



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS
ESPÉCIES DE *Leishmania* spp. EM PACIENTES COM HIV/AIDS EM
PERNAMBUCO**

Aluna: Elis Dionisio da Silva
Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Co-orientadora: Maria Almerice Lopes da Silva

RECIFE

2015

ELIS DIONISIO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS
ESPÉCIES DE *Leishmania* spp. EM PACIENTES COM HIV/AIDS EM
PERNAMBUCO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientadora:

Prof. Dra. Maria Almerice Lopes da Silva

Departamento de Parasitologia, CPqAM/FIOCRUZ;

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ PERNAMBUCO.

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Elis Dionisio da
Identificação e caracterização molecular das espécies de *Leishmania*
spp. em pacientes com HIV/AIDS em Pernambuco/ Elis Dionisio da Silva –
Recife: O Autor, 2015.

78 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho

Coorientadora: Maria Almerice Lopes da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Biologia Aplicada à Saúde, 2015

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Infecção 2. *Leishmania* 3. AIDS (doença)- pacientes I. Carvalho,**
Luiz Bezerra de (orientador) II. Silva, Maria Almerice Lopes da
(coorientadora) III. Título

571.98

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-82

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Parecer da comissão examinadora da defesa da dissertação de mestrado de

ELIS DIONISIO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS
ESPÉCIES DE *Leishmania* spp. EM PACIENTES COM HIV/AIDS EM
PERNAMBUCO**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro,
considera a candidata **ELIS DIONISIO DA SILVA** como:

APROVADA

Recife, 23 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Orientador – Membro interno

Prof. Dr. Fábio Lopes de Melo
Membro externo

Prof. Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues
Membro externo

A Vovó Naide, minha mestra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial as minhas mães Rosa, Lia e Naide, meu pai David, meus irmãos Rodolpho e Naide, minhas tias Lili, Ângela e Dolores e à Giovani pelo amor incondicional e mais puro que existe, são meus exemplos de determinação, força, valores e fé. Obrigada por me ensinarem a ser o que sou hoje.

Aos meus amigos de colégio e de vida, em especial a Adson, Olívia, Folha, Nathália, e Felipe pelas pessoas admiráveis que são, por todo conhecimento e momentos incríveis compartilhados, pelo privilégio de tê-los sempre por perto e me suportarem com todas as minha chatices.

A João Lucas por todo o amor e compreensão, e por estar ao meu lado mesmo a quilômetros de distância.

Ao meu orientador, Luiz Carvalho, por todo acolhimento e confiança, e pelo privilégio de tê-lo como orientador.

A minha co-orientadora, Maria Almerice, pelo onipresente apoio, por todos os conselhos, e sua inabalável fé que, sem dúvida, me fazem uma pessoa mais forte.

À Zulma Medeiros, Fábio Melo e Luiz Dias por todo incentivo e confiança, sendo exemplos de pesquisadores, sabedoria, respeito, compreensão e amizade. Por acreditarem na minha capacidade, muitas vezes até mais do que eu mesma.

Aos meus colegas de laboratório: Cynthia, Leandro, Walter, Gabi, Juliana, Rhaíssa, Mariana, Diego e Betânia por toda ajuda, pelos momentos compartilhados durante todo esse processo e pelas amizades conquistadas.

Aos pacientes dos Hospitais Correia Picano, Osvaldo Cruz e das Clínicas, pela disponibilidade e resignação, que me fizeram ter uma dimensão do quão desafiante é trabalhar em prol da sociedade.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, FACEPE – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz, LIKA-Laboratório de Imonopatologia Keizo Asami, instituições financiadoras e onde desenvolvi minhas atividades como bolsista de mestrado, onde tive todo o aparato necessário.

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 me engrandeceram de alguma forma.

RESUMO

A coinfeção *Leishmania* - HIV/aids é considerada uma doença emergente, devido à sobreposição geográfica das duas infecções em várias regiões no mundo. Tem sido observado em pacientes coinfectados uma diversidade clínica importante, pobre eficácia aos tratamentos leishmanicidas convencionais, além da dificuldade de um diagnóstico preciso. O objetivo desse estudo foi avaliar o uso da PCR-RFLP para identificação das espécies de *Leishmania* em pacientes com HIV/aids, fornecendo dados que auxiliem na correta abordagem clínico terapêutica. Participaram do estudo pacientes com HIV/aids internados em três Hospitais de Referência para HIV/aids da Região Metropolitana do Recife - PE no período de junho/2013 a dezembro/2014 que assinaram o TCLE; 5 mL de sangue periférico foram coletados para a pesquisa de DNA. A amplificação desse DNA foi realizada pela PCR, que teve como alvo a região ITS-1, utilizando os primers LITSR e L5.8S. A identificação das espécies, nos casos de coinfeção, foi realizada nos produtos amplificados pelo ITS-1PCR por análise do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) e confirmadas por sequenciamento e alinhamento no GenBank. Foi encontrado em 21 pacientes DNA de *Leishmania*, utilizando a PCR - ITS1. Desses 66,% eram do sexo masculino, com faixa etária predominante de 25 à 39 anos e 80,9% provenientes de áreas urbanas. A identificação das espécies, nos casos de coinfeção pela PCR- RFLP identificou a espécie *L.infantum* em 15 (71,4%) dos pacientes e o sequenciamento dos amplicons indentificou em 17 (80,9%) a mesma espécie. Esse estudo sugere que a análise por RFLP do alvo ITS-1 da *Leishmania* spp. possa auxiliar no diagnóstico e na abordagem clínico-terapêutica dos casos de coinfeção *Leishmania* - HIV/aids, visto que na coinfeção, a leishmaniose pode não se apresentar na sua forma clássica. A RFLP-PCR destaca-se por ser mais simples e de baixo custo, comparada às técnicas de escolha, como eletroforese de isoenzimas e tipagem de microssatélites multilocus. A confirmação dos seus resultados pela análise de sequenciamento e alinhamento indica que a RFLP-PCR é uma técnica segura para identificar *L. infantum* em pacientes com HIV/aids. O uso da PCR-RFLP na rotina nos serviços de saúde pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de prevenção, controle e na assistência médica prestada aos pacientes coinfectados.

Palavras chaves: Leishmanioses, Coinfeção, HIV, Aids, PCR, RFLP.

ABSTRACT

Leishmania - HIV/AIDS coinfection is considered an emerging disease, due to the geographical overlap of the two infections in several regions in the world. It has been observed in patients coinfecting an important clinical diversity, poor efficacy to conventional treatments antileishmanial, besides the difficulty of accurate diagnosis. The aim of this study was to evaluate the use of PCR-RFLP for identification of *Leishmania* species in patients with HIV / AIDS, providing data to assist in the correct clinical therapeutic approach. The study enrolled patients with HIV / AIDS admitted to three referral hospitals for HIV / AIDS in the Metropolitan Region of Recife - PE from June / 2013 to December / 2014 signed the informed consent form; 5 mL of peripheral blood were collected for the detection of DNA. Amplification of DNA was performed by PCR that targeted the ITS-1 region using the LITSR and L5.8S primers. The identification of species in cases of coinfection, the amplified products was performed by ITS1-PCR by analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and confirmed by sequencing and alignment of the sequences in GenBank. It was found in 21 patients *Leishmania* DNA using ITS1-PCR. Of these 66% were male, with predominant age range 25 to 39 years and 80.9% in urban regions. Species identification in cases of co-infection by PCR-RFLP identified *L.infantum* species in 15 (71.4%) patients and the sequencing of amplicons identified in 17 (80.9%) the same species. This study suggests that RFLP analysis of the ITS-1 target of *Leishmania* spp. may assist in the diagnosis and clinical and therapeutic approach of cases of coinfection *Leishmania* - HIV / AIDS, whereas in coinfection, leishmaniasis can not stand in your way classic. The RFLP-PCR stands out due to its simplicity and low cost, compared to the choice of techniques such as electrophoresis of isoenzymes and microsatellite multilocus typing. Confirmation of results by sequence analysis and alignment indicates that the RFLP-PCR is a safe technique to identify *L. infantum* in patients with HIV / AIDS. The use of PCR-RFLP in the routine of health services can assist in developing strategies for prevention and control and medical assistance to co-infected patients.

