz from Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE for the *L. infantum* strain.

References

Abass, E., Bollig, N., Reinhard, K., Camara, B., Mansour, D., Visekruna, A., Lohoff, Abass, E., Bollig, N., Reinhard, K., Camara, B., Mansour, D., Visekruna, A., Lohoff, M., Steinhoff, U., 2013. rKLO8, a Novel *Leishmania donovani* - Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan. PLoS Negl. Trop. Dis. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002322>.

Bhattacharyya, T., Ayandeh, A., Falconar, A.K., Sundar, S., El-Safi, S., Gripenberg, M.A.,

Bowes, D.E., Thunissen, C., Singh, O.P., Kumar, R., Ahmed, O., Eisa, O., Saad, A., Silva Pereira, S., Boelaert, M., Mertens, P., Miles, M.A., 2014. IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in Visceral Leishmaniasis, and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003273>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica (2015). Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília. 109 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Available:http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_diagnostico_leishmania_hiv.pdf. Accessed: 06 february 2019.

Cota, G.F., de Sousa, M.R., Demarqui, F.N., Rabello, A., 2012. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1665. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001665>.

Da Silva, M.R.B., Stewart, J.M., Costa, C.H.N., 2005. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 811–814. <https://doi.org/10.1186/1528-7566-72-811>.

El Harith, A., Kolk, A.H.J., Leewenburg, J., Muigai, R., Huigen, E., Jelsma, T., Kager, P., 1988. Improvement of a Direct Agglutination Test for Field Studies of Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1321–1325.

Garcia, L.M., Coelho-Dos-Reis, J.G.A., Peruhype-Magalhães, V., Teixeira-Carvalho, A., Rocha, R.D.R., Araújo, M.S.S., Gomes, I.T., Carvalho, S.F.G., Dietze, R., Lemos, E.M., Andrade, M.C., Martins-Filho, O.A., 2009. 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* 350, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.07.004>.

Guedes, D.L., Medeiros, Z., Dionisio, E., Vasconcelos, A.V.M., Silva, M.S., Silva, M.A.L., Araújo, P.S.R., Miranda-Filho, D.D.B., 2018. Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV-Infected Patients in Pernambuco, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99, 1541–1546.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0787>.

Kagan, J.M., Sanchez, A.M., Landay, A., Denny, T.N., Diseases, I., Services, H., 2015. A Brief Chronicle of CD4 as a Biomarker for HIV/AIDS: A Tribute to the Memory of John L. Fahey Jonathan. HHS Public Access 6, 55–64. <https://doi.org/10.1615/ForumImmunDisTher.2016014169.A>

Ker, H.G., Coura-Vital, W., Aguiar-Soares, R.D.D.O., Roatt, B.M., das Dores Moreira, N., Carneiro, C.M., Machado, E.M.D.M., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Giunchetti, R.C., Araújo, M.S.S., Coelho, E.A.F., da Silveira-Lemos, D., Reis, A.B., 2013. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 1792–8. <https://doi.org/10.1128/CVI.00575-13>.

Landis JR & Koch J, 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.

Lemos, E.M., Gomes, I.T., Carvalho, S.F.G., Rocha, R.D.R., Pissinate, J.F., Martins-Filho, O.A., Dietze, R., 2007. Detection of anti-leishmania (*Leishmania*) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 569–76. <https://doi.org/10.1128/CVI.00354-06>.

Lindoso, J.A.L., Valente, C.H., Cunha, M.A., Queiroz, I.T., 2018. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection : current perspectives. *HIV/AIDS - Res. Palliat. Care* 10, 193–201.

Matos, C.S., Coelho-dos-Reis, J.G.A., Rassi, A., Luquetti, A.O., Dias, J.C.P., Eloi-Santos, S.M., Gomes, I.T., Vitelli-Avelar, D.M., Wendling, A.P.B., Rocha, R.D.R., Teixeira-Carvalho, A., Peruhype-Magalhães, V., Andrade, M.C., Martins-Filho, O.A., 2011. 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* 369, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.03.007>

Oliveira, G.G.S., Magalhães, F.B., Teixeira, M.C.A., Pereira, A.M., Pinheiro, C.G.M., Santos,

L.R., Nascimento, M.B., Bedor, C.N.G., Albuquerque, A.L., Dos-Santos, W.L.C., Gomes, Y.M., Moreira, E.D., Brito, M.E.F., Pontes De Carvalho, L.C., De Melo Neto, O.P., 2011. 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.* 85, 1025–1034. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0102>.

Oliveira, A.P., de Castro, M.C.A.B., de Almeida, A.F., Souza, M. de A., de Oliveira, B.C., Reis, L.C., Goto, H., de Brito, M.E.F., Celeste, B.J., Martins-Filho, O.A., Pereira, V.R.A., 2013. 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* 387, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.11.002>

Pereira, V.R.A., Reis, L.D.C., Souza, M.D.A., de Oliveira, A.P., de Brito, M.E.F., Lage, P.S., Andrade, M.C., Rocha, R.D.R., Martins-Filho, O.A., 2012. 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.* 74, 292–8. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.025>.

Pissinate, J.F., Gomes, I.T., Peruhype-Magalhães, V., Dietze, R., Martins-Filho, O.A., Lemos, E.M., 2008. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* 336, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.04.018>.

Rocha, R., Gontijo, C.M.F., Elói-Santos, S.M., Carvalho, A.T., Corrôa-Oliveira, R., Marques, M.J., Genaro, O., Mayrink, W., Martins-Filho, O.A., 2002. 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.* 35, 551–562. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000600002>.

Sakkas, H., Gartzonika, C., Levidiotou, S., 2016. Laboratory diagnosis of human Visceral Leishmaniasis. *J Vector Borne Dis.* 53, 8–16.

Swets, J.A., 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240, 1285.

Silva, M.R.B., Brandão, N.A.A., Colovati, M., Sousa, M.M.P., Lima, L.C. De, Dorta, M.L., Ribeiro dias, F., Costa, D.L., Costa, C.H.N., Oliveira, M.A.P., 2017. Performance of two immunochromatographic tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV. *Parasitol. Res.* 117, 419–427.

Sousa, S., Cardoso, L., Reed, S., Reis, A.B., Martins-filho, O.A., Silvestre, R., Silva, A.C., 2013. Development of a Fluorescent Based Immunosensor for the Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis Combining Immunomagnetic Separation and Flow Cytometry. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002371>

Teixeira-Carvalho, A., Campos, F.M.F., Geiger, S.M., Rocha, R.D.R., de Araújo, F.F., Vitelli Avelar, D.M., Andrade, M.C., Araújo, M.S.S., Lemos, E.M., de Freitas Carneiro Proietti, A.B., Sabino, E.C., Caldas, R.G., Freitas, C.R.C., Campi-Azevedo, A.C., Elói-Santos, S.M., Martins-Filho, O.A., 2015. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. *PLoS One* 10, e0122938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122938>.

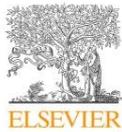
Vitelli-Avelar, D.M., Sathler-Avelar, R., Wendling, A.P.B., Rocha, R.D.R., Teixeira-Carvalho, A., Martins, N.É., Dias, J.C.P., Rassi, A., Luquetti, A.O., Elói-Santos, S.M., Martins-Filho, O.A., 2007. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J. Immunol. Methods* 318, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.009>.

WHO, 2010. Control of the Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization.

WHO. 2016 Weekly epidemiological record, no 22, 3 june 2016. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

5.3 Artigo publicado 3 - *Performance evaluation of anti-fixed Leishmania infantum promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral leishmaniasis*

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença grave, causada pelos protozoários *Leishmania infantum* e *L. donovani* e é amplamente diagnosticada usando ferramentas sorológicas. Estas, no entanto, têm limitações de desempenho que dificultam a correta identificação dos casos. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho da citometria de fluxo para detecção de anticorpos anti-IgG utilizando parasitas fixados de *L. infantum* para o diagnóstico da LV, comparando-a com outros quatro testes sorológicos. Amostras de duas regiões endêmicas para LV no Brasil foram utilizadas neste estudo e consistiu de um grupo diagnosticado como LV por exame direto (DG1) e pelos grupos com pelo menos dois ou um teste sorológico padrão (DG2 e DG3, respectivamente), bem como pacientes com doença de Chagas crônica (GC1) e controles saudáveis (GC2). Os resultados da citometria de fluxo foram expressos como níveis de reatividade de IgG, baseados na Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos (PPFP). Usando a diluição de soro de 1:4096, a análise da curva ROC do indicou um PPFP de 2% como ponto de corte para segregar resultados positivos dos negativos. No presente estudo, a citometria de fluxo teve o melhor desempenho para o DG1 (sensibilidade de 96%) enquanto rK39 (teste rápido imunocromagnográfico) e DAT (teste de aglutinação direta) também foram associados a altas sensibilidades e especificidades. A concordância substancial e os índices de kappa observados sugeriram desempenhos semelhantes entre esses dois testes e a citometria de fluxo. IFAT (teste de imunofluorescência) e ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) teve menores desempenhos e os menores valores de concordância com a citometria de fluxo. Juntos, esses achados sugerem que embora ajustes sejam necessários para reduzir a reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos, a citometria de fluxo tem o potencial de ser uma alternativa sorológica segura para o diagnóstico de LV.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

Research paper

Performance evaluation of anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral Leishmaniasis[☆]

Elis D. Silva^{a,*}, Beatriz C. Oliveira^a, Andresa P. Oliveira^a, Wagner J.T. Santos^a, George T. Diniz^a, Osvaldo P. de Melo Neto^a, Carlos H.N. Costa^b, Mauro R.B. Silva^c, Luiz D. Andrade^a, Zulma M. Medeiros^{a,d,1}, Valéria R.A. Pereira^{a,1}

^a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), Teresina, Piauí, Brazil

^c Universidade Estadual do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^d Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

ARTICLE INFO

Keywords:
Flow cytometry
IgG
Serodiagnosis
Leishmania infantum
Visceral leishmaniasis

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a severe disease, caused by the protozoans *Leishmania infantum* and *L. donovani* that is widely diagnosed using serological tools. These, however, have limitations in performance that limit their use for the correct identification of the cases. This study aimed to evaluate the performance of flow cytometry with fixed parasites for VL diagnosis, comparing it with four other serological tests. Samples from two endemic VL regions in Brazil, diagnosed by direct examination (DG1) and by at least two or one standard serological test (DG2 and DG3, respectively), as well as patients with chronic Chagas' disease (CG1) and healthy controls (CG2) were used in this study. The flow cytometry results were expressed as levels of IgG reactivity, based on the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). Using a 1:4096 serum dilution, a ROC curve analysis of the serum titration on flow cytometry has indicated a PPFP of 2% as the cutoff point to segregate positive and negative results. In the present study, flow cytometry had the best performance for DG1 (sensitivity of 96%) while rK39 (Immunochromatographic rapid test) and DAT (Direct agglutination test) were also associated with high sensitivity and specificity. The substantial agreement and kappa indexes observed suggested similar performances between these two tests and flow cytometry. IFAT (Immunofluorescent antibody test) and ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) had lower performances and the lower values of agreement with flow cytometry. Together, these findings suggest that although adjustments are needed in order to reduce cross reactivity with other trypanosomatids, flow cytometry has the potential to be a safe serological alternative for the diagnosis of VL.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected, highly lethal disease, which is endemic in 76 countries and found in 12 American countries, with Brazil having the highest endemicity and responsible for 96% of the cases reported from the Americas. In this continent, the disease is caused by the protozoa *Leishmania infantum*, part of the *Leishmania*

donovani complex (Organização Pan-Americana da Saúde., 2018).

The diagnosis of VL is based on clinical signs and symptoms of patients and is confirmed by laboratory tests (Chappuis et al., 2007). The difficulty in diagnosing patients delays the treatment and, therefore, increases the lethality of the disease (Coura-vital et al., 2014). Despite the availability of several tests, none can diagnose all cases and their effectiveness varies among different geographic regions (Boelaert et al.,

Abbreviations: IFAT, Immunofluorescent antibody test; DAT, Direct agglutination test; DG, Diagnostic group; CG, Control group; FITC, Fluorescein isothiocyanate; PPFP, Percentage of positive fluorescent parasites; CI, Confidence interval; PPV, Positive predictive value; NPV, Negative predictive value; AC, Accuracy; VL, Visceral Leishmaniasis; CV, Coefficient of Variation

^{*} Journal of Immunological Methods

^{*} Corresponding author.

E-mail address: dionisio.elis@gmail.com (E.D. Silva).

¹ Co-senior authors.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.02.009>

Received 28 June 2018; Received in revised form 8 February 2019; Accepted 22 February 2019
0022-1759/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Elis D. Silva, et al., Journal of Immunological Methods, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.02.009>

2008; Cunningham et al., 2012; Abass et al., 2015). *Leishmania* identification in bone marrow aspirates is the gold standard for VL diagnosis, but its routine execution is hampered by the need for qualified professionals and an appropriate collection environment (Maia et al., 2012). Serological tests are widely used for the diagnosis of VL, but they have limitations, such as a failure to discriminate between recent and late infections, which make it impossible to use them as cure criteria. In addition, they may cross-react with other parasites (Boelaert et al., 2004; Sakkas et al., 2016).

In this context, studies with flow cytometry have shown its capacity to diagnose VL (Andrade et al., 2007) and Chagas disease (Vitelli-Avelar et al., 2007). Flow cytometry has high sensitivity and specificity values, and could be used as a diagnosis and cure criterion of Chagas disease (Martins-Filho et al., 1995; Matos et al., 2011); cutaneous leishmaniasis (Rocha et al., 2002; Pereira et al., 2012); VL (Lemos et al., 2007; Garcia et al., 2009), and also for post-vaccine control of canine visceral leishmaniasis (Andrade et al., 2007; Ker et al., 2013).

The aims of this study were to evaluate the performance of flow cytometry and its comparison with four other serological tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Additionally we have also evaluated the performance of flow cytometry to detect cross-reactivity in patients with chronic Chagas' disease.