Key words: Leishmaniasis, Coinfection, Diagnostic, HIV, AIDS, PCR, RFLP.

LISTA DE FIGURAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Figura 1:	Prevalência global de pessoas vivendo com HIV	18
Figura 2:	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	20
Figura 3:	Áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral no mundo.....	21
Figura 4:	Áreas endêmicas para Leishmaniose Tegumentar no mundo.....	22
Figura 5:	Países endêmicos para leishmanioses e com coinfecção <i>Leishmania</i> -HIV	24

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

Figure 1:	Electrophoresis on 2% agarose gel of ITS-1 region (350pb) from <i>Leishmania</i> spp. M: 100pb molecular weight ladder (invitrogen). Lanes 1-15: Clinical samples, Lane 16: Negative Control, Lane 17: Reference strain of <i>L. Infantum</i> : MHOM/BR/1974/PP75.....	58
Figure 2:	RFLP banding patterns analyzed on 3% agarose gel. Lanes 1-7: Characterization of <i>Leishmania</i> species in clinical samples. Lane 8: Reference strain of <i>L. Infantum</i> : MHOM/BR/1974/PP75.....	60
Figure 3:	Multiple alignment of nucleotide sequences of ITS-1 region and compared to the reference sequence of <i>L. Infantum</i>	61

LISTA DE TABELAS (ARTIGO)

Table 1:	Age distribution of HIV-infected patients.....	58
Table 2:	Age distribution of <i>Leishmania</i> -HIV/AIDS co-infected patients.....	58
Table 3:	Clinical data of <i>Leishmania</i> -HIV/AIDS coinfectd patients.....	59
Table 4:	Laboratorial data of <i>Leishmania</i> -HIV/AIDS co-infected patients.....	59
Table 5:	Results of PCR-RLP-ITS1 and sequencing in <i>Leishmania</i> -HIV/AIDS coinfectd patients	60
Table 6:	Comparison between PCR-RFLP and sequencing on 21 samples of patients with <i>Leishmania</i> -HIV/AIDS coinfectd.....	60

LISTA DE ABREVIACÕES/ SIGLAS

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Anti-retroviral
DAT	Direct Agglutination Test – Teste de Aglutinação Direta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HAART	Terapia Antiretroviral Altamente Ativa
HSP70	Heat Shock Protein 70
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ITS	Internal Transcribed Spacer – Espaçador Transcrito Interno
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
LAMP	loop-mediated isothermal amplification – Amplificação Isotérmica mediada por Loop
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MLEE	Eletroforese de enzimas Multilocus
MLMT	Tipagem de microsatélites multilocus
MLST	Multilocus Sequence Typing - Tipagem de sequencias multilocus
NNN	Novy-McNeal-Nicolle
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase
PKDL	Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis – Leishmaniose Dérmica Pós Calzar
rDNA	DNA ribossomal

RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SINAN	Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SUS	Sistema Único de Saúde
WHO	World Health Organization - Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2. 1 Histórico, tendências epidemiológicas e situação atual.....	17
2.1.1 HIV/aids.....	17
2.1.2 Leishmanioses	18
2.1.3 A Coinfecção <i>Leishmania</i> -HIV	23
2.3 Apresentações Clínicas das Leishmanioses na Coinfecção <i>Leishmania</i> -HIV/aids.....	24
2.3.1 Leishmaniose tegumentar – LT	25
2.3.2 Leishmaniose visceral – LV	25
2.4 Diagnóstico laboratorial de <i>Leishmania</i> spp. em indivíduos com HIV/aids.....	26
2.4.1 Diagnóstico parasitológico	27
2.4.2 Diagnóstico sorológico	28
2.4.3 Detecção de antígenos.....	30
2.4.4 Diagnóstico molecular	31
2.5 Identificação e caracterização de espécies de <i>Leishmania</i> spp	33
3. REFERÊNCIAS	36
4. OBJETIVOS	52
4.1 Objetivo geral.....	52
4.2 Objetivos específicos.....	52
5.ARTIGO:.....	53
6.CONCLUSÕES.....	70

7. PERSPECTIVAS.....	71
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	72
APÊNDICE B - Questionário Clínico-Epidemiológico.....	74
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	
CPqAM/FIOCRUZ/PE.....	78

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são endêmicas em 98 países no mundo e mais de 350 milhões de pessoas estão em risco de infecção (ALVAR et al, 2012). Existem ao menos 20 espécies de *Leishmania* no mundo patogênicas ao homem, caracterizando um quadro clínico tegumentar ou visceral, representados pela Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Visceral (LV) (PEARSON, 1996).

No Brasil, as leishmanioses representam um grave problema de saúde pública, a prevalência da LV predominante na parte nordeste do país (MAIA-ELKHOURY et al, 2008). Em relação a LC no Brasil, que denomina-se Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), é considerado o país com maior número de casos notificados na América do Sul, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco (BRASIL 2010).

Um dos principais fatores que dificulta a erradicação das leishmanioses em algumas regiões do mundo é associação com outras doenças como a aids, doença que apresenta caráter pandêmico e é considerada de alta gravidade (NUNO-MARQUES et al, 2007).

Desde meados da década de 1980, quando o primeiro caso de *Leishmania* / HIV foi relatado, a incidência de coinfecção tem aumentado e, no final da década de 90, havia sido confirmada em 35 países (WHO, 2010; LA LOMA et al, 1985) No Brasil, epicentro das leishmanioses na América, observa-se uma tendência do aumento da epidemia de HIV/aids nas pequenas cidades e nas zonas rurais do país e um aumento crescente de casos de LV e LTA em conglomerados urbanos. A associação entre essas doenças acarreta no aumento do número de casos de coinfecção no país (LUZ et al, 2001; RABELLO; ORSINI; DISCH, et al 2003).

Em geral, indivíduos coinfectados *Leishmania*-HIV/aids apresentam baixos níveis de linfócitos CD4+ que podem impedir uma recuperação imunológica completa, o que leva a taxas mais baixas de cura, maiores taxas de toxicidade a drogas, maiores taxas de letalidade da leishmaniose e recaídas que os pacientes imunocompetentes (ALVAR et al, 2002; PINTADO et al, 2001). O diagnóstico clínico-epidemiológico das leishmanioses é de difícil definição em coinfectados *Leishmania*-HIV/aids, devido à tendência de desenvolvimento de manifestações ectópicas, a presença de outras doenças oportunistas, e a coexistência de mais de um tipo de espécie de *Leishmania* spp. na região (COTA et al, 2012).

O diagnóstico laboratorial é tradicionalmente baseado nos resultados dos testes sorológicos, na demonstração direta de *Leishmania* spp. por exame microscópico e no

isolamento *in vitro*. O diagnóstico parasitológico, além de ser considerado um procedimento invasivo que pode acarretar complicações sérias ao paciente, exige-se ambiente apropriado e pessoal técnico treinado para a coleta e não permite a descrição entre espécies devido às semelhanças morfológicas (AVILES et al. 1999; SUNDAR, RAI 2002). Em coinfectados, os testes sorológicos tem valor limitado, devido a imunossupressão, além de não permitir a discriminação entre as espécies envolvidas (ALVAR et al, 1997).

A eletroforese de enzimas Multilocus (MLEE) (RIOUX, et al. 1990), é considerado o padrão ouro para a identificação de *Leishmania* spp., entretanto, é considerada uma técnica laboriosa, cara e demanda tempo, pois requer isolamento prévio e cultura dos parasitas (GRAÇA et al, 2012; SCHÖNIAN et al, 2003). Uma alternativa promissora é a utilização da técnica PCR que tem sido amplamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas e em estudos epidemiológicos, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade. Vários sistemas têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras biológicas e muitas sequências-alvo (genes do rRNA, minicirculos do kDNA, gp63 e Hsp70) já foram identificadas (SILVA et al, 2010), como também um grande número de primers desenhados (ARORA et al, 2008; DEBORGGRAEVE et al, 2008; SCHALLING; OSKAM 2002).

A amplificação da subunidade interna do transcrito do rDNA (ITS) é um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* spp. do Velho Mundo e Novo Mundo (SCHÖNIAN et al. 2011). Além disso, a digestão dos produtos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com enzimas de restrição permite a identificação das espécies de *Leishmania*, permitindo, assim, a rápida caracterização direta do parasita (SCHÖNIAN, et al 2003; SCHÖNIAN, et al 2011).

Em indivíduos coinfectados, é possível observar diferenças relevantes na apresentação clínica, na sensibilidade e especificidade dos ensaios de diagnósticos e na resposta à terapêutica específica baseada nas espécies de *Leishmania* que causa a infecção. O uso de uma ferramenta como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)- (Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição) justifica-se por ser considerada uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, além da sua aplicabilidade na rotina do diagnóstico nos sistemas de saúde, permitindo a identificação de espécies de *Leishmania* spp., que é de extrema importância do ponto de vista epidemiológico por possibilitar o direcionamento de medidas mais exatas de controle da doença, além de favorecer o prognóstico e a prescrição adequada do tratamento aos pacientes, portanto acarretando uma melhoria na qualidade de vida dos mesmos. Além disso, a descoberta da associação de fatores genéticos intrínsecos às

espécies de *Leishmania* spp. que parasitam os coinfectados com HIV/aids e seu envolvimento clínico podem alicerçar novos mecanismos de controle na região.

2. REVISÃO DE LITERATURA

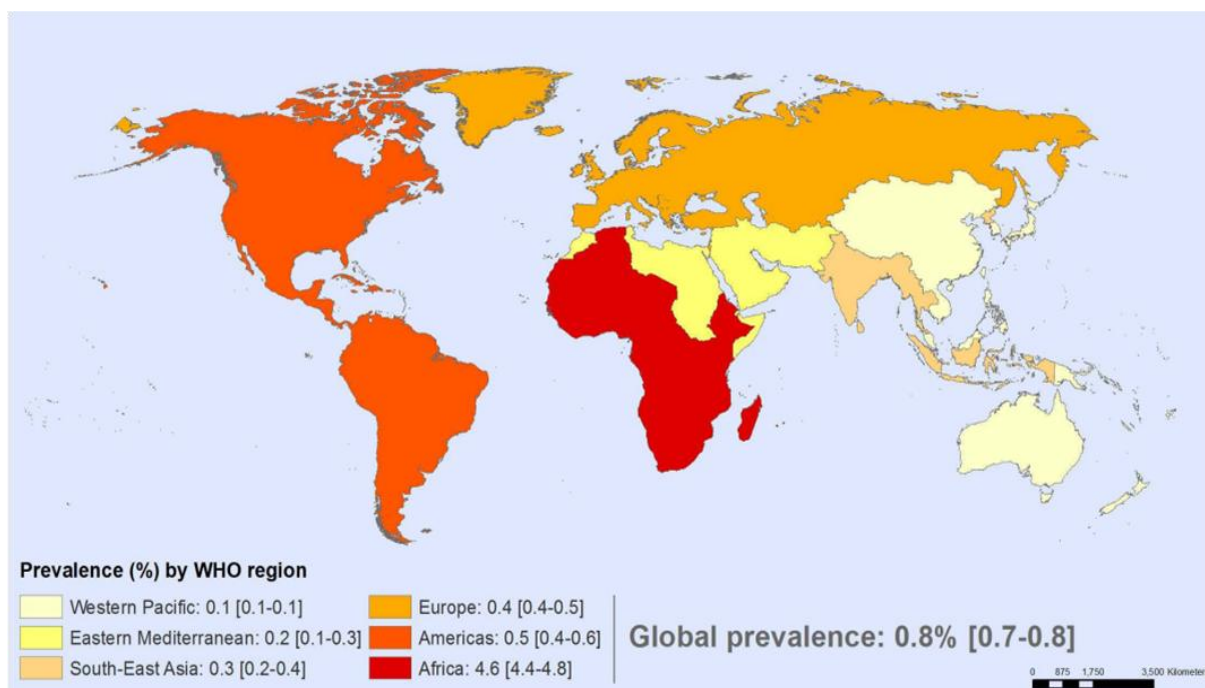
2. 1 Histórico, Tendências epidemiológicas e situação atual

2.1.1 HIV/aids

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) causador da Síndrome da imunodeficiência Adquirida (aids), representa um dos maiores problemas de saúde da atualidade, em função do seu caráter pandêmico e gravidade (MOSS, 2013). O HIV pode ser transmitido por via sexual (esperma e secreção vaginal); pelo sangue (via parenteral e vertical); e pelo leite materno. Os infectados pelo vírus evoluem para uma grave disfunção do sistema imunológico, à medida que vão sendo destruídos os linfócitos T CD4+, uma das principais células alvo do vírus. A contagem de linfócitos T CD4+ é um importante marcador dessa imunodeficiência, sendo utilizada tanto para estimar o prognóstico e avaliar a indicação de início de terapia antirretroviral, quanto para definição de casos de aids, com fins epidemiológicos (BRASIL, 2010).

Até o final de 2013, haviam 35 milhões de pessoas vivendo com HIV no mundo, 91% delas estavam localizadas na África subsaariana, 6% nos países asiáticos e no pacífico e 3% em outras regiões no mundo (GREENE, 2012; UNAIDS, 2013). (**Figura 1**). Após implementação da terapia antiretroviral houve um declínio de 38% de novas infecções em relação a 2001 e uma redução de aproximadamente 1,6 milhões de mortes em relação a 2005 (COHEN et al, 2011; UNAIDS, 2013). Houve avanços também em mulheres grávidas vivendo com HIV, no qual o uso de antiretrovirais (inibidores da transcriptase reversa, protease e integrase) evitou mais de 900. 000 novas infecções pelo HIV entre crianças desde 2009. Apesar de evidentes avanços nas últimas décadas, 22 milhões de pessoas vivendo com HIV no mundo, ainda não tem acesso a terapia antirretroviral, o que dificulta o controle da doença (MERSON et al, 2008; UNAIDS, 2013).

Figura 1: Prevalência global de pessoas vivendo com HIV



Fonte: WHO, 2012

Na América Latina até o final de 2013, 1,6 milhões de pessoas viviam com HIV, 75% dos casos estavam distribuídos entre cinco países: Argentina, Brasil, Colômbia, México e Venezuela (UNAIDS, 2013). Dentre esses, o Brasil se destaca por possuir o maior contingente de pessoas vivendo com HIV, com 39.185 casos notificados em 2012, uma média de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes (BRASIL, 2013). Nos últimos 10 anos, a taxa de detecção de HIV no Brasil sofreu uma elevação de cerca de 2%. Porém, observam-se diferenças significativas entre as cinco regiões. No período de 2003 a 2012, observou-se uma diminuição de 18,6% na taxa de detecção na região Sudeste e 0,3% na região Sul, enquanto nas demais regiões observou-se um aumento nessa taxa: 92,7% na região Norte, 62,6% no Nordeste e 6,0% no Centro-Oeste. Dentre os estados do Nordeste, Pernambuco lidera o ranking de casos notificados e apresenta taxa de detecção e mortalidade acima da média nacional: 20,9 casos detectados para cada 100.000 habitantes e 6,0 óbitos/100.000 hab, a média nacional é de 20,2/100.000 hab e 5,5 óbitos/100.000 hab, respectivamente (BRASIL, 2013).

2.1.2 Leishmanioses

As leishmanioses representam um complexo de doenças consideradas uma das mais negligenciadas doenças tropicais. Estima-se que mais de 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, com aproximadamente 2 milhões de novos casos a cada ano, e 350 milhões de pessoas vivem em risco de contrair a doença. As leishmanioses afetam as populações mais pobres, e estão distribuídas em 98 países (principalmente países em desenvolvimento) (ALVAR et al, 2012).