2. Materials and methods

2.1. Serum samples and study population

The population was defined for convenience of sample size, with the serum samples from two VL endemic areas from northeastern Brazil (Pernambuco and Piauí) divided into three diagnostic (DG) and two control groups (CG). DG1, 2 and 3 were defined using the parasite identification in bone marrow aspirate and four serological tests (DAT, ELISA, rK39 rapid test and IFAT). The groups were: DG1-51 patients with positive VL according to the presence of *Leishmania* parasites in aspirates of bone marrow; DG2-73 patients with positive VL confirmed by at least two serological tests; DG3-82 patients with positive VL confirmed by at least one serological test; CG1-15 patients with chronic Chagas' disease; CG2-18 healthy individuals with no history of VL from non-endemic areas. All serum samples were collected in vacutainer tubes (BD Biosciences), processed by centrifugation (1000 g, 10 min, room temperature), inactivated by heating for 30 min at 56 °C and centrifuged at 4 °C, 1000 g for five minutes. After centrifugation, the supernatant was aliquoted and kept at -20 °C until further use. All human serum was collected after approval of their use by the appropriate ethics committees from the Federal University of Piauí (0116/2005) and from IAM-FIOCRUZ (CAEE 51603115.7.0000.5190).

2.2. Parasite preparation

The promastigote forms of *L. infantum* strain MHOM/BR/70/BH46 were cultured at 26 °C *in vitro* in Schneider's medium associated with Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium. Parasites were subjected to expansion and centrifuged at low speed (400 g, 10 min, room temperature). For the ELISA assays, the pelleted promastigote cells were washed three times with a phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, 4 °C, followed by resuspension in lysis buffer (50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) supplemented with 1 mM of the protease inhibitors N-ethylmaleimide (NEM) and phenylmethylsulfonyl

fluoride (PMSF). Lysis was performed by cycles of freeze-thawing, followed by centrifugation at 10.000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and the protein content quantified by the Bradford assay following standard procedures. The crude soluble antigen was stored at -80 °C until further use. For the immunofluorescent antibody test (IFAT), the promastigote pellet was washed once with PBS followed by resuspension in 2% paraformaldehyde (Merck Millipore Darmstadt, Germany) and storage at 4 °C until use in the assays. For flow cytometry the same promastigote pellet was washed three times with PBS containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS), at 4 °C, followed by resuspension for fixation in 1% paraformaldehyde and incubation overnight. The fixed cells were then washed again with PBS plus 10% FBS and the final resuspension adjusted to 5×10^6 promastigotes/mL, then used for the flow cytometry assay.

2.3. Direct parasite identification

Bone marrow (1 ml) aspirates for parasitological analysis were obtained in order to detect *Leishmania* parasites, preparing the smears by slide apposition. The slides were stained with a panoptic stain (Ranlylab, Barbacena, Brazil) and evaluated under a light microscope (100×). At least three bone marrow smears were evaluated for each patient (Da Silva et al., 2005).

2.4. rK39 rapid test (IT LEISH)

The IT LEISH rapid test protocol was performed according to the manufacturer's instructions (Bio Rad Laboratories; Marnes-la-Coquette, France) using 10 µl of serum. Anti-*Leishmania*-specific antibodies are captured by a conjugate (protein A and colloidal gold) which reacts with the membrane-coated antigen (k39). After five minutes, a red line appears above indicating the presence of the IgG (control), which validates the kit. The appearance of another red line below indicates the presence of anti-rK39 IgG, representing a positive result.

2.5. Direct agglutination test (DAT)

DAT was carried out according to the manufacturer's instructions (Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL). The test was performed on 96-well V-bottom plates (Greiner Bio One, Germany) with serial serum dilutions ranging from 1:50 to 1:51200. The results were read after overnight incubation at room temperature. The DAT titer is indicated by the highest dilution in which the agglutination is visible. Sera with titers from 1:6400 were considered positive (El Harith et al., 1988).

2.6. Immunofluorescent antibody test (IFAT)

The IFAT test was performed with an in house protocol developed by Immunology of Infectious and Parasitic Diseases Research Group at Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, PE, using 10 µl of the antigenic suspension of *L. infantum* promastigotes applied to the region delimited on the IFAT slides (PERFECTLAB, São Paulo, Brazil) and leaving it to rest for two hours at 37 °C. Subsequently, the slides were coated with 10 µl of the patients' serum samples in titers ranging from 1:20 to 1:320 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 excess of serum was removed from the slides by washing them three times through immersion in PBS, pH 7.2, 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 buffer solution (previously diluted at 1:10 ratio in the same buffer) was added to the slides in a 1:50 dilution, incubating them under the same conditions as mentioned before. After the reaction, the slides were 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 1:40 dilution.

2.7. ELISA

The ELISA test was performed as described by Oliveira et al. (2011). Briefly, 96-well plates (Greiner Bio One, Germany) were sensitized with 600 ng per well of crude *L. infantum* antigen and kept at 4 °C overnight. Plates were aspirated, blocked for one hour at 37 °C with 2% non-fat dried milk in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and washed four times with PBS-T. The sera were diluted at 1:900 in PBS-T containing 10% of non-fat dried milk and added to the wells in triplicates, and incubated for one hour at 37 °C. After three washes with PBS-T, the peroxidase-conjugated anti-IgG (Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, MA) diluted at 1:2000 was added and the plates incubated for one more hour at 37 °C. Plates were then washed three times and incubated with *o*-phenylenediamine (OPD) and H₂O₂. The reaction was quenched by adding 2 M 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 control sera were present on each plate in order to standardize readings and variations. The cutoff point between non-reagent and reagent readings was calculated as the mean of the negative controls plus two standard deviations.

2.8. Flow cytometry

The flow cytometry assay to detect antibodies against promastigote forms of *L. infantum* was performed according to Rocha et al. (2002). Briefly, the parasite suspension (2.5×10^5 /well) was incubated in 96-well, U-bottom plates at 37 °C for 30 min in the presence of different serum dilutions (1:64 to 1:8192). After incubation, the parasites were washed twice with 150 µl of PBS, pH 7.2, plus 10% FBS and then incubated at 37 °C for 30 min, protected from light, with the anti-human IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluted 1:200 in PBS- 10% FBS. After another wash, FITC labeled parasites were fixed with 200 µl of 1% paraformaldehyde and kept from light for 30 min at 4 °C until submitted to reading on the FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson San Jose, CA), using the software "Cell Quest Pro". The labeled parasites were submitted to the cytometer's acquisition with 10.000 events per sample. Promastigotes were identified based on their specific frontal (FSC) and lateral (SSC) light scattering properties. After FSC and SSC gain adjustments, the parasites assumed a characteristic distribution of these parameters and their fluorescence was evaluated. For each assay, in addition to the FITC-conjugated internal control, unlabeled controls in quadruplicates as well as negative and positive controls were included to validate the assay. For these controls, instead of using a single representative negative or positive sample, we opted to prepare a pool of true negative or positive sera and used an aliquot of either as controls.

2.9. Intra- and inter-assay variations

To investigate intra-assay variation, triplicates of five different control samples were run in one assay. Inter-assay variation was evaluated comparing 27 high controls, 5 medium controls, and 5 low controls that were run in three independent assays. The Coefficient of Variation (CV) for the intra- and inter-assay variations was calculated using the formula:

$$CV = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{mean}} \times 100.$$

2.10. Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.0 and the ROC curve, by Medcalc Software version 15.8. Each test performance was assessed by the following statistical indexes: Sensitivity = [true positives ÷ (true positives + false negatives)] × 100; specificity = [true negatives ÷ (true negatives + false positives)] × 100; positive predictive value — PPV = [true positives ÷ total positives] × 100; negative predictive value — NPV = [true negatives ÷ total negatives] × 100 and accuracy = [(true positives + true negatives) ÷ (true positives + true negatives + false positives + false negatives)] (Eusebi, 2013). Student's t-test was used for determining the differences between groups. The level of agreement for each of the tests (ELISA, IFI, DAT, rK39 rapid test) with flow cytometry were determined by percent agreement and the kappa index (κ) with 95% confidence interval and p values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Optimization of flow cytometry parameters for the identification of IgG anti-promastigote forms of *L. infantum*

To establish the flow cytometry assays and to define the IgG reactivity data against *L. infantum* with the best performance indexes, promastigotes incubated with FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated anti-human IgG were evaluated on the flow cytometer in the absence of human sera (internal control) and after incubation with VL positive or negative sera, with representative results shown in Fig. 1. After promastigote identification (Fig. 1A), the relative FITC fluorescence intensity of each event was analyzed. A marker was set on the representation of the FITC-conjugated internal control (Fig. 1B) and used in all data analyzes reported here to determine for each sample the Percentage of Positive Fluorescent Parasites (PPFP). Fig. 1C and D illustrate the results for the fluorescence levels for a negative and positive control sera, respectively, with the derived PPFP values.

Next, to assess the optimal dilutions to be used with the sera in order to best define positive and negative samples, we plotted the average PPFP values obtained from five defined sera groups: DG1 - positive VL confirmed by *Leishmania* visualization; DG2 - positive VL confirmed by at least two serological tests; DG3 - positive VL confirmed by at least one serological test; CG1 - Chagas' disease; CG2 - healthy control sera. Fig. 2 then compares the average seroreactivity values for IgG for the different groups, expressed in PPFP, with different serum dilutions (titration curve ranging from 1:64 to 1:8192). From the graph shown, the serum titration of greatest difference in reactivity considering only

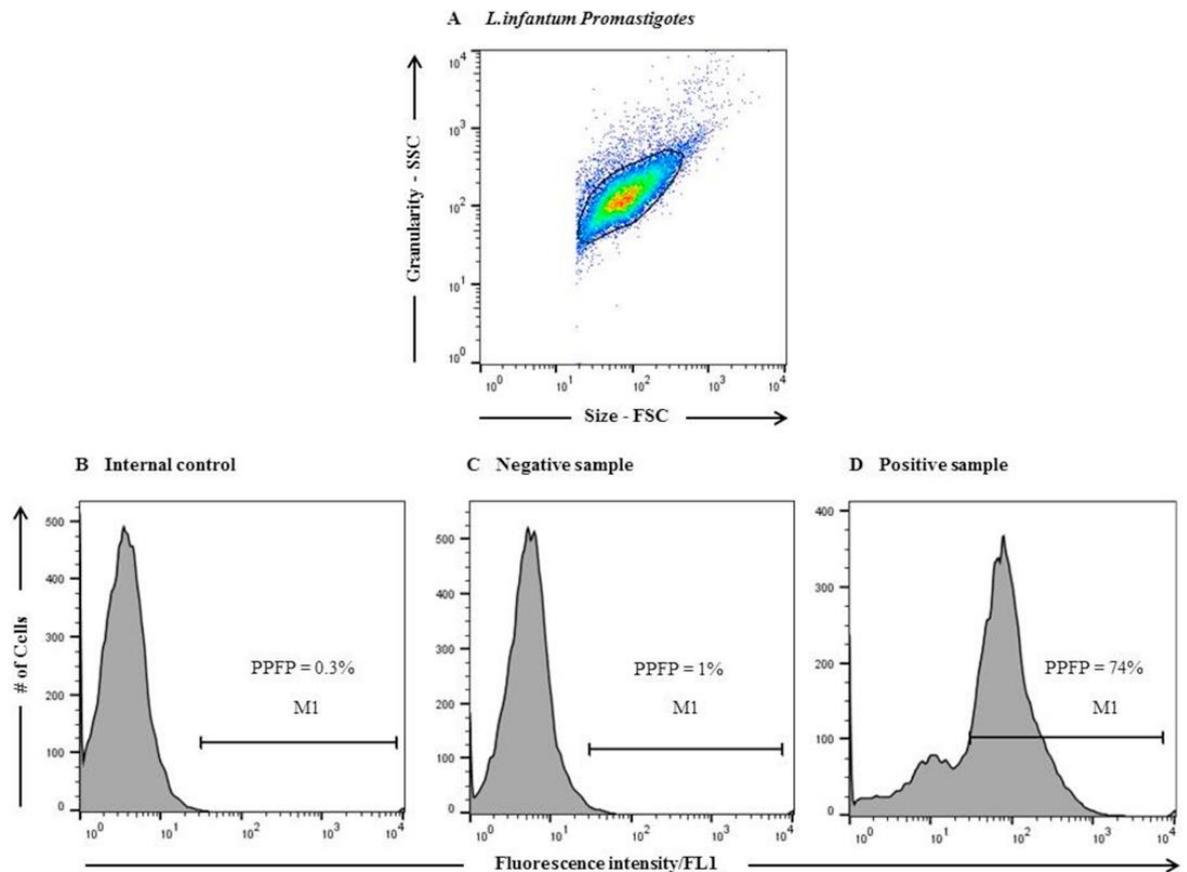


Fig. 1. Representative flow cytometry serology charts used to analyze IgG's reactivity anti-fixed *L. infantum* promastigotes in human serum samples. Promastigotes were selected on a dot plot based on their FSC (size) versus SSC (granularity). Fixed parasites were found to assume a homogeneous distribution (A). The relative FL1/FITC fluorescence intensity was quantified in the absence of human serum but in the presence of the FITC-conjugated anti-human IgG (internal control). This condition leads to the establishment of a maximum value of reactivity and determination of the marker M1 (positive region) (B). IgG's reactivity is provided in histograms for each serum samples as PPF, which represents the frequency of parasite shift towards a higher fluorescence intensity, across M1. This marker was maintained to determine the reactivity in all data analyses performed in sera from both negative (C) and positive (D) samples for VL.

the positive samples and the healthy controls was 1:512. This dilution however is associated with high levels of cross-reactivity and false positive results with the sera from Chagas' disease individuals. Thus, we selected the dilution of 1:4096, as it showed a substantial reduction of the false positive results with minor decreases in fluorescence levels for the true positive samples.

3.2. Evaluating the performance of flow cytometry for VL diagnosis

The individual analysis through flow cytometry of all sera samples belonging to the five groups defined here using the 1:4096 dilution is shown in Fig. 3. Regarding the negative references (CG1 + CG2), flow cytometry has given false positive results in five samples from individuals with Chagas disease, while nearly all of those who were confirmed through parasite visualization (DG1) were identified as positive. Intermediate values were observed for the other groups. Thus,

the seropositivity for VL was 96% for DG1, 92% for DG2, 85% for DG3. ROC curves were then drawn individually evaluating the performance by flow cytometry of the three groups of positive sera (DG1, DG2 and DG3) in relation to the two sets of VL negative samples grouped together (CG1 + CG2). The curves (Fig. 4) show that, for the selected serum dilution, the values for the area under the curve were 0.9 (95%, with a confidence interval [CI] between 0.90 and 0.99) for the DG1 group, 0.92 (95%, CI = 0.85–0.97) for DG2 and 0.9 (95%, CI = 0.83–0.95) for DG3. The ROC curves indicated that the 2% PPF value would be the appropriate cutoff point for separating the VL groups from the negative individuals.