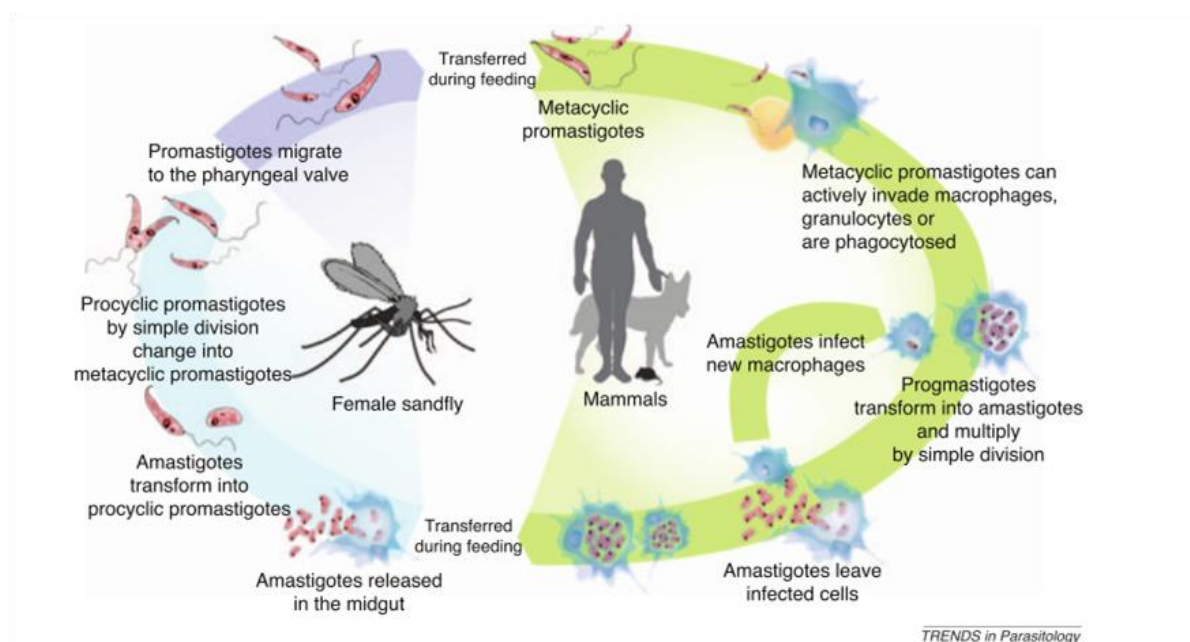
No ciclo natural, essa doença zoonótica é causada pelos protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, que circulam naturalmente entre animais silvestres. A doença é transmitida através dos insetos fêmeas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, que infectam reservatórios silvestres e domésticos, sendo o homem um hospedeiro acidental.

Várias espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas na transmissão da LTA no Brasil, ressaltando-se como principais transmissores *L. intermedia*, *L. migonei*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, e *L. flaviscutellata* (RANGEL; LAINSON, 2003). O encontro de infecção natural de *L. neivai* (PITA-PEREIRA et al., 2009) e *L. fischeri* (ROCHA et al., 2010), reforçaram a suspeita de participação destas espécies na veiculação de *Leishmania* (*V. braziliensis* e, conseqüentemente, da transmissão da LTA. No Brasil, os principais vetores são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (HERWALDT, 1999; MURRAY et al, 2005; WHO, 2010).

O ciclo de transmissão inicia quando após o repasto sanguíneo dos vetores, há a ingestão de células infectadas pelo parasita. No estômago do inseto, as formas amastigotas ingeridas transformam-se em promastigotas que sofrem um processo de divisão binária. Essas formas migram para o intestino, transformam-se em formas paramastigotas que se fixam na mucosa. Nessa região, se dividem e se transformam novamente em promastigotas, que migram para a faringe do inseto, onde se transformam em promastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes. Durante um novo repasto, essas formas são inoculadas no mamífero e são fagocitadas por células mononucleares fagocíticas, onde se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por divisão simples até ruptura da célula hospedeira. Fatores relacionados às espécies de parasitas e da resposta imune do hospedeiro determinarão um quadro sintomático, com o desenvolvimento da leishmaniose tegumentar ou visceral (**Figura 2**) (HARHAY, et al 2011; HAILU et al, 2005, ASHFORD 2000, MURRAY et al, 2005. GRIENSVEN, DIRO, 2012).

O ciclo, predominantemente silvestre e rural, já se encontra presente em grandes cidades, como resultado da adaptação de vetores e reservatórios ao ambiente urbano, processo este conhecido como a urbanização das leishmanioses no Novo Mundo (HARHAY, et al 2011).

Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: Harvey et al, 2011

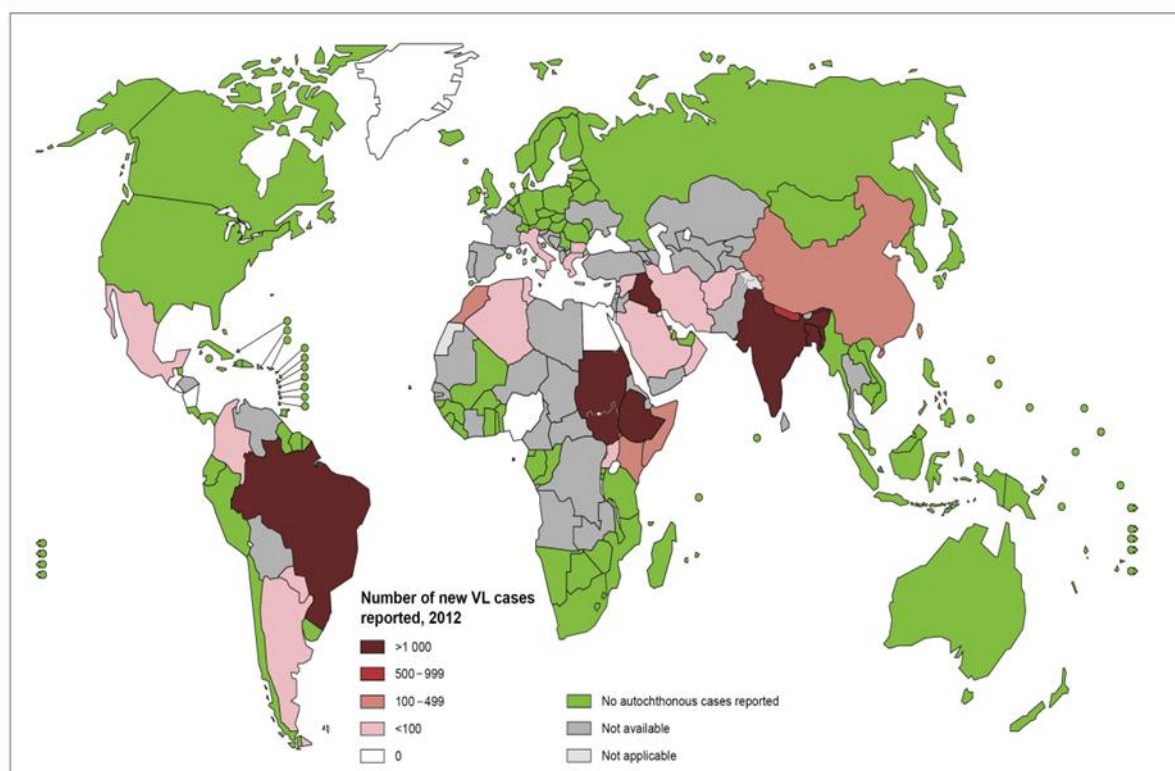
As leishmanioses apresentam uma variedade de manifestações clínicas, que inclui: a leishmaniose visceral (LV), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose disseminada (LD). Na América, o conjunto de LC, LMC e LCD é denominado leishmaniose tegumentar americana (LTA) (WHO, 2010). As leishmanioses são causadas por pelo menos 20 espécies do gênero *Leishmania* que são patogênicas ao homem (GRIENSVEN, DIRO, 2012; GOTO, LINDOSO 2012). O gênero *Leishmania* é subdividido nos subgêneros *Leishmania* (ROSS, 1903) e *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987). As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* desenvolvem-se na porção média e anterior do intestino (seção Suprpylaria) de insetos hematófagos da subfamília *Phlebotominae*, já as espécies do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se tanto nas partes anterior e média, como também no intestino posterior, na região do piloro (seção Peripylaria) (LAINSON; SHAW, 1979). Essas espécies geralmente apresentam características

epidemiológicas e clínicas distintas e diferentes perfis genéticos e fenotípicos (BAÑULS, 2007).

A distribuição geográfica das leishmanioses é subdividida no “Novo Mundo” (As Américas) e “Velho Mundo” (África, Ásia, Europa). As espécies do subgênero *Viannia* estão presentes apenas no Novo Mundo, enquanto que as espécies do subgênero *Leishmania* estão presentes tanto no Novo Mundo quanto no Velho Mundo (WHO, 2010; SCHÖNIAN et al 2011).

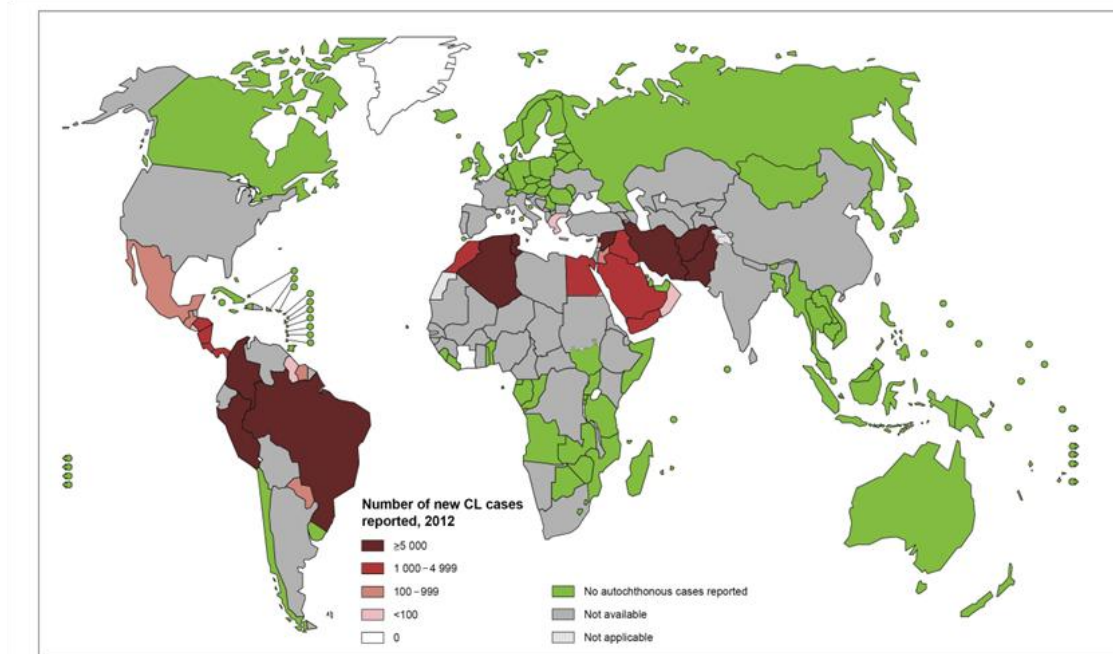
Estima-se que de 0,2 a 0,4 milhões e 0, 7 a 1.2 milhões de novos casos ocorram anualmente no mundo pela leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), respectivamente. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (**Figura 3**). A leishmaniose tegumentar apresenta cerca de um terço dos casos de leishmanioses nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e na Ásia ocidental e Ásia Central (WHO, 2010; ALVAR et al, 2012) (**Figura 4**).

Figura 3: Áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral no mundo.



Fonte: WHO, 2012

Figura 4: Áreas endêmicas para Leishmaniose Tegumentar no mundo.



Fonte: WHO, 2012

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (LAINSON, SHAW, 1987). Enquanto que as formas tegumentares caracterizam-se por uma diversidade de apresentações clínicas e de espécie. As principais espécies que causam a leishmaniose tegumentar são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L.(V.) lindenberg* e *shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (MARZOCHI, 1992; SHAW, LAINSON 1987; YOUNG; DUNCAN 1994).

No período de 1988 a 2009, a LTA apresentou média anual de 27.093 casos registrados e coeficiente médio de detecção de 16,0 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2013). Ao longo desse período, observou-se uma tendência ao crescimento da endemia no Brasil. São observados picos de transmissão da LTA a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos a partir de 1985 e uma expressiva expansão geográfica (ALVAR et al, 2012;BRASIL, 2013).

Em relação a leishmaniose visceral, no período de 2001 a 2011, foram notificados 37.503 casos (COTA et al., 2014), a média anual de casos foi de 3.349 e a incidência de 1,97

casos por 100 mil habitantes. Atualmente a LV está distribuída em 22 unidades federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras. Na última década a doença vem se expandindo para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, sendo que, ainda há um predomínio de casos na região Nordeste (HARHAY et al 2011; ALVAR et al, 2012)

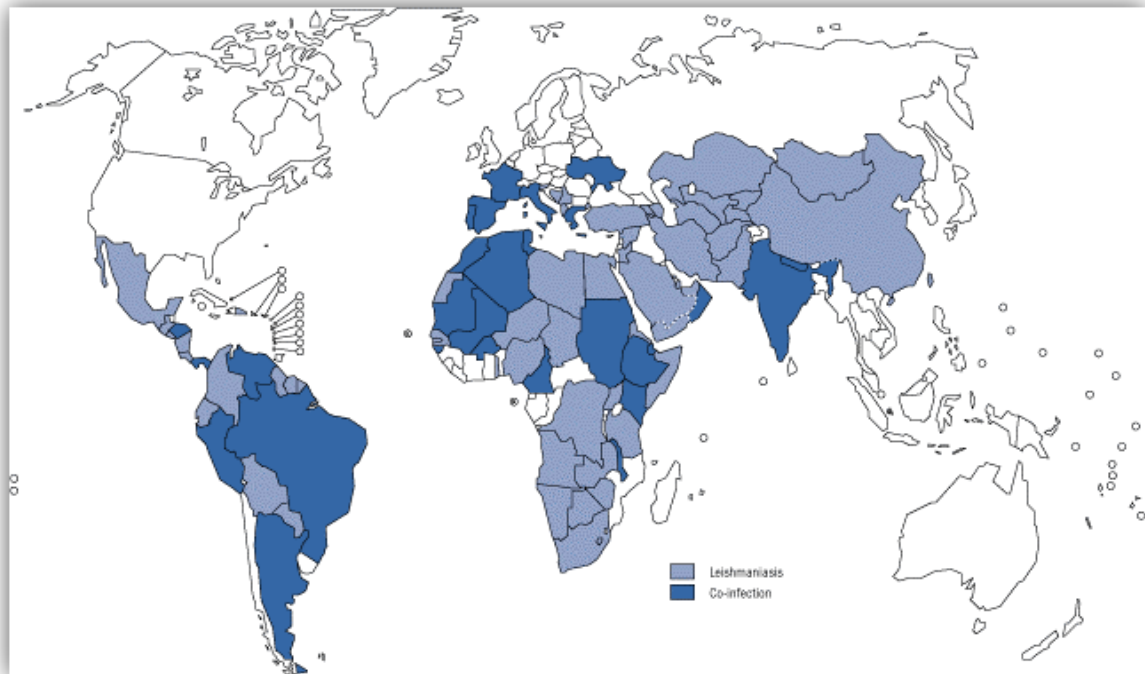
Dentre os estados do nordeste, Pernambuco é considerado endêmico para LTA, com 4.855 casos registrados no período de 2001 a 2010, e uma média de 485 casos por ano e esses casos são associados exclusivamente a *L. (V.) braziliensis* (ANDRADE et al., 2005; BRANDÃO FILHO, 2001; BRITO et al., 2012) . Em relação a LV, de 1990 a 2001, foram notificados 1.737 casos, concentrados principalmente nos municípios do Agreste e Sertão Pernambucano. É uma doença de caráter de expansão geográfica no estado devido, principalmente ao baixo impacto das medidas de controle (DANTAS-TORRES, 2006).