To evaluate potential analytical errors, we also performed intra- and inter-assays to determine the coefficients of variation (CVs), parameters widely used to quantify precision of biological measures. These were based on the values of PPF to select high, medium, and low serum to use as *in house* controls. The intra-assay CVs ranged from 4% to 13%

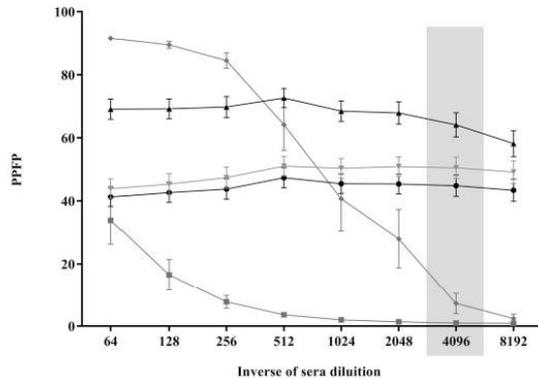


Fig. 2. IgG antibody titration curve detected by flow cytometry of Anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes stratified by groups. DG1 (\blacktriangle) (n = 51, DG2 (\blacktriangledown) n = 73, DG3 (\bullet) n = 82, CG1 (\blacklozenge) n = 15, CG2 (\blacksquare) n = 18. The gray rectangle corresponds to the titration of 1:4096 which was the region of greatest separation among the VL positive groups analyzed and both sets of controls. PFPF = Percentage of Positive Fluorescent Parasites. Bars show the 95% confidence intervals.

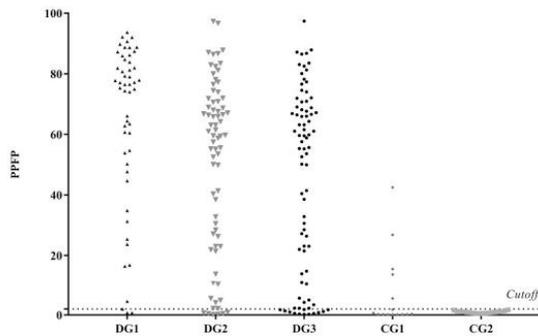


Fig. 3. Distribution of IgG reactivity of promastigote forms of *L. infantum* stratified by groups. DG1 (\blacktriangle) n = 51, DG2 (\blacktriangledown) n = 73, DG3 (\bullet) n = 82, CG1 (\blacklozenge) n = 15, CG2 (\blacksquare) n = 18. All groups are at the 1:4096 dilution and samples above the cutoff 2% PFPF (Percentage of Positive Fluorescent Parasites) are considered positive.

while inter-assay CVs ranged between 8% to 13% (Table 1), fitting within the range of variation considered acceptable, $\leq 20\%$. No statistically significant difference between the means of the controls ($P > 0.05$).

3.3. Comparison between flow cytometry and serological tests performances on the diagnosis of VL

Based on the previous results, we used the values expressed with the 1:4096 dilution for a comparison of flow cytometry with other currently used serological tests: DAT, ELISA and IFAT, all based on whole parasite cells or extracts; and the rapid test based on the recombinant rK39 antigen. Flow cytometry had the highest diagnostic performance with

the DG1 group when compared to the other serological tests, with

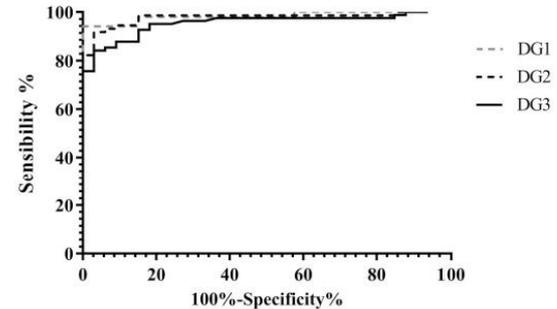


Fig. 4. ROC curve by performance indexes, sensitivity and specificity of flow cytometry for all groups analyzed. The ROC curve analysis was applied to establish the best cutoff point to discriminate PFPF values from positive and negative samples and indicate the area under the curve (AUC = global accuracy). ROC curve of samples at dilution 1:4096 indicating a cutoff point of 2%.

sensitivity of 96%, a positive predictive value of 91% and accuracy of 92% (Table 2). The rK39 rapid test was the best test in diagnosing the cases for group DG2, while for DG3 the best sensitivity was observed for DAT, with the rK39 rapid test having a better positive predictive value. The specificity was 85% for flow cytometry, 65% for ELISA and 100% for other tests.

The flow cytometry results were then compared with the other four serological tests in order to evaluate the agreement between different sets of results (Table 3). There was substantial agreement ($\kappa > 0.6$; Agreement $> 80\%$) between the DAT assay and rK39 rapid test when compared to flow cytometry for all groups, with lower values for the other tests. In fact, the IFAT had the lowest values of performance and only average agreement ($\kappa < 0.6$; Agreement $< 80\%$) for the three VL positive serum groups.

We then aimed to evaluate the clinical value of flow cytometry for the differential diagnosis between VL and Chagas' disease in comparison with the other serological tests. As stated above, the analysis of PFPF values using the 1:4096 serum dilution with a PFPF = 2% as the cutoff point demonstrated that the percentage of cross reactivity for flow cytometry was 33% (based on Fig. 3). As for the other tests, the one with the highest percentage of cross reactivity was ELISA (73%), while the other tests (DAT, rK39 and IFAT) did not show cross reactivity in our hands, at least with the serum available to us.

4. Discussion

Overall, the performance by the flow cytometry assay described here resulted in improved sensitivity for VL diagnosis when compared to the four serological tests used in the clinical procedure. This is especially relevant considering the results for the DG1 group, where flow cytometry had the best performance, similar to the rK39 rapid test, since this is the only group with all positive samples confirmed only after parasite visualization. This finding corroborates the early results by Garcia et al. (2009) and Lemos et al. (2007) indicating a better performance of flow cytometry for the diagnosis of VL, now with a substantially increase in the number of samples evaluated and including the comparison with other serological methods. Flow cytometry then

Table 1
Mean Intra-Assay and Inter-Assay Percentage Coefficients of Variation (CVs) and 95% Confidence Intervals (CIs) for high, medium and low controls across Multiple Assays of flow cytometer anti-IgG for *L. infantum*.

	Intra-assay			Inter-assay		
	No. of samples	Mean % PFPF (95% CI) ^a	Mean % CV (95% CI)	No. of samples	Mean % PFPF (95% CI)	Mean % CV (95% CI)
High Control	5	75 (66–84)	4 (0.8–6.5)	27	71 (66–75)	13 (10–16)
Medium Controls	5	20 (7–27)	5 (3–7)	5	20 (13–26)	8 (3.5–12)
Low Controls	5	0.2 (0.1–0.2)	13(3–23)	5	0.2 (0.1–0.2)	10.5 (7–14)

^a CI = Confidence Interval.

Table 2
Values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of the serological tests used for the diagnosis of VL.

	DG1	DG2	DG3
Sensitivity% (95%CI)^a			
Flow Cytometry	96 (87–99)	92 (83–96)	85 (76–91)
DAT	94 (84–98)	94.5 (87–98)	91.5 (83–96)
rK39 rapid test	92 (81.5–97)	96 (87–99)	88 (79–93)
ELISA	86 (74–93)	88 (78–93)	78 (68–86)
IFAT	63 (49–75)	73 (61–81.5)	66 (55–75)
Specificity% (95%CI)			
Flow Cytometry	85 (69–93)	85 (69–93)	85 (69–93)
DAT	100 (82–100)	100 (82–100)	100 (82–100)
rK39 rapid test	100 (82–100)	100 (82–100)	100 (82–100)
ELISA	67 (50–80)	67 (50–80)	67 (50–80)
IFAT	100 (82–100)	100 (82–100)	100 (82–100)
PPV %^b (95%CI)			
Flow Cytometry	91 (80–96)	93 (85–97)	93 (85–97)
DAT	100 (93–100)	100 (95–100)	100 (95–100)
rK39 rapid test	100 (92–100)	100 (95–100)	100 (92–100)
ELISA	80 (68–88)	85 (76–92)	85 (76–92)
IFAT	100 (89–100)	100 (93–100)	100 (93–100)
NPV%^c (95%CI)			
Flow Cytometry	93 (79–98)	82 (66.5–92)	70 (55–82)
DAT	92 (78–97)	89 (75–96)	82.5 (68–91)
rK39 rapid test	89 (75–96)	92 (78–97)	77 (62–87)
ELISA	76 (58–88)	71 (53–82)	55 (40–69)
IFAT	63.5 (50–75)	62 (49–74)	54 (42–66)
Accuracy % (95%CI)			
Flow Cytometry	92 (84–96)	90 (82–94)	85 (78–91)
DAT	96 (90–99)	96 (91–98)	94 (88–97)
rK39 rapid test	95 (88–98)	97 (92–99)	91 (85–95)
ELISA	79 (69–86)	81 (73–87)	75 (66–82)
IFAT	77 (67–85)	81 (73–87)	76 (67–83)

^a CI = Confidence Interval.

^b PPV = Predictive Value Positive.

^c NPV = Predictive Value Negative.

Table 3
Comparison between flow cytometry and the serological tests used for the diagnosis of VL for all populations analyzed.

	Group	Diagnostic Tests			
		DAT	rK39 rapid test	ELISA	IFAT
Agreement % (95%CI) ^a	DG1	88 (79–93)	87 (78–92)	82 (73–89)	69 (58–78)
	DG2	91 (83.5–95)	89 (81–93)	85 (77–90)	76 (67.5–83)
	DG3	89 (82–93)	86 (79–91)	81(73–87)	74 (65–81)
Kappa Index (95%CI)	DG1	0.7(0.5–1.0)	0.7(0.5–1.0)	0.6(0.4–0.8)	0.4(0.2–0.6)
	DG2	0.8 (0.6–1.0)	0.7 (0.5–0.9)	0.6 (0.4–0.8)	0.5 (0.3–0.7)
	DG3	0.7 (0.6–0.9)	0.7 (0.5–0.9)	0.6 (0.4–0.7)	0.5(0.3–0.6)

^a CI = Confidential interval.

emerges as an alternative test to be used for the serological diagnosis of VL. In addition, it proved to be a safe and less invasive alternative when compared to bone marrow aspiration, allowing early treatment and reduction in lethality, but adjustments are still necessary to reduce cross reactivity with trypanosomatids.

The appropriate choice of antigen is still one of the major challenges for serological tests and many of those, including ELISA, IFAT and DAT tests, use whole antigen extract from promastigote forms. It is, therefore, common to find false-positive reactions due to cross-reactions with other diseases (Caballero et al., 2007). Adjustments in antigen preparation can be made to minimize the issue of cross-reactivity and strategies were developed for live and fixed *Leishmania* promastigotes for the cytometric diagnosis of tegumentary or cutaneous leishmaniasis (Pissinate et al., 2008; Pereira et al., 2012; Oliveira et al., 2013). The use of live parasites may reduce the binding of antibodies to intracytoplasmic structures seen for the fixed parasites (which increases the likelihood of cross-reactions). However, the manipulation risks when using live parasites is a limiting factor, especially considering that the observed performance was similar in both approaches (Lemos et al., 2007; Garcia et al., 2009), leading us to use fixed parasites in the present study. Despite these adjustments in the antigen preparation, it is still necessary to evaluate how variable this methodology is, but the intra and inter assays carried out here found a coefficient of variation within acceptable parameters (Reed et al., 2002). However, it is still necessary to evaluate laboratory-to-laboratory variability, specially between different regions, to validate whether the performance of the method remains reproducible. In addition, in the cross reactivity evaluation, a percentage of positivity was observed in the group with Chagas' disease, but due to its great versatility, strategies using flow cytometry have already been proposed that can minimized false positive or inconclusive results (Teixeira-Carvalho et al., 2015).

Considering other serological tests based on grown promastigote forms for VL diagnosis, IFAT is the most used in South America, being one of the available tests in public health services in Brazil (Machado de Assis et al., 2016; Sakkas et al., 2016). Studies show a moderate IFAT

performance with 88–92% sensitivity and 83–88% specificity (Pedras et al., 2008; Machado de Assis et al., 2016), but our study showed an even lower sensitivity, despite a higher specificity. As for the parasitological diagnosis, the IFAT requires a complex infrastructure and trained technicians, thus limiting access and delaying diagnosis and treatment (Machado de Assis et al., 2012). DAT is one of the simplest and most inexpensive tests ever developed for the diagnosis of VL. A meta-analysis, evaluating the performance of DAT in patients with VL, presented estimates of sensitivity and specificity of 94.8% (Romero and Boelaert, 2010), corroborating with the high performance observed in our study. Despite its high levels of sensitivity and specificity, DAT is associated with problems in antigen quality control, refrigeration and lack of standardization of the test reading (Srivastava et al., 2011; Sundar and Rai, 2002). Therefore, in the present study, a commercial DAT kit was used to minimize this issue and indeed it displayed an efficient performance. Nevertheless, the possibility of quantification from PFPF through flow cytometry minimizes limitations such as the subjectivity of the readings, which is observed in agglutination tests such as DAT. As for the ELISA assay, it has the lowest performance among the different tests evaluated here.

An alternative to crude lysate in serological tests is the use of recombinant antigens, such as rK39 used for the rapid test, which is used in several countries and the rK28 rapid test, which was developed as a novel antigen for VL diagnosis in east Africa (Pattabhi et al., 2010; Pedral-Sampaio et al., 2016). Machado de Assis et al. (2016) showed that the rK39 test presented the best sensitivity and cost-benefit in the diagnosis of VL. However, in some endemic countries such as Sudan, the sensitivity of this test is unsatisfactory, which may be related to low amounts of antibodies produced by individuals or to the below-ideal test format (Abass et al., 2013). Flow cytometry, possibly associated with the use of recombinant antigens, may emerge then as an important alternative for the specific diagnosis of VL.

Despite its higher sensitivity, the costs associated with the flow cytometer are still a limitation, since it requires a medium-sized laboratory apparatus, in addition to the maintenance and training of personnel (Shapiro, 2003). However, that is minimized due to the assurance of higher sensitivity. The presence of photomultiplier detectors provides technical support for quantitative antibody analysis and provide the management of assays with such high serum dilutions, when compared to those usually tested by standard methodologies (Vitelli-Avelar et al., 2007). In addition, flow cytometry has already been used in clinical laboratories of developing countries to diagnose HIV/AIDS, cancer and anemia (Mandy et al., 2002; Pati and Jain, 2013; Denes et al., 2015; Pang et al., 2018). Therefore, its use for the serological diagnosis of VL is technically possible and can be scaled up with the possibility of using microtiter plates, which allow the diagnosis of several patients simultaneously (Rocha et al., 2006). The performance observed by flow cytometry in the present study strongly reinforces this possibility, as well as opening up new avenues of research with this technique such as the understanding the humoral response in VL and VL-HIV/AIDS patients. The possibility still exists to improve the technique still further with, for example, the use of recombinant antigens associated with beads.

Acknowledgments

This work was supported by a Brazilian grant from MCTI/CNPq/MS-SCITE - DECIT N° 40/2012 – Research in Neglected Diseases, and by scholarships from the Brazilian funding agency CAPES. We would like to thank Camila Queiroz from Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE for the *L. infantum* strain and Walter Lins Barbosa Junior for reviewing this manuscript.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

References

- Abass, E., Bollig, N., Reinhard, K., Camara, B., Mansour, D., Visekruna, A., Lohoff, M., Steinhoff, U., 2013. rKLO8, a novel *Leishmania donovani* - derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002322>.
- Abass, E., Kang, C., Martinkovic, F., Semião-Santos, S.J., Sundar, S., Walden, P., Piarroux, R., El Harith, A., Lohoff, M., Steinhoff, U., 2015. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116408>.
- Andrade, R.A., Reis, A.B., Gontijo, C.M.F., Braga, L.B., Rocha, R.D.R., Araújo, M.S.S., Vianna, L.R., Martins-Filho, O.A., 2007. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.01.002>.
- Boelaert, M., Rijal, S., Regmi, S., Singh, R., Karki, B., Jacquet, D., Chappuis, F., Campino, L., Desjeux, P., Le Ray, D., Koirala, S., Van der Stuyft, P., 2004. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 72–77.
- Boelaert, M., El-Safi, S., Hailu, A., Mukhtar, M., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., Aseffa, A., Mbui, J., Menten, J., Desjeux, P., Peeling, R.W., 2008. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.003>.
- Caballero, Z.C., Sousa, O.E., Marques, W.P., Saez-Alquezar, A., Umezawa, E.S., 2007. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1045–1049. <https://doi.org/10.1128/CVI.00127-07>.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>.
- Coura-Vital, W., de Araújo, V.E.M., Reis, I.A., Amancio, F.F., Reis, A.B., Carneiro, M., 2014. Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003374>.
- Cunningham, J., Hasker, E., Das, P., El Safi, S., Goto, H., Mondal, D., Mbuchi, M., Mukhtar, M., Rabello, A., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., Adams, E., Menten, J., Peeling, R., Khanal, B., Das, M., Oliveira, E., de Assis, T.M., Bhaskar, K.R., Huda, M.M., Hassan, M., Abdoun, A.O., Awad, A., Osman, M., Prajapati, D.K., Gidwani, K., Tiwary, P., Paniago, A.M.M., Sanchez, M.C.A., Celeste, B.J., Jacquet, D., Magiri, C., Muia, A., Kesusu, J., Ageed, A.F., Galal, N., Osman, O.S., Gupta, A.K., Bimal, A.S., Das, V.N.R., 2012. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 55, 1312–1319. <https://doi.org/10.1093/cid/cis716>.
- Da Silva, M.R.B., Stewart, J.M., Costa, C.H.N., 2005. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 811–814.
- Denes, V., Lakk, M., Makarovskiy, A., Jakso, P., Szappanos, S., Graf, L., Mandel, L., Karadi, I., Geck, P., 2015. Metastasis blood test by flow cytometry: in vivo cancer spheroids and the role of hypoxia. *Int. J. Cancer* 136, 1528–1536. <https://doi.org/10.1002/ijc.29155>.
- El Harith, A., Kolk, A.H.J., Leewenburg, J., Muigai, R., Huigen, E., Jelsma, T., Kager, P., 1988. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1321–1325.
- Eusebi, P., 2013. Diagnostic accuracy measures. *Cerebrovasc. Dis.* 267–272. <https://doi.org/10.1159/000353863>.
- Garcia, L.M., Coelho-Dos-Reis, J.G.A., Peruhype-Magalhães, V., Teixeira-Carvalho, A., Rocha, R.D.R., Araújo, M.S.S., Gomes, I.T., Carvalho, S.F.G., Dietze, R., Lemos, E.M., Andrade, M.C., Martins-Filho, O.A., 2009. 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* 350, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.07.004>.
- Ker, H.G., Coura-Vital, W., Aguiar-Soares, R.D.D.O., Roatt, B.M., das Dores Moreira, N., Carneiro, C.M., Machado, E.M.D.M., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Giunchetti, R.C., Araújo, M.S.S., Coelho, E.A.F., da Silveira-Lemos, D., Reis, A.B., 2013. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 1792–1798. <https://doi.org/10.1128/CVI.00575-13>.
- Lemos, E.M., Gomes, I.T., Carvalho, S.F.G., Rocha, R.D.R., Pissinatti, J.F., Martins-Filho, O.A., Dietze, R., 2007. Detection of anti-leishmania (*Leishmania*) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 569–576. <https://doi.org/10.1128/CVI.00354-06>.
- Machado de Assis, T.S., Rabello, A., Werneck, G.L., 2012. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Tropical Med. Int. Health* 00, 1–6.

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.03064.x>.
- Machado de Assis, T.S., Azeredo-da-Silva, A.L.F., Werneck, G.L., Rabello, A., 2016. Cost-effectiveness analysis of diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 464–471.
- Maia, Z., Lírio, M., Mistro, S., Mendes, C.M.C., Mehta, S.R., Badaro, R., 2012. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001484>.
- Mandy, F., Nicholson, J., Autran, B., Janosy, G., 2002. T-cell subset counting and the fight against AIDS: reflections over a 20-year struggle. *Clin. Cytom.* 50, 39–45. <https://doi.org/10.1002/cyto.10097>.
- Martins-Filho, O. a, Pereira, M.E., Carvalho, J.F., Cançado, J.R., Brenner, Z., 1995. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypanostigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 569–573.
- Matos, C.S., Coelho-dos-Reis, J.G.A., Rassi, A., Luquetti, A.O., Dias, J.C.P., Elói-Santos, S.M., Gomes, I.T., Vitelli-Avelar, D.M., Wendling, A.P.B., Rocha, R.D.R., Teixeira-Carvalho, A., Peruhype-Magalhães, V., Andrade, M.C., Martins-Filho, O.A., 2011. 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* 369, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.03.007>.
- Oliveira, G.G.S., Magalhães, F.B., Teixeira, M.C.A., Pereira, A.M., Pinheiro, C.G.M., Santos, L.R., Nascimento, M.B., Bedor, C.N.G., Albuquerque, A.L., Dos-Santos, W.L.C., Gomes, Y.M., Moreira, E.D., Brito, M.E.F., Pontes De Carvalho, L.C., De Melo Neto, O.P., 2011. 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.* 85, 1025–1034. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0102>.
- Oliveira, A.P., de Castro, M.C.A.B., de Almeida, A.F., Souza, M. de A., de Oliveira, B.C., Reis, L.C., Goto, H., de Brito, M.E.F., Celeste, B.J., Martins-Filho, O.A., Pereira, V.R.A., 2013. 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* 387, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.11.002>.
- Organização Pan-Americana da Saúde, 2018. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Organização Pan-Americana da Saúde, Washington. www.paho.org/leishmaniasis.
- Pang, K., Xie, C., Yang, Z., Suo, Y., Zhu, X., Wei, D., Weng, X., Wei, X., Gu, Z., 2018. Monitoring circulating prostate cancer cells by in vivo flow cytometry assesses androgen deprivation therapy on metastasis. *Cytom. Part A*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23369>.
- Pati, H.P., Jain, S., 2013. Flow cytometry in hematological disorders. *Indian J. Pediatr.* 80, 772–778. <https://doi.org/10.1007/s12098-013-1152-2>.
- Pattabhi, S., Whittle, J., Mohamath, R., El-Safi, S., Moulton, G.G., Guderian, J.A., Colombara, D., Abdoon, A.O., Mukhtar, M.M., Mondal, D., Esfandiari, J., Kumar, S., Chun, P., Reed, S.G., Bhatia, A., 2010. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000822>.
- Pedral-Sampaio, G., Alves, J.S., Schriefer, A., Magalhães, A., Meyer, R., Glesby, M.J., Carvalho, E.M., Carvalho, L.P., 2016. Detection of IgG anti-leishmania antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. *PLoS One* 11, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162793>.
- Pedras, M.J., de Gouvêa Viana, L., de Oliveira, E.J., Rabello, A., 2008. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.11.004>.
- Pereira, V.R.A., Reis, L.D.C., Souza, M.D.A., de Oliveira, A.P., de Brito, M.E.F., Lage, P.S., Andrade, M.C., Rocha, R.D.R., Martins-Filho, O.A., 2012. 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.* 74, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.025>.
- Pissinate, J.F., Gomes, I.T., Peruhype-Magalhães, V., Dietze, R., Martins-Filho, O.A., Lemos, E.M., 2008. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* 336, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.04.018>.
- Reed, G.F., Lynn, F., Meade, B.D., 2002. Use of coefficient of variation in assess in Variability of quantitative assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1235–1239. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1235>.
- Rocha, R., Gontijo, C.M.F., Elói-Santos, S.M., Carvalho, A.T., Corrêa-Oliveira, R., Marques, M.J., Genaro, O., Mayrink, W., Martins-Filho, O.A., 2002. 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.* 35, 551–562. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000600002>.
- Rocha, R.D.R., Gontijo, C.M.F., Elói-Santos, S.M., Teixeira-Carvalho, A., Corrêa-Oliveira, R., Ferrari, T.C.A., Marques, M.J., Mayrink, W., Martins-Filho, O.A., 2006. Clinical value of anti-live Leishmania (Viannia) braziliensis immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Heal.* 11, 156–166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01552.x>.
- Romero, G. a S., Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e584. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>.
- Sakkas, H., Gartzonika, C., Leviodiotou, S., 2016. Laboratory diagnosis of human visceral Leishmaniasis. *J. Vector Borne Dis.* 53, 8–16.
- Shapiro, H.M., 2003. *Practical Flow Cytometry*, fourth ed. New York.
- Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., Sundar, S., 2011. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>.
- Sundar, S., Rai, M., 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis 9. pp. 951–958. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951>.
- Teixeira-Carvalho, A., Campos, F.M.F., Geiger, S.M., Rocha, R.D.R., Araújo, F.F., Vitelli Avelar, D.M., Andrade, M.C., Araújo, M.S.S., Lemos, E.M., Freitas Carneiro Proietti, A.B., Sabino, E.C., Caldas, R.G., Freitas, C.R.C., Campi-Azevedo, A.C., Elói-Santos, S.M., Martins-Filho, O.A., 2015. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. *PLoS One* 10, e0122938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122938>.
- Vitelli-Avelar, D.M., Sathler-Avelar, R., Wendling, A.P.B., Rocha, R.D.R., Teixeira-Carvalho, A., Martins, N.E., Dias, J.C.P., Rassi, A., Luquetti, A.O., Elói-Santos, S.M., Martins-Filho, O.A., 2007. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J. Immunol. Methods* 318, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.009>.

6 CONCLUSÃO

- A prevalência de LV foi de 16.9% entre os pacientes infectados com HIV internos nos hospitais em Pernambuco, bem como houve uma baixa concordância de testes positivos, evidenciando-se assim a necessidade de novas abordagens diagnósticas para esses casos;
- Apesar de uma avaliação preliminar com um número reduzido de indivíduos, a citometria de fluxo apresentou um potencial de ajudar na caracterização da resposta humoral à *Leishmania* em pacientes infectados pelo HIV e o protocolo descrito nesta tese pode ser útil para casos inconclusivos e com dificuldades na realização do exame parasitológico.
- A detecção de IgG total anti- *Leishmania* por citometria de fluxo pode ser uma ferramenta segura e reprodutível para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Em relação a comparação dos testes, o teste de imunofluorescência indireta apresentou uma baixa performance na identificação dos casos LV e uma baixa concordância com a citometria de fluxo e uma alta concordância com o DAT e o teste rápido rK39 para identificação dos casos de LV, porém apesar desses resultados, ajustes deverão ser necessários para a redução de reatividade cruzada com tripanossomatídeos, como o *Trypanosoma cruzi*.

7 PERSPECTIVAS

- Diante da avaliação da aplicabilidade da citometria em detectar IgG total anti-*Leishmania*, é válido avaliar como os isotipos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) estão presentes nesses pacientes e correlacionar esse padrão com o quadro clínico dos mesmos, além disso, essa avaliação deverá ser feita após o tratamento para verificar o potencial dos isotipos como biomarcadores de cura; assim seria desejável a caracterização desses anticorpos em indivíduos assintomáticos;
- É necessária a avaliação de anticorpos anti-*Leishmania* por citometria de fluxo com 2100 um maior número de pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS com diferentes quadros de imunossupressão para se ter uma significância estatística do seu uso para a identificação de anticorpos;
- Outra perspectiva é a realização de um estudo multicêntrico que vise avaliar a reprodutibilidade da técnica em diferentes laboratórios e avaliar o uso de antígenos recombinantes acoplados a *beads* como uma alternativa ao uso dos parasitas vivos ou fixados e, conseqüente redução da reatividade cruzada.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, Londres, v. 383, p. 787–793, 1996.
- ADRIAENSEN, W. et al. Immunomodulatory Therapy of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients. **Frontiers in Immunology**, Amsterdã, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01943/full>>. Acesso em: 20 out.2018.
- ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, P. et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 692–697, 2010.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection, the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, p. 298-319, 1997.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.21, p.334–359, 2008.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, São Francisco, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671> >. Acesso em: 10 set.2013.
- ALVARENGA, D. G. et al. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, p. 194-197, 2010.
- ANDRADE, R. A. D.E et al. Clinical value of anti-Leishmania (Leishmania) chagasi IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdã, v. 116, p. 85–97, 2007.
- ANTINORI, S. et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. **Clinical Infectious diseases**, Chicago, v. 44, p.1602–1610, 2007
- ARONSON, N. et al. Guidelines 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.
- ARORA, S.K. et al. An epitope- specific PCR test for diagnosis of Leishmania donovani infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102 p. 41–45, 2008.

ASFARAM, S. et al. Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis. **Parasitology International**, Amsterdã, v. 67, n. 5, p. 575–583, 2018.

ASSIS, T.S.M, et al. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 17, n. 10, p. 1202–1207, 2012.

ASSIS, T. S. M 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.

ATTAR, Z.J, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 7, p.811–816, 2001.

AZZAM, R., et al. Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v.22, n. 7, p.619–629, 2006.

BARBOSA-JÚNIOR, W. L. B. et al. Rapid tests and the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome coinfection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 93, n. 5, p. 967–969, 2015.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian Journal of Medical Research**, Nova Delhi, v. 123, p. 289-294, 2006.