2.1.3 A Coinfecção *Leishmania*-HIV

O primeiro caso da associação de *Leishmania* spp. com o HIV foi descrito em 1985 no sul da Europa (LA LOMA et al, 1985). Posteriormente, o número de casos notificados aumentou rapidamente em várias partes do mundo e, aproximadamente, 35 países tem relatado casos de coinfecção envolvendo principalmente a LV (WHO, 2007; ALVAR et al, 2008) (**Figura 5**).

Após a introdução da terapia antiretroviral para o tratamento do HIV, houve uma redução do número de casos de coinfectados por *Leishmania* spp. relatados em países europeus. No entanto, por causa do aumento da sobreposição das duas doenças, a coinfecção se espalhou para os países que são grandes focos de leishmanioses no mundo. A situação é particularmente preocupante no sudoeste da Europa, no sul da Ásia, na África Subsaariana e na América do Sul, em que o Brasil surge como o país que mais requer atenção devido ao grande número de casos das duas infecções (LÓPEZ-VÉLEZ, 2003; ALVAR et al, 2008; BRASIL, 2011).

Figura 5: Países endêmicos para Leishmanioses e com coinfecção *Leishmania*-HIV.



Fonte: WHO, 2007.

Após relacionamento dos bancos de dados de notificação de leishmanioses e aids no período de 2001 a 2005, foi possível identificar 176 casos de coinfecção LV-HIV/aids e 150 casos com coinfecção LT-HIV/aids, que representa 1,1% dos casos de LV e 0,1% dos casos de LT, o que evidencia a necessidade e aprimoramento da vigilância desta coinfecção no Brasil (BRASIL, 2011). Estudos com base em dados nacionais reforçam que o aumento do número de casos de coinfectados *Leishmania*-HIV/aids é favorecida pela sobreposição geográfica das regiões que albergam estas infecções, evidenciado por focos urbanos e periurbanos (COTA, 2014; LIMA et al, 2013; NASCIMENTO et al, 2011; CARRANZA-TAMAYO, 2009). Segundo banco de dados do sistema nacional de notificação, 38,1% de todos os pacientes brasileiros LV-HIV/aids coinfectados entre 2007 e 2008 foram registrados no Nordeste, 38,1% no Sudeste, e 16,2% no Centro-Oeste (SOUSA-GOMES et al, 2011).

2.3 Apresentações Clínicas das Leishmanioses na Coinfecção *Leishmania*-HIV/aids

2.3.1 Leishmaniose tegumentar – LT

O primeiro caso de coinfecção LT-HIV/aids no Brasil foi publicado por Coura et al, 1987 e após isso poucos relatos foram publicados de pacientes com HIV associados a leishmaniose tegumentar (MACHADO et al, 1992; DA-CRUZ et al, 1999). As manifestações clínicas da LT são caracterizadas pelo comprometimento cutâneo e/ou de mucosa. Nos pacientes com coinfecção LT-HIV/aids as lesões encontradas são semelhantes às observadas nos imunocompetentes (BRASIL, 2011; LINDOSO et al, 2009; MATTOS et al, 1998; COUPPIE et al, 2004).

O espectro das lesões cutâneas é variado, de pápulas a úlceras, podendo haver lesões únicas ou múltiplas, sendo que as mais comuns são úlceras. Entretanto, lesões atípicas caracterizadas por máculas ou pápulas disseminadas podem ser encontradas e associadas com leishmaniose visceral, semelhante à Leishmaniose Dérmica Pós Calazar (PKDL, do inglês Post-kala-azar dermal leishmaniasis). Frequente na Índia e Sudão, a PKDL pode ocorrer de 6 a 20% dos casos LV, no período de seis meses a cinco anos após aparente cura terapêutica, e é caracterizada por múltiplas máculas hipocrômicas, pápulas eritematosas e nódulos (BRASIL, 2011, SILVA et al, 2013, BITTENCOURT et al, 2002).

Em pacientes coinfectados que apresentam imunossupressão severa, em geral com níveis de células T CD4 abaixo de 200 cel/mm³, é frequente modificações das características clínicas clássicas da doença com o aparecimento de placas infiltradas ou eritematosas, úlceras extensas em locais não usuais, tais como os lábios e áreas genitais (COUPPIE et al, 2004; LINDOSO et al, 2009; SANTOS-OLIVEIRA et al, 2011).

2.3.2 Leishmaniose visceral – LV

Em pacientes imunossuprimidos, o quadro clínico da LV é ainda menos específico e pode ser mascarado por outras infecções oportunistas (ALVAR et al, 1997). Salvo a frequência considerável dos casos assintomáticos e subclínicos, em pacientes sintomáticos, a tríade clássica (hepatoesplenomegalia, febre e pancitopenia) da LV é também a manifestação mais comum da coinfecção. A hepatoesplenomegalia, anemia e pancitopenia são observadas em 75% dos casos relatadas. A febre ocorre em 80 a 87%, adenopatia em 12 a 57%, astenia e emagrecimento, leucopenia (média de 2.300/ml) em 56 a 95% e plaquetopenia em 52 a 93% (BRASIL, 2011, 2014; PINTADO et al, 2001; PAREDES et al, 2003; SOUSA-GOMES et al, 2011, MEDRANO et al, 1992).

As manifestações pouco usuais ocorrem em aproximadamente 10% a 16% dos casos devido, principalmente ao quadro de imunossupressão do indivíduo (ALVAR et al, 1997; 2008). Achados ectópicos podem ser observados nos pacientes coinfectados, como o encontro de *Leishmania* spp. em pele íntegra e sobrepondo lesão de sarcoma de Kaposi ou em lesões de herpes simplex e herpes zoster (ROSENTHAL et al, 2000; RUSSO et al, 2003). Pode ainda haver acometimento do trato gastrointestinal (BRASIL, 2011; LAGUNA et al, 1994; DATRY et al. 1990; BAILEY et al, 1994, CORTES et al, 1997) e do trato respiratório (BRASIL, 2011; GRANT et al, 1994; MUNOZ et al. 1997) cutâneo e mucocutâneo (PINTADO et al, 2001; GRASA et al, 2000; CARNAÚBA et al., 2009; ROSELINO et al, 2008; ORSINI et al, 2002), além de renal (NUNO MARQUES et al., 2007; PAREDES et al, 2003).

2.4 Diagnóstico laboratorial de *Leishmania* spp. em indivíduos com HIV/aids

Acredita-se que o número real de casos de coinfecção seja subestimado devido a dificuldades no diagnóstico, deste modo, no reconhecimento da infecção por HIV, da leishmaniose ou de ambos, nos países em desenvolvimento (EZRA; OCHOA; CRAFT 2010; NUNO MARQUES et al., 2007). As elevadas taxas de falha terapêutica, recidivas, alta parasitemia, presença de outras infecções oportunistas e manifestações atípicas da doença dificultam o diagnóstico clínico em indivíduos com HIV/aids (CRUZ et al, 2006, WHO, 2010). Portanto, a identificação das leishmanioses pelo diagnóstico laboratorial é de extrema relevância, a fim de que o detecção precoce possa reduzir a morbidade e letalidade desta coinfecção. O atraso no tratamento adequado pode acarretar um aumento da letalidade em até 90% (BRASIL, 2006; CARRANZA-TAMAYO et al, 2009).

Em relação ao diagnóstico da leishmaniose tegumentar em indivíduos com HIV/aids, os estudos publicados até o momentos restringem-se a relatos de casos e revisões e ainda não há um consenso em relação critério de definição desses casos de coinfecção LT e HIV/aids (CHAUDHARY et al, 2008; YUSUF et al, 2010; SAMPAIO et al, 2002; MEHTA et al, 2009; MATTOS et al, 1998; KRUCHTEN et al, 2014).

Em relação ao diagnóstico de LV em indivíduos com HIV/aids, segundo o Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento de Pacientes com a coinfecção *Leishmania* LV HIV/aids do Ministerio da Saúde em 2011, a definição do caso de coinfecção LV HIV/Aids consiste no diagnóstico sorológico confirmado pelo HIV ou que preencha critérios de definição de caso de aids, e que apresente resultado positivo para LV por um ou mais dos seguintes métodos diagnósticos: pesquisa direta (aspirado de medula óssea, aspirado esplênico, sangue periférico ou qualquer tecido ou secreção obtidos para

diagnóstico), cultura, PCR e sorologia. E como a coinfeção é uma entidade clínica pouco conhecida, recomenda-se em todos os casos a realização de todos os exames de diagnóstico parasitológicos disponíveis (BRASIL, 2011).