BHATTACHARYYA, T. et al. IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in Visceral Leishmaniasis, and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 10, 2014. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003273> >. Acesso em: 28 set.2015.

BERNIER, R., et al. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoid cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Journal of Virology**, Washington, v.69, n.11, p.7282–7285, 1995.

BOELAERT, M. et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 1, p. 32–40, 2008.

BOELAERT, M. et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 1, p. 72–77, 2004.

BORGES, A. S. et al. Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, p. 713-719, 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV**. 2 ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2015.109 p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Visceral: Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. 816 p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

BUXBAUM, L.U. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania mexicana* infection. **Immunologic Research**, Basel, v.4 , p.197–209, 2008.

CALDAS, A., et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, London, v.5, p.113, 2005.

CALICH, L., et al. Relato de um caso de calazar em paciente com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 24, p. 64, 1991.

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.

CARNAÚBA, D. et al. Atypical disseminated leishmaniasis similar to post-kala-azar dermal leishmaniasis in a Brazilian AIDS patient infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi: a case report. **International journal of infectious diseases**, Hamilton, v. 13, n. 6, 2009. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971209001301>>. Acesso em: 28 out.2012.

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. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.103, p. 743–748, 2009.

CARVALHO NETA, A.V. et al. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e zootecnia**, Minas Gerais, v. 58, n. 4, p. 480-488, 2006.

CASTILHO, T. M; SHAW, J. J; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v 41, p.540–546, 2003.

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

CHAPPUIS, F. et al. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, London, v. 333, 2006. Disponível em: < <https://www.bmj.com/content/333/7571/723.long>>. Acesso em: 28 nov.2015.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews**, London, v. 5, p.873-882, 2007.

CUPOLILLO, E., et al. Intergenic region typing (irt): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of leishmania, **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 1/2, p. 145-155, 1995.

COTA G. F.; SOUZA M. R.; RABELLO A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV patients: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, p.1153. 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001153>>. Acesso em: 21 nov.2014.

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. Disponível em: < <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001665>>. Acesso em: 21 nov.2014.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, p.570–577, 2013.

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, p e2816, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743472>>. Acesso em: 21 jul.2015.

CRUZ, I. et al. Leishmania/HIV co- infections in the second decade. **The Indian journal of medical research**, Nova Delhi, v.123, v.3, p 357-88, 2006.

CUNHA, A. M; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. previous note. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-6, 1938.

COZZOLINO I., et al. Lymph Node Fine-Needle Cytology of Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Classification by Flow Cytometry. **Acta Cytologica**, Baltimore, v.60, p.302–314, 2016.

DA MATTA, V. L. R. et al. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 14, n. 1, p. 5–12, 2000.

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

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 117-118, 2006.

DANTAS-TORRES et al., Sand fly population and cutaneous leishmaniasis in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2017. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005406> >. Acesso em: 26 jul.2018.

DE FREITAS, E. O. et al. The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 7, n.153, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4840207/> >. Acesso em: 21 abr.2017.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & bioscience**, Singapore, v. 5, n. 31, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4474361/> >. Acesso em: 21 abr.2017.

DEBORGGRAEVE, S. et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 198, p. 1565-1572, 2008.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIEHL, A. R. S. et al. Microscopy and polymerase chain reaction detection of *Leishmania chagasi* in the pleural and ascitic fluid of a patient with AIDS: case report and review of diagnosis and therapy of visceral leishmaniasis. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, Ontário, v. 15, p. 231-234, 2004.

DIRO, E. et al. Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e2869, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4474361/> >. Acesso em: 21 abr.2017.

DOURADO, Z. F. et al. Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, p. 205-214, 2007.

DU, L. et al. The evolution of guidelines for the validation of flow cytometric methods. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 37, n. S1, p. 3–10, 2015.

DUTHIE, M. S. et al. The Development and Clinical Evaluation of Second Generation Leishmaniasis. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012.

EL TAI, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, n. 5, p. 575–579, 2000.

FABER, W. R. L. et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of dermatology**, St Louis, v. 49, p 70–74, 2003.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. **La Revue de Médecine Interne**, Paris, v. 12, p. 1-8, 2011.

FERREIRA, E. et al. Visceral leishmaniasis in a Brazilian child infected perinatally with human immunodeficiency virus. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 20, p. 224–226, 2001.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p.238–245, 2010.

FREIRE et al. Evaluation of a new brand of immunochromatographic test for visceral leishmaniasis in Brazil made available from 2018. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, 2018. Disponível em:<
<http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v60/1678-9946-rimtsp-60-S1678-9946201860049.pdf> >.
Acesso em: 16 abr.2018.

GALLO, P., et al. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. **Immunology Letters**, Amsterdam v.133, n.2, p.70–77, 2010.

GARCIA, L. et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p.2294–2297, 2004.

GARCIA, L. M. 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. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 350, n. 1/2, p. 36–45, 31 out. 2009.

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-alpha. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. e441, 2009. Disponível em:<
<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000441> >. Acesso em: 16 mai.2017.

GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GIBSON-CORLEY, K.N., et al. Promotion of a functional B cell germinal center response after *Leishmania* species co-infection is associated with lesion resolution. **American Journal of Pathology**, New York, v.180, n.5, p.2009–2017, 2012.

GIBSON-CORLEY, K.N., **Understanding the role of B cells during *Leishmania amazonensis* infection**. Ames, Iowa: Iowa State University, 2010.

GIDWANI, K., et al. Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.18, n.2, p. 346–348, 2011.

GOMES, I. T. et al. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 360, n. 1-2, p. 76–83, 2010.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. et al. The equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1437, 2017. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5670345/pdf/fimmu-08-01437.pdf> >.
 Acesso em: 16 abr.2018.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil, quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p.338-349, 2004.

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

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p.494–501, 2002.

GUILLIAMS, M., et al. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, London v.14, n.2, p.94–108, 2014.

HARRIS, E. et al. Single-step multiplex PCR assay for characterization of new world *Leishmania* complexes. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n.7, p 1989–1995, 1998.

HEINZEL, F.P, et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 169, p. 59–72, 1989.

HERNANDEZ, D.E., et al. Visceral leishmaniasis with cutaneous and rectal dissemination due to *Leishmania braziliensis* in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 34, p. 114–115, 1995.

KALINA T., et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**, New Jersey, v. 26, p. 1986–2010, 2012.

KATO, H. et al. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 72, p. 87–93, 2005.

KEDZIERSKA, K; CROWE, S.M. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.9, n.21, p.1893–903, 2002.

KER, H. G. et al. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Clinical and vaccine immunology**, Washington, v. 20, n. 12, p. 1792–8, 2013.

KIMA, P.E; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, , Lausanne, v. 4, p. 156, 2013. Disponível em: <
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00156/full> >. Acesso em: 10 mai.2016.

KUMAR R, NYLEN S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**. Lausanne, v.3, p.251, 2012. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418610/pdf/fimmu-03-00251.pdf> >. Acesso em: 15 out.2017.

LAGUNA, F. Treatment of leishmaniasis in HIV-positive patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, p.135–142, 2003.

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

LEMOS, E.M; et al. Detection of anti-*Leishmania* (*Leishmania*) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**. Washington, v.14, p 569-576, 2007.

LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: Current challenges. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 8, p. 147–156, 2016.

LOCKWOOD, D. N. J.; SUNDAR, S. Serological tests for visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, London, v. 333, n. 7571, p. 711–712, 2006.

LOMA, A. et al. Leishmaniasis or AIDS? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, p. 421-422, 1985.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 9735-9380, 2007.

MACHADO, A. A. et al. Novos casos de leishmaniose associados a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 29, p. 26, 1996.

MAHAJAN, R., et al. Combination treatment for visceral leishmaniasis patients coinfecting with human immunodeficiency virus in India. **Clinical and Infectious Disease**, Chicago, v. 61, p. 1255-1262, 2015.

MAIA-ELKHOURY A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2941-2947, 2008.

MALAFAIA, G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 587–596, 2009.

MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, 2012. Disponível em: <
<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001484> >. Acesso em: 25 set.2018.

MARQUES, M. J. et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 54, p.37–43, 2006.

MARTINS-FILHO, O.A., et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti- live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy treatment in human Chagas disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 2, p.569–573, 1995.

MAURICIO, I. L. et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 188-189, 2000.

MAURICIO, I.L., et al. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, London, v.122, p.393-403, 2001.

MATOS, C. S. 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. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 369, n. 1–2, p. 22–32, 2011.

MULLER, I. et al. T-CELL Responses and Immunity to experimental infection with *Leishmania Major*. **Annual review Immunology Immunology**, Palo Alto, v. 7, n. 4, p. 561–578, 1989.

MEDDEB-GARNAOUI, A., et al. Association analysis of HLA-class II and class III gene polymorphisms in the susceptibility to mediterranean visceral leishmaniasis. **Human Immunology**, New York, v. 62, p.509-517, 2001.

MELO, E.C; FORTALEZA, C.M.C.B. Challenges in the Therapy of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Public Health Perspective. **Journal of Tropical Medicine**, v. 5; p.319234, 2013. Disponível em:< <https://www.hindawi.com/journals/jtm/2013/319234/> >. Acesso em: 09 mar.2016.

MILES, S.A., et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.201, n.5, p.747–754, 2005.

MOLINARO E. M; AMENDOIEIRA, M.R.R (org.) **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

NASEREDDIN, A. et al. Molecular diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 46, n. 9, p. 2848–2855, 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

NIGRO L., et al. Visceral leishmaniasis and HIV co- infection: a rare case of pulmonary and oral localization. **Le Infezioni in Medicina**. Genova, v.11, p. 93-96, 2003.

NOCITO, I. Visceral involvement due to Leishmania mexicana in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.113, p. 260–262, 2002.

NUNO MARQUES, et al. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana na era da terapêutica antiretroviral de alta eficácia. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 20, p. 291-298, 2007.

NUZUM, E. et al. Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 171, p.751–754, 1995.

NYLEN, S; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 28, p. 378–384, 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, A.P; 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. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.387, p, 245-253, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: **Leishmanioses**: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, 2018. Disponível em: <www.paho.org/leishmaniasis> Acesso.em: 15 mai.2017.

ORSINI, M. et al. Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, p. 259-262, 2002.

OZBILGE, H., et al. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, n. 55, p. 1329-1331, 2006.

PASSOS, S. et al. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical Diagnostic Laboratory and Immunology**, Washington, v.12, p.1164–1167, 2005.

PEDRAL-SAMPAIO G., et al. Detection of IgG Anti-*Leishmania* Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS One**, San Francisco, v.11, n.9, p. e0162793., 2016. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0162793> > Acesso.em: 10 out.2017.

PEDRAS, M.J. et al. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, p. 172–178. 2008.

PEREIRA, V.R.A., et al . Evaluation of anti-lived and anti-fixed- *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 74, p. 292-298, 2012.

PERUHYPE-MAGALHAES, V., et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scand. Journal of Immunology**, Baltimore, v. 62, p. 487-495, 2005.

PIARROUX, R. R. et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 49, p.364-369, 1993.

PILLAI V ; DORFMAN D. M. Flow Cytometry of Nonhematopoietic Neoplasms. **Acta Cytologica**, Baltimore, v. 60, p.36–343, 2016.

PINTADO, V.; LOPES-VELEZ, R. Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 19, p. 353–357, 2001.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006052> > Acesso.em: 13 set.2016.

RABELLO, A. *et al.* *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 1, p.17–28, 2003.

RAETHER, W; HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, Berlin, v. 90, p. 19-39, 2003.

REITHINGER R, DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n.1, p.21–25. 2007.

REY, L. **Parasitologia**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

ROCHA R.D.R, et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania*(Viannia) *braziliensis*, detectados por 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.

ROCHA, R. D. R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 156–166, 2006.

RODRIGUES, V., et al. Abortive T follicular helper development is associated with a defective humoral response in *Leishmania infantum*-infected macaques. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.10, n.4, p.:e1004096, 2014. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004096> > Acesso.em: 26 mar.2016.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & vectors**, London, v. 9, p. 118, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4774109/> > Acesso.em: 28 jun.2017.

ROMERO G.A, BOELAERT M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America- a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, p 584, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20098726>> Acesso.em: 28 jun.2014.

ROMERO, G. A. S. et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e0005706, 2017. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005706> > Acesso.em: 28 jun.2014.

SACKS, D. L., et al. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 138, p. 908–913, 1987.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human

Visceral. **Journal of Vector Borne Disease**, Nova Delhi, n. 53, p. 8–16, 2016.

SARKARI, B; CHANCE, M; HOMMEL M. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. **Acta Tropica**, Basel, v. 82, p 339–48, 2002.

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

SCOTT, P., et al. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 112, p. 161–182, 1989.

SHAPIRO, H.M.. *Practical Flow Cytometry.*, 4ed. New York, 2003.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 577-579, 2006.

SHREFFLER, W.G., et al. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of Leishmania species. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.167, n.2, p.426–430, 1993.

SILVA, E. D. et al. Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasília, v. 55, p 425-428, 2013.

SILVA, E. et al. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 285-291, 2001.

SILVA E. S. et al. Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) brasiliensis* in a patient infected with HIV. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 44, p. 145-149, 2002.

SINGH, S. J. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v.49, p 55–60, 2003.

SOUZA, M. A. D. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 137-141, 2005.

SOUSA-GOMES, M. L. et al. Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, p. 519-526, 2011.

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

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

SUNDAR, S; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, London, v. 16, p. 237-252, 2015.

SUNDAR, S; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, London, v. 14, p.53-63, 2013.

SUNDAR, S., et al. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 47 p. 1000-1006, 2008.

SUNDAR, S., et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 31, p. 1104-1107, 2000.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis : present and future developments. **Parasitology**, London, v. 145, n. 4, p. 481–489, 2018.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0122938, 2015. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0122938> > Acesso.em: 28 jul.2015.

THOMAS, B.N., et al. Fcγ3R mediates immunoglobulin G- induced interleukin-10 and is required for chronic Leishmania mexicana lesions. **Infection and Immunity**, Washington, v.76 ,n,2, p.623–631, 2008.

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., et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 10, p.184–194, 2010.

VIANA, G. M. C. et al. Leishmaniose Visceral e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Relato de um caso. **Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, p. 384-386, 1994.

VOGT, F. 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.

WERNECK, G.L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in

Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, p. 2937-2940, 2008.

WINTER, H., et al. Evaluation of pharmacokinetic interaction between PA-824 and midazolam in healthy adult subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, p. 3699-3703, 2013.

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.

CONSULTATIVE MEETING OF LEISHMANIA/HIV COINFECTION, 5, 2007, Addis Ababa. **Report of the fifth consultative meeting on Leishmania/ HIV coinfection**. Genova: OMS, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of the leishmaniases**. Genova, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Weekly epidemiological record**, n. 38, p. 557–572, 2017. Disponível em:< <http://www.who.int/gho/fr/>> Acesso em: 25 de mar.2018..

ZELAZNY, A.M, et al. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania spp.* **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.72, p. 415–420, 2005.

APÊNDICE A – TCLE: GRUPO PACIENTE



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente

Projeto: “Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico e no critério de cura da leishmaniose visceral humana”.

Convidamos o (a) Sr (a) _____, para participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes com leishmaniose visceral e após tratamento quimioterápico.

Como o (a) Sr (a) faz parte do grupo de pacientes, coletaremos cerca de 10 ml (2 colheres de chá) de sangue venoso antes do tratamento (testes de triagem) e 10 ml (2 colheres de chá) de sangue venoso após tratamento (antes da alta hospitalar, 3, 6 e 12 meses após o tratamento) totalizando 5 coletas para a realização de exames que incluirão: Citometria de fluxo, ELISA, teste aglutinação direta (DAT), teste imunocromatográfico rK39, imunofluorescência indireta para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio (exame de anticorpo), Reação em cadeia da polimerase - PCR para pesquisar material genético (DNA) do micróbio da leishmaniose e coletaremos cerca de 30 ml (6 colheres de chá) de urina para pesquisar uma substância liberada pelo micróbio (teste de aglutinação do látex). Todas as informações e os detalhes dos exames realizados serão previamente esclarecidos.

Caso um ou mais testes de triagem forem positivos, você será convidado para realizar um outro exame com coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (medulograma), sendo esse recomendado pelo Ministério da Saúde como melhor exame no diagnóstico do micróbio de Calazar. Os resultados desses exames serão entregues ao Sr (a) e ao seu médico assistente, que deixará o resultado no seu prontuário.

Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. A coleta de sangue pode causar desconforto no local, na hora da picada, recomenda-se não friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O tratamento será realizado no hospital por funcionários qualificados (médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem) segundo recomendações do Ministério da Saúde. 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. Caso ocorra qualquer alteração em seu organismo, deverá procurar orientação médica.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo que poderão ser usados para auxiliar no diagnóstico e como a doença se comporta ao longo do tempo em pacientes com leishmaniose visceral humana em Pernambuco.

O (A) Sr (a) é livre para recusar participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico. Solicitamos a sua autorização para coletarmos suas informações médicas para que sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas não divulgando de jeito nenhum sua identidade. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para exame de laboratório, selecionando uma das opções abaixo:

() **CONCORDO** com o armazenamento e utilização das amostras para futuras pesquisas, com o encaminhamento do laudo para a residência cadastrada.

() **NÃO CONCORDO** com o armazenamento e utilização das amostras para futuras pesquisas.

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

Assinatura do paciente _____

data _____

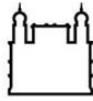
Endereço do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura Membro da Equipe de Pesquisa _____

data _____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Valéria Pereira Hernandes, pesquisadora do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2500.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

APÊNDICE B – TCLE: Grupo Paciente menor de idade



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente menor de idade

Projeto: “Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico e no critério de cura da leishmaniose visceral humana”.

Convidamos o (a) Sr (a) _____ para autorizar a participação voluntária do menor _____, neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes com leishmaniose visceral e após tratamento quimioterápico.

O menor faz parte do grupo de pacientes, portanto será submetido a coleta de 10 ml (2 colheres de chá) de sangue venoso antes e 10 ml (2 colheres de chá) de sangue venoso após tratamento quimioterápico (antes da alta hospitalar, 3, 6 e 12 meses após o tratamento) totalizando 5 coletas para a realização de exames que incluirão: Citometria de fluxo, ELISA, teste de aglutinação direta (DAT), teste imunocromatográfico rK39, imunofluorescência indireta para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbico (exame de anticorpo), Reação em cadeia da polimerase - PCR para pesquisar material genético (DNA) do micróbico da leishmaniose e coletaremos cerca de 30 ml (6 colheres de chá) de urina para pesquisar uma substância liberada pelo micróbico (teste de aglutinação do látex). Todas as informações e os detalhes dos exames realizados serão previamente esclarecidos.

Caso um ou mais testes de triagem forem positivos, o menor será convidado para realizar um outro exame com coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (medulograma). Sendo esse recomendado pelo Ministério da Saúde como melhor exame no diagnóstico do micróbico de Calazar. Todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos ao Sr (a), responsável pelo menor. Os resultados desses exames serão entregues ao Sr (a) e ao seu médico assistente, que deixará o resultado no prontuário do menor.

Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. A coleta de sangue pode causar desconforto no local, na hora da picada e que ele não deve friccionar o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O tratamento será realizado no hospital por funcionários qualificados (médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem) segundo recomendações do Ministério da Saúde. 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. Caso ocorra qualquer alteração no organismo do menor, deverá procurar orientação médica.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas para auxiliar no diagnóstico e como a doença se comporta ao longo do tempo em pacientes com leishmaniose visceral humana em Pernambuco.

Antes da participação do menor no referido projeto, qualquer esclarecimento adicional que julgar necessário, pode ser realizado por um participante do projeto. O menor o qual o (a) Sr (a) é responsável poderá recusar ou retirar o consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

Solicitamos sua autorização para conservar as amostras do menor para os exames de laboratoriais, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas, entraremos em contato para novo consentimento. Também solicitamos a autorização para coletarmos as informações médicas do menor para que sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas não divulgando de jeito nenhum sua identidade. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O nome do menor ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para exame de laboratório, selecionando uma das opções abaixo:

() **CONCORDO** com o armazenamento e utilização das amostras para futuras pesquisas, com o encaminhamento do laudo para a residência cadastrada.

() **NÃO CONCORDO** com o armazenamento e utilização das amostras para futuras pesquisas.

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

Assinatura do responsável pelo menor _____

_____ data

Endereço do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura Membro da Equipe de Pesquisa _____

_____ data

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

Dra. Valéria Pereira Hernandes, pesquisadora do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 21 01-2500.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

APÊNDICE C – TCLE: Grupo Paciente (12 anos a 18 anos incompletos)



TERMO DE ASSENTIMENTO – Para menores de 12 anos a 18 anos incompletos

Projeto: “Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico e no critério de cura da leishmaniose visceral humana”.

Convidamos o (a) Sr (a) _____ para autorizar a participação voluntária do menor _____, neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes com leishmaniose visceral e após tratamento quimioterápico.

Como o menor faz parte do grupo de pacientes, será submetido a coleta de 10 ml (2 colheres de chá) de sangue venoso antes e 10 ml (2 colheres de chá) de sangue venoso após tratamento (antes da alta hospitalar, 3, 6 e 12 meses após o tratamento) totalizando 5 coletas para a realização de exames que incluirão: para a realização de exames que incluirão: Citometria de fluxo, ELISA, teste aglutinação direta (DAT), teste imunocromatográfico rK39, imunofluorescência indireta para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio (exame de anticorpo), Reação em cadeia da polimerase - PCR para pesquisar material genético (DNA) do micróbio da leishmaniose e coletaremos cerca de 30 ml (6 colheres de chá) de urina para pesquisar uma substância liberada pelo micróbio (teste de aglutinação do látex). Todas as informações e os detalhes dos exames realizados serão previamente esclarecidos.

Caso um ou mais testes de triagem forem positivos, você será convidado para realizar um outro exame com coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (medulograma). Sendo esse recomendado pelo Ministério da Saúde como melhor exame no diagnóstico do micróbio de Calazar. Os resultados desses exames serão entregues ao Sr (a) e ao seu médico assistente, que deixará o resultado no prontuário.

Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. A coleta de sangue pode causar desconforto no local, na hora da picada, recomenda-se não friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. 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. Caso ocorra qualquer alteração em seu organismo, deverá procurar orientação médica.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo que poderão ser usados para auxiliar no diagnóstico e como a doença se comporta ao longo do tempo em pacientes com leishmaniose visceral humana em Pernambuco.

Você é livre para recusar participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico. Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para os exames de laboratoriais, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas, entraremos em contato para novo consentimento. Também solicitamos a sua autorização para coletarmos suas informações médicas para que sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas não divulgando de jeito nenhum sua identidade. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para exame de laboratório, selecionando uma das opções abaixo:

CONCORDO com o armazenamento e utilização das amostras para futuras pesquisas, com o encaminhamento do laudo para a residência cadastrada.

NÃO CONCORDO com o armazenamento e utilização das amostras para futuras pesquisas.

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

Assinatura do paciente _____ data _____

Assinatura do Responsável do menor _____ data _____

Endereço do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura Membro da Equipe de Pesquisa _____ data _____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Valéria Pereira Hernandes, pesquisadora do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2500.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

APÊNDICE D – TCLE: Grupo Controle



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle

Projeto: “Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico e no critério de cura da leishmaniose visceral humana”.

Convidamos o (a) Sr (a) _____, para participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal do deste projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes com leishmaniose visceral, e após tratamento quimioterápico.

O Sr (a) fará parte do grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. O Sr (a) será submetido a coleta de 10 ml (2 colheres de chá) para a realização de exames que incluirão: Citometria de fluxo, ELISA, teste aglutinação direta (DAT), teste imunocromatográfico rK39, imunofluorescência indireta para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio (exame de anticorpo), Reação em cadeia da polimerase - PCR para pesquisar material genético (DNA) do micróbio da leishmaniose e coletaremos cerca de 30 ml (6 colheres de chá) de urina para pesquisar uma substância liberada pelo micróbio (teste de aglutinação do látex). Todas as informações e os detalhes dos exames realizados serão previamente esclarecidos.

Caso um ou mais testes de triagem forem positivos, você será convidado para realizar um outro exame com coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (medulograma).

Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. A coleta de sangue pode causar desconforto no local, na hora da picada, recomenda-se não friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. 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.

Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas para auxiliar no diagnóstico e como a doença se comporta ao longo do tempo em pacientes com leishmaniose visceral humana em Pernambuco. Como o (a) Sr (a) fará parte do grupo controle não será submetido a nenhum tratamento para leishmaniose visceral humana.

O (A) Sr (a) é livre para recusar participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico. Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para os exames de laboratoriais, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas, entraremos em contato para novo consentimento. Também solicitamos a sua autorização para coletarmos suas informações médicas para que sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas não divulgando de jeito nenhum sua identidade. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para exame de laboratório, selecionando uma das opções abaixo:

() **CONCORDO** com o armazenamento e utilização das amostras para futuras pesquisas, com o encaminhamento do laudo para a residência cadastrada.

() **NÃO CONCORDO** com o armazenamento e utilização das amostras para futuras pesquisas.

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

Assinatura do voluntário _____ data _____

Endereço do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura Membro da Equipe de Pesquisa _____ data _____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Valéria Pereira Hernandes, pesquisadora do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2500.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

ANEXO A



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico e no critério de cura da Leishmaniose Visceral Humana".

Pesquisador responsável: Valéria Pereira Hernandes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 04/12/2015

Registro no CAAE: 53138516.0.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.742.222

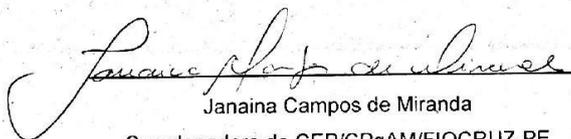
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 28 de outubro de 2016.


Janaina Campos de Miranda
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedetica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO B

Capítulo de ebook “Patologia das doenças” publicado na editora Atena



CAPÍTULO 11

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS LEISHMANIOSES: COMPARAÇÃO ENTRE A CITOMETRIA DE FLUXO E MÉTODOS CONVENCIONAIS

Beatriz Coutinho de Oliveira

Programa de Pós-Graduação Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

Andresa Pereira de Oliveira Mendes

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Recife, PE, Brasil

Els Dionísio da Silva

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Recife, PE, Brasil

Allana Maria de Souza Pereira

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Recife, PE, Brasil

Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Enfermagem, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória, PE, Brasil.

Maria Edileuza Felinto de Brito

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Recife, PE, Brasil

Valéria Rêgo Alves Pereira

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Recife, PE, Brasil

RESUMO: As Leishmanioses compreendem um grupo de doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O diagnóstico preliminar dessas doenças é baseado nos sintomas e sinais clínicos, amparado por exames laboratoriais. Os testes sorológicos convencionais não permitem de

forma precisa a diferenciação de infecções recentes e tardias, o que não possibilita a utilização como critério de cura, além disso, podem apresentar reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, limitando assim a especificidade. Nesse contexto, este capítulo fez uma descrição da literatura das ferramentas que são utilizadas no diagnóstico das leishmanioses e comparou experimentalmente o desempenho da citometria de fluxo, ELISA e IFI em diagnosticar pacientes com LTA antes, 1, 2 e 5 anos após o tratamento com Glucantime®. A partir do que foi observado acredita-se que a citometria de fluxo seja uma ferramenta promissora para o diagnóstico das Leishmanioses, uma vez que foi positiva na presença da doença e que diante dos dados apresentados, este teste pode contribuir como uma técnica mais sensível e específica.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmanioses, Citometria de Fluxo, Diagnóstico Sorológico.

ABSTRACT: Leishmaniasis comprises a group of neglected diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania*. The preliminary diagnosis of these diseases is based on symptoms and clinical signs, supported by laboratory tests. Conventional serological tests are not able to accurately differentiate recent from late infections, which does not allow their use as a cure criterion. In addition, they may cross-react

with other trypanosomatids, thus limiting specificity. In this context, the present chapter described the tools which are used in the diagnosis of leishmaniasis and compared the performances of flow cytometry, ELISA and IFA in diagnosing patients with ACL before, 1, 2 and 5 years after treatment with Glucantime®. Thus, it is believed that flow cytometry is a promising tool for the diagnosis of Leishmaniasis, since it was positive in the presence of the disease and that based on the presented data, this test can contribute as a more sensitive and specific tool.

KEYWORDS: Leishmaniasis; flow cytometry; serological diagnosis

1 | INTRODUÇÃO

As Leishmanioses compreendem um grupo de doenças negligenciadas endêmicas em 98 países, transmitidas por vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (ALVAR et al, 2012). As Leishmanioses apresentam uma variedade de manifestações clínicas, incluindo: as Leishmanioses Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC) e Visceral (LV). Nas Américas, o conjunto LC e LMC é denominado Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (WHO, 2010).