2.4.1 Diagnóstico parasitológico

O isolamento do agente etiológico é considerado o exame de primeira escolha, que consiste na visualização das formas amastigotas por microscopia e a especificidade é alta. Para LV geralmente é realizado em aspirado de medula óssea tendo sensibilidade entre 53% a 86%. A pesquisa de *Leishmania* spp. pode ser realizada em outros órgãos com sensibilidades variadas: baço (93%–99%) e gânglio linfático (52%–58%) (WHO, 2010; GRIENSVEN; DIRO, 2012). Em coinfectados, o aspirado a partir da medula óssea tem sido frequentemente utilizado para o diagnóstico, com sensibilidade variando de 67% a 97% (DEREURE et al, 1995; PINTADO et al, 2001). 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, 2011). No caso da LT o diagnóstico parasitológico é realizado a partir da escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa de borda da lesão ulcerada (BRASIL, 2013).

Alguns fatores podem influenciar na sensibilidade do teste, como por exemplo: número reduzido de *Leishmania* spp., material hemodiluído devido uma coleta inadequada ou uso de antimoniais para o tratamento de micoses ou pneumocitoses (CRUZ et al, 2006). Além disso, são procedimentos invasivos que podem causar complicações sérias, exigindo ambiente apropriado e pessoal técnico treinado para a coleta e identificação do parasita (SUNDAR; RAI, 2002; FABER et al, 2003; SINGH, 2003; MARQUES et al, 2006).

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, 2011; WHO, 2010). Porém, é uma técnica que demanda tempo, pois a duração média do crescimento do protozoário pode variar entre 2 dias a 6 semanas. Em pacientes coinfectados LV-HIV/aids a cultura do aspirado da medula óssea pode apresentar uma sensibilidade de 50% a 100% (ALVAR, et al, 2007; PINTADO et al, 2001). A cultura de sangue periférico possibilita o uso de uma amostra menos invasiva, porém estudos encontraram uma baixa sensibilidade, que variou de 42,1% a 67% em coinfectados (LÓPEZ-VELEZ et al, 1995; 1998).

2.4.2 Diagnóstico sorológico

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*, *Mycobacterium tuberculosis* 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, pois há uma redução da resposta imune, ocasionando uma ausência de 40% na detecção de anticorpos anti-*leishmania* pelos testes (ALVAR et al, 1997; DIRO et al, 2014).

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, disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde no Brasil (SUS) (BRASIL, 2011). É o teste sorológico mais utilizado para investigação da LV na América do Sul, mesmo entre os infectados pelo HIV (COTA et al, 2012). Ela apresenta baixa especificidade, exige na sua execução pessoal bem treinado e é um procedimento laborioso (SUNDAR; RAI, 2002; BRASIL, 2006). A sensibilidade e especificidade são de 88-92% e 81-92%, respectivamente (BRASIL, 2006). Em pacientes coinfectados, relatos na literatura observaram uma sensibilidade de 11 a 67% (MEDRANO, et al 1998, MORENO et al, 2000).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido amplamente utilizado no diagnóstico da LV pela sua sensibilidade, considerada alta, mas sua especificidade depende do antígeno utilizado. O antígeno bruto solúvel, 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. chagasi*). Anticorpos anti-rK39 apresentam títulos diretamente correlacionados com a doença ativa, indicando um potencial uso na resposta à quimioterapia (SUNDAR 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, por ser um método que requer

equipamentos sofisticados e 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). Em coinfectados observa-se uma sensibilidade de 76 a 89%, utilizando o antígeno bruto solúvel (DENIAU, et al, 2003), e de 22 a 62% utilizando o antígeno rK39 (DENIAU et al, 2003; MEDRANO, et al 1998).

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 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). 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).

O DAT que utiliza antígeno liofilizado (FD-DAT) e o que utiliza antígeno produzido localmente foram comparados com três outros testes sorológicos (rK39 ELISA, ELISA-*L.chagasi* e IFI). Foi concluído que o FD-DAT foi o mais eficiente, com sensibilidade de 96,6% e especificidade de 98,1% (PEDRAS et al., 2008). 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). Uma sensibilidade de 95% em pacientes coinfectados LV/ HIV- aids foi observada na Etiópia (HAILU; BERH, 2002). Em estudo de meta análise foi observado que o DAT, dentre os testes sorológicos tradicionais, como a IFI e a ELISA-*L.chagasi*, apresentou um melhor desempenho em coinfectados, mas 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). O desempenho diagnóstico do teste foi avaliado em um estudo prospectivo, no Brasil, apresentando 93% de sensibilidade em 213 casos confirmados de LV e 97% de especificidade em 199 controles com suspeita clínica de LV, mas com confirmação de outras doenças (ASSIS et al., 2008). O desempenho desse tipo de teste em população de coinfecção LV/ HIV- aids poderá ser

inferior ao observado na população HIV negativos, no entanto, já foram adquiridos pelo Ministério da Saúde e devem ser utilizadas com o objetivo de acelerar o diagnóstico dos casos suspeitos sem deixar de insistir no diagnóstico de LV nos casos em que as fitas mostrem resultado negativo (BRASIL, 2011).

O diagnóstico sorológico para a Leishmaniose tegumentar tem valor limitado, uma vez que trata-se de uma doença que há uma maior indução da resposta imune celular. A IFI, ELISA, ainda não são utilizadas na rotina clínica. A IFI apresenta sensibilidade em torno de 70% em indivíduos com lesões ulceradas por *L.(V.) brasiliensis* e o ELISA é de aproximadamente 92%, o teste de Aglutinação Direta (DAT) em LTA por *L.aethiopica* apresentou sensibilidade de 90,5% e especificidade 91,8% (HAILU, 2002; RYAN et al, 2002).

O desempenho do diagnóstico sorológico para LTA em indivíduos com HIV/aids ainda não foi avaliado em estudos multicêntricos e com elevada amostragem, mas acredita-se que devido a imunossupressão limite ainda mais a utilização. Portanto a sorologia ainda não deve ser utilizado como critério isolado para o diagnóstico de LTA (VEGA-LÓPEZ et al, 2003; REITHINGER et al, 2007; BRASIL, 2013) . A reação de Montenegro é uma reação intradérmica de sensibilidade alta, que deve ser utilizada quando há a suspeita de LTA e o resultado positivo deve ser interpretado como indicador de exposição aos agentes do gênero *Leishmania*, entretanto um resultado negativo não deve ser utilizado para exclusão do diagnóstico. Em estudo realizado com indivíduos considerados coinfectados com LT-HIV/aids pelo diagnóstico parasitológico, a sorologia por IFI e ELISA apresentou positividade nos 10 dos 13 (77%) submetidos ao teste, enquanto que o teste de Montenegro apresentou positividade nos 3 dos 8 (37,5%) dos casos (LINDOSO et al, 2009).

2.4.3 Detecção de antígenos

A detecção de antígeno em urina por meio da aglutinação em látex (KAtex) é considerada um método promissor no diagnóstico da infecção. Esse antígeno é um carboidrato termoestável de baixo peso molecular que foi detectado em pacientes com LV (SARKARI et al, 2002). O KAtex tem um bom valor prognóstico, uma vez que, em pacientes após tratamento para LV o antígeno não foi detectado (COTA et al, 2012).