Estima-se que de 0,7 a 1,2 milhões e 0,2 a 0,4 milhões de novos casos ocorram anualmente no mundo pela leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), respectivamente. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A leishmaniose tegumentar apresenta cerca de um terço dos casos de Leishmanioses nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, na Ásia ocidental e Ásia Central (ALVAR et al., 2012; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* (LAINSON; SHAW, 1987). As formas tegumentares são causadas pelas espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* e as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L.(V.) lindenberg* e *shawi*, foram identificadas posteriormente em estados das regiões Norte e Nordeste (MARZOCHI, 1992; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Em relação aos métodos de diagnóstico utilizados atualmente para as Leishmanioses, uma das grandes dificuldades enfrentadas pelos pesquisadores tem sido a escolha da preparação antigênica ideal para análise sorológica, tanto no que se refere ao estudo dos mecanismos moduladores e/ou indutores da doença, bem como para o diagnóstico, prognóstico e monitoração da infecção (ROCHA et al., 2002; ROCHA et al., 2006; SAKKAS et al., 2016). Devido a essas limitações, sobretudo das técnicas de Imunofluorescência Indireta e ELISA, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo desenvolvidas. Uma delas é a citometria de fluxo, tecnologia que promove a análise quantitativa de anticorpos e que vem sendo utilizada no diagnóstico sorológico das Leishmanioses (GOMES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013; TEIXEIRA-CARALHO

et al, 2015). Nesse contexto, o presente trabalho fez uma descrição da literatura das ferramentas que são utilizadas no diagnóstico e comparou experimentalmente o desempenho da citometria de fluxo, ELISA e IFI em diagnosticar pacientes com LTA antes e após tratamento.

2 | DIAGNÓSTICO CLÍNICO DAS LEISHMANIOSES

A LTA apresenta dificuldades no seu diagnóstico devido ao aspecto das lesões se assemelharem ao de outras doenças, como: tuberculose cutânea, hanseníase virchowiana, infecções micóticas, úlcera tropical, sífilis, neoplasmas, e até mesmo alguns tipos de carcinomas e linfomas (PISSINATE et al., 2008). Ela pode se apresentar de 4 formas: A forma cutânea localizada, que possui lesões únicas ou em pequeno número, com bordas elevadas, sendo indolor e podendo assumir formas arredondadas ou ovais (REITHINGER et al., 2007); a forma disseminada, que apresenta lesões em partes do corpo que variam de dezenas a centenas, difere da forma anérgica, a cutânea difusa (LCD), onde lesões nodulares não ulceradas são encontradas por todo o corpo (BRASIL, 2007); por fim, a forma mucocutânea ocorre como resultado do desenvolvimento secundário da forma cutânea localizada através da cura espontânea ou de um tratamento inadequado. Ela é caracterizada pela destruição da cavidade oronasal, da faringe e laringe, podendo também atingir as conjuntivas oculares e as mucosas dos órgãos genitais e ânus, resultando de uma reação imunológica exacerbada. (BRASIL, 2007).

As lesões cutâneas da LTA podem se apresentar morfológicamente como: impetigóide, liquenóide, tuberculosa/lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide, o que dificulta ainda mais o diagnóstico clínico. Nas lesões mucocutâneas, podem ser observadas úlceras infiltrantes ou úlceras vegetantes (ANDRADE, 2005). Devido a essa grande diversidade de manifestações clínicas, o diagnóstico da LTA deve ser realizado através da associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O diagnóstico clínico pode ser feito com base na característica da lesão associada à anamnese, bem como através da avaliação dos dados epidemiológicos. Este diagnóstico pode ser complementado pela Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva e eventualmente pela resposta terapêutica. Todavia, os métodos laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico diferencial de outras doenças (BRASIL, 2007).

O diagnóstico da LV é complexo pois a maioria de suas características clínicas é compartilhada com outras doenças febris hepatoesplênicas que podem ser endêmicas na região. A apresentação clínica da LV envolve tipicamente febre a longo prazo, perda de peso, aumento do baço e fígado, pancitopenia e hipergamaglobulinemia policlonal (IgG e IgM). Além disso, a perda de leucócitos eventualmente torna os pacientes de LV imunossuprimidos e as infecções bacterianas são uma causa comum de morte

(KUMAR et al., 2012). A hipoalbuminemia observada na LV pode estar associada ao edema e a outras características de desnutrição. A função hepática pode ser normal ou alterada e em fases posteriores da doença, a produção de protrombina diminui. Com o tempo, a LV não tratada pode causar caquexia grave e hemorragia devido a trombocitopenia (WHO, 2010; BRASIL, 2014).

3 | DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEISHMANIOSES

3.1 . Diagnóstico parasitológico

Para a LTA, a pesquisa direta do parasito pode ser realizada em material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda da lesão. Essa técnica tem sensibilidade que varia entre 50 e 70% e depende do número de parasitos presentes na lâmina (GOTO; LINDOSO, 2010). No caso de LTA, a positividade do teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano.

Na LV, a sensibilidade varia de acordo com o local onde é realizada a coleta, sendo de 53% a 86% na medula óssea. Em locais como o baço, a sensibilidade é maior, variando entre 93% a 99% (WHO, 2010; GRIENSVEN; DIRO, 2012). Por serem procedimentos invasivos que podem causar complicações sérias, exigindo ambiente apropriado e profissionais treinados para a coleta e identificação do parasita, esse método torna-se de difícil implementação na rotina diagnóstica (FABER et al., 2003; MARQUES et al., 2006).

A visualização em microscópio óptico da forma amastigota de *Leishmania* é possível após coloração pelo método de *Giemsa* ou *Leishman* (GENARO; NEVES, 1998). O isolamento do parasita pode ser feito através da cultura em meios apropriados, a partir de material obtido por punção aspirativa ou biópsia das lesões dos pacientes. A sensibilidade do isolamento em cultura é geralmente baixa, em torno de 20 a 40%. Essa baixa sensibilidade está relacionada, em muitos casos, à escassez do parasita nas lesões, principalmente quando se trata da *L. (V.) braziliensis* (REITHINGER et al., 2007).

Para cultivo *in vivo* em animais susceptíveis, utiliza-se principalmente o hamster (*Mesocricetus auratus*). Devido ao longo período de acompanhamento até o desenvolvimento da doença e aos elevados custos para manutenção dos animais, o método se restringe às instituições de pesquisa científica (BENSOUSSAN, 2006; BRASIL, 2017).

3.2 . Diagnóstico molecular

A reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) é uma

técnica que permite a amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), pareados especificamente nas margens da região alvo, permitindo o seu uso como instrumento específico para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas (RODRIGUES et al., 2002). Diferentes sequências-alvo são utilizadas, como o espaçador transcrito interno ribossomal (ITS) (SCHÖNIAN et al., 2003), gene mini-exon (HARRIS et al., 1998), sequências repetitivas de DNA nuclear, gene da glucose-6-fosfato desidrogenase (CASTILHO et al., 2003), gene gp63 (MAURICIO et al., 2001), gene Hsp70 (FRAGA et al., 2010), gene do citocromo b (KATO et al., 2005) e sequências de RNA (DEBORGGRAEVE et al., 2008).

O ensaio de PCR baseado na amplificação do kDNA é provavelmente o mais sensível, pois este alvo está presente em cerca de 10.000 a 20.000 cópias por parasita com sequências de 500 a 2.500pb (NUZUM et al., 1995). O diagnóstico baseado em PCR tem como vantagens a rapidez na execução, a isenção de interpretação subjetiva e a capacidade de monitoramento terapêutico (NUNO MARQUES et al., 2007; ASSIS et al., 2008). Além disso, o uso da PCR em tempo real (qPCR) permite a quantificação da carga parasitária num tempo de ensaio reduzido e o acompanhamento pós terapêutico de pacientes para o diagnóstico das recidivas (WHO, 2010; REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

Embora a seja uma técnica altamente sensível e específica, há a necessidade de normalização e validação de ensaios de PCR e de diagnóstico para as comparações da sensibilidade e especificidade das diferentes abordagens sob condições de rotina (GRIENSVEN; DIRO, 2012). A PCR também é um teste sofisticado para uso na rotina laboratorial, pois necessita de exigências técnicas e custo elevado, limitando-se a laboratórios de referência e/ou clínica médica. Além disso, seu desempenho depende de algumas variáveis envolvidas como área endêmica, tipo de amostra, alvo utilizado para amplificação, método de extração do DNA, entre outros (RUITER et al., 2014).

3.3. Diagnóstico imunológico

O diagnóstico imunológico baseia-se na avaliação da resposta imune celular utilizando a técnica de Intradermoreação de Montenegro (IDRM) para LTA e/ou na avaliação da resposta imune humoral utilizando as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*- ELISA), teste de aglutinação direta (DAT) e na detecção de antígenos circulantes (KATEX).

3.2.1 .1. Detecção de antígenos

A detecção de antígeno em urina por meio da aglutinação em látex (KAtex) é considerada um método promissor no diagnóstico da LV. Esse antígeno é um carboidrato termoestável de baixo peso molecular (5–20 kD) que foi detectado em pacientes com LV (SARKARI et al., 2002). Esse antígeno pode ser detectado de 1 a 6 meses após o tratamento. Em um estudo realizado na Índia, o teste mostrou uma especificidade que varia de 79,1 a 94,1% e sensibilidade de

60,4 a 71,6% (BOELAERT et al., 2008). Apesar de ser uma técnica promissora, uma das limitações é que não é uma técnica quantitativa e há a necessidade de ajustes para a melhoria da sensibilidade e reprodutibilidade (BOELAERT et al, 2014).

3.3.2 Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

O principal teste imunológico utilizado para a LTA é a reação de Montenegro que revela a infecção por *Leishmania* mediante a resposta imune celular. O teste consiste na inoculação intradérmica de 0,1 ml do antígeno (*Leishmania*) na face anterior do antebraço. A leitura é realizada após 48 ou 72 horas e a enduração igual ou superior a 5 mm é considerada positiva. Habitualmente, a positividade é detectada após 4 meses do aparecimento das lesões (BRASIL, 2017).

O teste permanece positivo após a cura clínica por se tratar de uma resposta imune duradoura. Além disso, o teste cutâneo pode mostrar resultados falso-positivos entre indivíduos de áreas endêmicas devido à ocorrência de infecções subclínicas, infecções prévias e reação cruzada com outras doenças (ex: doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras). Este teste pode ser útil para o diagnóstico de viajantes que vivem em áreas não endêmicas (MASMOUDI et al., 2013). O teste de Montenegro não deve ser utilizado para fins de diagnóstico para LV, pois a doença ativa é caracterizada pela imunossupressão da resposta imune celular; portanto, o resultado é negativo (BRASIL, 2017).

3.3.3 Imunofluorescência indireta (IFI)

A reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) tem sido amplamente usada no diagnóstico das Leishmanioses e, atualmente, é disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde no Brasil (SUS) (BRASIL, 2017; ASSIS et al., 2012). Porém, podem ser observadas, frequentemente, reações cruzadas com outros organismos da família Trypanosomatidae, gerando resultados falso-positivos (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996; BRITO et al., 2009). Há também relatos de reatividade cruzada com soro de pacientes portadores de hanseníase e tuberculose (KAR, 1995). Além disso, ocorre grande variabilidade nos resultados de técnicas sorológicas que dependem da natureza do antígeno, principalmente pela forma como foram produzidos e purificados (TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003). A IFI é um procedimento laborioso, apresenta baixa especificidade e exige profissionais bem treinados para sua execução (SUNDAR; RAI, 2002; BRASIL, 2006). A sensibilidade e especificidade são de 88-92% e 81-92%, respectivamente para LV (BRASIL, 2014). A sensibilidade para pacientes com LCD costuma ser negativa, para LC é de 71% e para LM é de 100%. Como consequência dessa variação em relação a sensibilidade e também por causa da sua baixa especificidade, a IFI está sendo menos explorada na rotina do diagnóstico da LTA (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

3.3.4 Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-linked Immunosorbent Assay- ELISA)

A técnica de ELISA consiste em uma metodologia de realização simples, bastante utilizada nas investigações científicas, devido sua alta sensibilidade; porém, sua especificidade depende do antígeno utilizado. O antígeno bruto solúvel apresenta sensibilidade de 80 a 100% (PEDRAS et al., 2008; WHO, 2010). Resultados promissores para o diagnóstico de LTA e LV têm sido obtidos com o uso de antígenos recombinantes como k39, histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e proteínas de choque térmico (famílias 60, 70 e 83) (OLIVEIRA et al., 2011; SAKKAS et al., 2016).

3.3.5 Teste de Aglutinação Direta (DAT)

O Teste de Aglutinação Direta (DAT) é um dos testes mais simples e de baixo custo já desenvolvidos para o diagnóstico da LV. Neste teste, as formas promastigotas são tripsinizadas, fixadas com formalina e coradas com azul brilhante. O soro do paciente após diluições seriadas é incubado com o antígeno e a aglutinação é observada no dia seguinte (SUNDAR; RAI, 2002). Um estudo de meta-análise avaliando o desempenho do DAT em pacientes com LV apresentou estimativas de sensibilidade e especificidade de 94,8% (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Ainda assim, o teste apresenta problemas no controle de qualidade do antígeno, além da necessidade de refrigeração, falta de padronização da leitura e dificuldade de obtenção do antígeno comercial (GONTIJO; MELO, 2004; SUNDAR; RAI, 2002; ABASS et al, 2015).

3.3.6 Teste rápido imunocromatográfico rK39

A proteína recombinante rK39 é derivada de uma proteína semelhante à cinesina de parasitas pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, e tem sido usada durante as últimas duas décadas para o diagnóstico sorológico da LV. No caso da técnica de Imunocromatografia, o teste rápido, o antígeno rK39 é fixado em papel de nitrocelulose. Utiliza-se uma gota de soro ou de sangue e em cerca de 15 minutos é possível fazer a leitura do teste, portanto, é considerado uma ferramenta simples e aplicável em trabalhos de campo (PASSOS et al., 2005). O desempenho do teste foi avaliado em um estudo prospectivo no Brasil, apresentando cerca de 93% de sensibilidade e entre 89^a 97% de especificidade (ASSIS et al., 2012). Assim como outros testes sorológicos convencionais para LV, os pacientes podem ter anticorpos presentes por meses após a cura da doença e, também, podem ser detectados anticorpos no soro de pacientes assintomáticos (SRIVASTAVA et al., 2011). Resultados falso-negativos foram relatados e podem variar de acordo com a região geográfica (SUNDAR, RAI, 2002).

4 | O USO DA CITOMETRIA DE FLUXO COMO UMA FERRAMENTA SOROLÓGICA ALTERNATIVA AO DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

A citometria de fluxo (CF) é uma tecnologia que permite análise simultânea e multiparamétrica de células ou partículas em suspensão, avaliando-as individualmente. À medida que o fluxo passa por um ou mais feixes de luz (gerados por um ou mais lasers), o sistema óptico-eletrônico registra a forma como as estruturas dispersam a luz do laser incidente e captando as fluorescências emitidas. Assim, o equipamento obtém informações de diversos parâmetros, como tamanho relativo, complexidade interna e intensidades de fluorescência de cada célula ou partícula avaliada (SHAPIRO, 2003; DU et al., 2015).

Em vista disso, a CF surge como uma tecnologia extremamente versátil, associando funcionalidade e precisão. Desde os anos 80, a CF estendeu-se progressivamente da pesquisa básica aos laboratórios de diagnóstico clínico devido ao desenvolvimento da tecnologia de hibridoma e produção de anticorpos monoclonais, juntamente com a produção de uma ampla variedade de fluorocromos. Assim, ela permitiu a realização de diversas investigações laboratoriais que incluem biologia molecular, patologia e imunologia, com ampla aplicação na medicina, especialmente em transplantes, hematologia, avaliações do sistema imune, imunologia do tumor e quimioterapia (PILLAI; DORFMAN 2016; COZZOLINO et al., 2016). Essa ferramenta revolucionou o diagnóstico, uma vez que proporciona uma avaliação precisa de múltiplos processos biológicos. Em virtude da expansão do uso da CF, em 2006 foi criado um consórcio internacional, visando padronizar procedimentos e protocolos diagnósticos para leucemias e linfomas (KALINA et al., 2012). Além da investigação de doenças hematológicas com características de malignidade, bem como no desenvolvimento de fármacos, essa tecnologia é usada também na rotina dos Laboratórios Centrais (LACENs) de referência nacional, onde o acompanhamento de indivíduos com HIV/AIDS merecem destaque (MOLINARO et al., 2009; DU et al. 2015).

Atualmente, já existem trabalhos utilizando a citometria de fluxo como um método alternativo e auxiliar para o diagnóstico das Leishmanioses, possuindo vantagens sobre os métodos convencionais utilizados (OLIVEIRA et al., 2013; DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015). A CF permite a análise quantitativa dos anticorpos anti-*Leishmania* e o procedimento de marcação é simples, através da utilização de anticorpos conjugados diretamente a fluorocromos (OLIVEIRA et al., 2013; PEDRAL-SAMPAIO et al., 2016). As formas promastigotas são identificadas no citometro de fluxo com base em suas propriedades de espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) específicas. Em uma metodologia desenvolvida originalmente por Martins-Filho et al., (1995) para a Doença de Chagas e aplicada por Rocha et al (2002) para a LTA, os dados são expressos sob a forma de percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP).

O uso da citometria de fluxo também demonstra ser promissor no diagnóstico

sorológica da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) por apresentar elevada especificidade e sensibilidade, redução dos resultados falso-positivos em cães vacinados e menor reatividade cruzada contra outros patógenos caninos, além da distinção em cães assintomáticos e sintomáticos (ANDRADE et al., 2007; KER et al., 2013). Para a LV, CARVALHO NETA et al., (2006) estabeleceu a utilização da citometria de fluxo no diagnóstico pela detecção de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) infantum*, garantindo uma alta sensibilidade (99%) e especificidade (100%). Posteriormente, outros estudos aprimoraram a técnica utilizando a ferramenta como um critério de cura pós-terapêutico (LEMONS et al., 2007; GOMES et al., 2010). Também foi demonstrado que a quantificação das subclasses de IgG por ELISA ou citometria de fluxo levou a um aumento na acurácia dos testes para o diagnóstico da LTA. A quantificação de IgG1 e IgG3 parece ser uma boa metodologia para o acompanhamento de pacientes de LTA e LV tratados (SOUZA et al., 2005; GOMES et al 2010; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015).

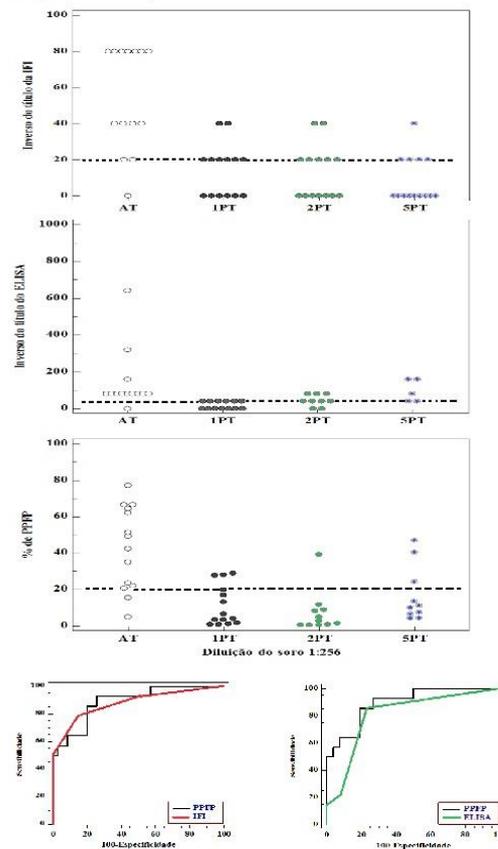
Além disso, quando comparada a outras técnicas, a CF permite a reatividade de anticorpos dirigidos contra antígenos de membrana do parasito, evitando reações com estruturas intracitoplasmáticas que são alvos frequentes de reação cruzada com outros tripanossomatídeos (ROCHA et al., 2006; PEREIRA et al., 2012).

Nas abordagens laboratoriais, a utilização dos parasitas vivos apresenta limitações importantes como alto risco de contaminação na rotina laboratorial e a grande dificuldade no cultivo dos parasitas *in vitro*. Sendo assim, foi demonstrado na CF que a utilização de parasitas fixados garante elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LTA (PISSINATE et al., 2008; PEREIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

O conhecimento adquirido com o desenvolvimento de ferramentas sorológicas baseadas em citometria de fluxo para os tripanossomatídeos permitiu o desenvolvimento de um TRIPLEX que possibilita a detecção diferencial de Leishmaniose Visceral, Leishmaniose Cutânea localizada e doença de Chagas e é baseado em um algoritmo para análise da reatividade de IgG1 anti-Trypanosomatidae. Essas doenças frequentemente apresentam reatividade cruzada nos testes sorológicos convencionais (TEIXEIRA-CARVALHO, 2015).

Em um ensaio preliminar comparamos os desempenhos da CF, ELISA e IFI em diagnosticar 14 pacientes com LTA antes, 1, 2 e 5 anos após o tratamento com Glucantime®. Para isso, o soro dos pacientes foi inativado e formas promastigotas foram obtidas para realizar os ensaios. Para o ensaio de IFI, os pacientes, que apresentaram títulos a partir da diluição 1:20, foram considerados positivos. Dos soros avaliados, 92,85% (13/14) foram positivos antes do tratamento (AT). Um ano após o tratamento (PT), 61,54% (8/13); dois anos PT, 70% (7/10) e cinco anos PT, 50% (5/10) (Figura 1A). Para o teste de ELISA, os pacientes que apresentaram títulos de soro a partir de 1:40 foram considerados positivos. Dos soros avaliados, 92,8% (13/14) dos pacientes AT foram positivos; pacientes um ano PT, 53,8% (7/13); pacientes dois anos

PT 88,8% (8/9) e pacientes cinco anos PT, 100% (5/5) (Figura 1B). Na CF, foi possível identificar 86% (12/14) de pacientes AT positivos; e 77% (10/13), 80% (8/10) e 70% (7/10) dos indivíduos, respectivamente, um, dois e cinco anos PT, negativos (Figura 1C). Comparando os desempenhos de IFI e CF através da curva ROC, observou-se que área sobre a curva (ASC) da IFI foi 0,879, tendo um desempenho menor que a citometria de fluxo (ASC=0,890), (Figura 1D). Já comparando os resultados de ELISA e CF, a ASC do ELISA, foi de 0,808, diferindo da CF (ASC=0,896), também mostrando um menor desempenho. (Figura 1D).



Diante dos resultados preliminares acredita-se que a citometria de fluxo se aplica ao diagnóstico da LTA, apresentando uma sensibilidade e especificidade superior quando comparada as técnicas de IFI e ELISA.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista as dificuldades inerentes das técnicas sorológicas utilizadas na rotina laboratorial para o diagnóstico das Leishmanioses, a utilização da citometria de fluxo na avaliação diagnóstica e pós-terapêutica surge da necessidade de pesquisas que possam dar suporte no diagnóstico, interpretação dos resultados e também auxiliar

na elaboração de um novo esquema terapêutico aplicável a esta situação, visto que decisão da interrupção do tratamento ainda depende de um critério essencialmente clínico. Caso validada essa técnica para o diagnóstico das Leishmanioses, existe a possibilidade de terceirizar os serviços pelo Sistema Único de Saúde (SUS) como já ocorre para o diagnóstico de vários tipos de câncer. Porém, para isso, é necessária qualificação de recursos humanos e investimento de capital para aquisição do equipamento e reagentes para os laboratórios que realizariam o serviço.

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**, v. 10, p. e0116408, 2015.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, p. 1-12, 2012

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ANDRADE, M. S. B., et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.

ANDRADE, R. A. DE et al. Clinical value of anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, n. 1-2, p. 85-97, 2007.

ASSIS, T.S. et al. Validation of the rapid immunochromatographic test it-leish, for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, n 2, p. 107-116, 2008.

ASSIS, T.S.M, et al. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.17(10), p. 1202-1207, 2012.

BOELAERT, M. et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 32-40, jan. 2008.

BOELAERT, M. et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 6, n. 6, p. CD009135, 2014.

BRASIL. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2.ed.** 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, p. 11, 2014.

BRASIL, M. DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, . 189, p.:il, 2017

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic

- area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, n. 10, p. 1278-1286, 2009.
- CARVALHO NETA, A.V. et al. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e zootecologia**, v. 58, n. 4, p. 480-488, 2006.
- CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 540-546, 2003.
- COZZOLINO I., et al. Lymph Node Fine-Needle Cytology of Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Classification by Flow Cytometry. **Acta Cytologica**, v.60,p.302-314, 2016.
- DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.
- DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **Am. J. Clin. Dermatol.**, Auckland, v. 16, n.2, p. 99-109, 2015.
- DEBORGGRAEVE, S. et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 198, p 1565-1572, 2008.
- DU, L. et al. The evolution of guidelines for the validation of flow cytometric methods. **The Official journal of the International Society for Laboratory Hematology**, v.37, p.3-10, 2015.
- FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p.238-245, 2010.
- GENARO, O.; NEVES, D. Leishmaniose tegumentar americana. **NEVES, DP Parasitologia Humana**, v. 10, p. 36-53, 1998.
- GOMES, I. T. et al. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, v. 360, n. 1-2, p. 76-83, 31 ago. 2010.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil, quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p.338-49, 2004.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.
- GRIENSVEN, J & DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n.2, p. 309-322, 2012.
- HARRIS, E. et al. Single-step multiplex PCR assay for characterization of new world *Leishmania* complexes. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n.7, p 1989-1995, 1998.
- KALINA T., et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**, v. 26,p. 1986-2010, 2012.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical reviews in microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-152,

1995.

KATO, H. et al. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v 72, p. 87–93, 2005.

KER, H. G. et al. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 20, n. 12, p. 1792–8, dez. 2013.

KUMAR R, NYLEN S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**. v.3, p.251, 2012.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press, London, v. 2, p. 1-116, 1979.

LEMOS, E.M; et al. Detection of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**. 14, 569. 2007.

MARQUES, M. J. et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 54, p.37–43, 2006.

MARTINS-FILHO, O. A. et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, n. 5, p. 569- 573, 1995.

MASMOUDI, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: Diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**, v. 7, n. 2, p. 31–41, 2013.

MAURICIO, I.L. et al. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, London, v 122, p.393–403, 2001

MOLINARO E. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

NUNO MARQUES, S, et al. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana - Na era da terapêutica anti-retrovirídica de alta eficácia. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 20, p.291-298, 2007.

NUZUM, E. et al. Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 171, p.751–754, 1995.

OLIVEIRA, A. P. 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. **Journal of Immunological Methods**, v. 387, n. 1-2, p. 245-53, Jan 31, 2013.

OLIVEIRA GG., 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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p.1025–1034, 2011.

PASSOS, S. et al. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical Diagnostic Laboratory and Immunology**, Washington, v.12, p.1164–1167, 2005.

PASSOS, V. et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 78, n. 8, p. 968-974, 2000.

PEDRAL-SAMPAIO G., et al. Detection of IgG Anti-*Leishmania* Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. *PLOSOne*, v.11, n.9, p. e0162793., 2016.

PEDRAS, M.J. et al. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 102, p. 172–178. 2008.

PEREIRA, V.R.A., et al. Evaluation of anti-live and anti-fixed- *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, New York, v. 74, p. 292-298, 2012.

PILLAI V ; DORFMAN D. M. Flow Cytometry of Nonhematopoietic Neoplasms. *Acta Cytologica*, v. 60, p.36–343, 2016.

PISSINATE, J. F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Journal of immunological methods*, v. 336, n. 2, p. 193-202, 2008.

REITHINGER R, DUJARDIN JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 45, n.1, p.21–25. 2007.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

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*, v. 35, n. 6, p. 551-562, 2002.

ROCHA, R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*, v. 11, n. 2, p. 156-166, 2006.

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

ROMERO GA, BOELAERT M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America- a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 4, p 584, 2010.

RUITER, C. M. et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Journal of clinical microbiology*, v. 52, n. 9, p.3147-3155., 2014.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human Visceral. *Journal of Vector Borne Disease*, Delhi, n. 53, p. 8–16, 2016.

SARKARI, B; CHANCE, M; HOMMEL M. Antigenuria in visceral leishmania- sis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta Tropica*, Basel, v. 82, p 339–48, 2002.

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, p.349–358, 2003.

SHAPIRO, H.M. *Practical Flow Cytometry*, 4ed. New York, 2003.

SOUZA, M. A. D. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 38, n. 2, p. 137-41, 2005.

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

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert review of molecular diagnostics*, v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. *PLoS one*, v. 10, n. 4, p. e0122938, 2015.

VEZENAT, A. D. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech [S.I.] Rep Ser*, Geneva, v. 949, p. 186, 2010.

YOUNG, D., DUNCAN, M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memories of American Entomological Institute [S.I.]*, n. 54, p. 1-88, 1994.