Em 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). A detecção de antígenos é uma alternativa para pacientes imunocomprometidos, os quais apresentam baixos níveis de anticorpos circulantes, principalmente em casos avançados, onde a resposta imune é

prejudicada (ATTAR et al., 2001; GONTIJO; MELO, 2004). Em estudo realizado em Pernambuco, 10 pacientes com suspeita clínica para LV foram incluídos no estudo e cinco pacientes foram diagnosticados com coinfeção, sendo quatro com KAtex positivo (CAVALCANTI et al, 2012). Outro estudo realizado por RIERA et al., (2004), na Espanha, a detecção de antígeno na urina de coinfectados obteve sensibilidade de 85,7% em amostras obtidas no primeiro episódio de LV. Para o desempenho do teste na monitorização da eficácia do tratamento, 23 pacientes coinfectados após cura clínica para LV foram acompanhados, utilizando o KAtex e a cultura de células do sangue periférico. E em 148 exames, os dois métodos apresentaram 94 resultados concordantes. Observou-se um bom desempenho do KAtex na detecção de LV em pacientes assintomáticos e na identificação de recidivas, porém ainda necessita-se de ajustes na sensibilidade da técnica e reprodutibilidade.

2.4.4 Diagnóstico molecular

Devido ao quadro de imunossupressão, a investigação sorológica não é considerada a forma mais adequada para a investigação de *Leishmania* spp, portanto o diagnóstico molecular surge como alternativa promissora (COTA et al, 2012; RUITER et al, 2014). 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. e diferentes sequências-alvo tem sido utilizadas, como o espaçador transcrito interno ribossomal (ITS) (CUPOLILLO et al. 1995; SCHÖNIAN et al. 2003; NASEREDDIN et al. 2008), 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 (VICTOIR et al. 1998), gene Hsp70 (GARCIA et al. 2004; FRAGA et al. 2010), gene do citocromo b (KATO et al. 2005) e sequências de RNA (ZELAZNY et al. 2005; ARORA et al, 2008; DEBORGGRAEVE et al, 2008; SCHALLING; OSKAM et al, 2002).

O ensaio de PCR baseado na amplificação do kDNA é provavelmente 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 (MATEUS et al., 2006). 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 explorados 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 (NUNO MARQUES et al, 2007; ASSIS et al, 2008). O uso da PCR em tempo real (qPCR) permite a quantificação da carga parasitária num tempo de ensaio reduzido e o acompanhamento de pacientes coinfectados para o diagnóstico das recidivas (WHO, 2007; REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

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). Estudos com pacientes infectados pelo HIV têm mostrado que a sensibilidade da PCR para o diagnóstico de LV varia de 76% a 100% (ANTINORI S et al, 2007, BOSSOLASCO S, et al, 2003; BOURGEOIS et al, 2008; CAMPINO et al, 2000) Em estudo transversal realizado por COTA, 2013, ao comparar teste parasitológico, sorológico e molecular em 113 pacientes com HIV com sintomatologia característica para LV, concluiu-se que a PCR em tempo real, tendo como alvo a subunidade menor ribossômica em amostras de sangue total, apresentou sensibilidade semelhante ao teste parasitológico, o que torna-se é uma alternativa menos invasiva para exame parasitológico de confirmação dos casos de coinfecção. Há, no entanto, uma 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; COTA, 2012).

Assim como para LV, na LTA, a PCR é uma das mais promissoras técnicas utilizadas para o diagnóstico. Uma variedade de amostras clínicas já foram avaliadas para identificação de DNA: fragmentos de pele por punção ou biópsia, pele fixada em formalina ou embutidos em parafina, impressões da pele em nitrocelulose, papel filtro ou swab armazenadas em tampão de lise ou etanol, etc (MARQUES et al, 2001; MIMORI et al, 2002; SAFEI et al, 2002; MOTAZEDIAN et al, 2002). Estudos que se utilizam da PCR para identificação de LTA em indivíduos com HIV/aids, ainda são escassos (KHANDELWAL et al, 2011; GUERRA et al, 2011). Os custos associados à técnica ainda são considerados um obstáculo

na sua utilização na rotina clínica. Portanto, a PCR pode ser um procedimento alternativo em casos onde há suspeita clínica, e tanto os resultados sorológicos e parasitológicos sejam negativos (BRASIL, 2013).

A PCR e suas variantes é a principal ferramenta molecular utilizada no diagnóstico de doenças parasitárias, porém ainda requerem de recursos humanos qualificados, materiais e equipamentos de altos custos. Nas últimas décadas têm sido desenvolvidas novas técnicas para amplificação de ácidos nucleicos. Uma das ferramentas promissoras é a técnica de amplificação isotérmica de DNA (LAMP, do inglês, loop-mediated isothermal amplification) (SRIVASTAVA et al, 2011 PARIDA, et al 2008). A tecnologia LAMP constitui um método rápido para a amplificação específica de ácidos nucleicos, possuindo uma elevada especificidade, já que depende da hibridização dos “primers” a seis locais complementares, assim como sensibilidade elevada em comparação a outras metodologias baseadas em PCR convencional (GILL E GHAEMI, 2008). A LAMP já foi utilizada na identificação de LV no Sudão e LT no Suriname, a sensibilidade utilizando amostras de sangue foi de 83% para LV e 98% para LT (ADAMS et al, 2008). Em 2013 a técnica estava sendo avaliada para o diagnóstico de LV em indivíduos coinfectados LV-HIV/aids na Etiópia, Leste Africano (DIRO, 2014).

2.5 Identificação e caracterização de espécies de *Leishmania* spp.

Devido à possibilidade de visceralização de espécies dermatóricas ou de manifestação cutânea na LV, o isolamento e a caracterização da espécie são recomendados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). A maioria dos casos de leishmanioses encontrados na coinfecção é causada pela *L. infantum* e *L. donovani*; outras espécies envolvidas, dependendo da região geográfica são *L. braziliensis*, *L.aethiopica*, *L. tropica* e *L. major* (WHO, 2007).

O padrão ouro para a identificação de *Leishmania* a nível de espécies e subespécies é a eletroforese de enzimas Multilocus (MLEE), que é baseada na análise de 15 enzimas para determinação de um perfil enzimático das espécies. Essa técnica tem sido aplicada em diversos estudos epidemiológicos e taxonômicos e permite a distinção entre todas espécies de relevância médica circulantes no Brasil (RIOUX et al., 1990; PRATLONG et al., 1991; OSKAM et al., 1998; NIMRI et al. 2002; BRAGA et al., 2003; CUPOLILLO et al., 1994; SILVEIRA et al,2002). No Brasil a análise de isoenzimas é baseada em 18 sistemas enzimáticos e é realizado na Fiocruz de acordo com Cupolillo et al. (1995). De acordo com a análise de isoenzimas, apesar de serem definidos cerca de 29 zimodemas, o zimodema

predominante tanto em cães como em humanos no Velho e Novo Mundo é o MON-1 (CHICHARRO et al., 2002; MARTIN SANCHEZ et al., 2004; KUHLS et al., 2011). Porém, existem estudos que apontam uma alta variabilidade genética em amostras deste zimodema (BAÑULS et al., 1999a; BULLE et al., 2002; PRATLONG et al., 2004). Apesar da análise de isoenzimas permitir a discriminação de espécies, é uma técnica considerada laboriosa, cara e que requer tempo, pois necessita de cultura e isolamento prévio do parasita (GRAÇA et al., 2012; SCHÖNIAN et al., 2003). Além disso, seu poder discriminatório no nível de espécie é limitado, pois não é capaz de distinguir espécies com o mesmo zimodema MON-1 (HARALAMBOUS et al., 2008; TALMI-FRANK et al., 2010).

Diferentes abordagens baseadas em DNA vêm surgindo para a identificação e caracterização de espécies de *Leishmania*, entre estas abordagens está a RFLP e o sequenciamento de vários alvos (CUPOLILLO et al., 1995; NOYES et al., 1998; SCHÖNIAN et al., 2001; MAURICIO et al., 2001; MORALES et al., 2001; GARCIA et al., 2005; LAURENT et al., 2007; EL-TAI et al., 2001).

A RFLP é baseada na digestão dos produtos de PCR (amplicons) por endonucleases que clivam o DNA em sítios específicos gerando perfis de restrição distintos para cada *Leishmania* sp. Essa técnica permite a rápida caracterização direta do parasita, pois pode ser realizada a partir de amostras clínicas, sem a necessidade do isolamento prévio em cultura como MLEE (SCHÖNIAN, et al 2003; SCHÖNIAN, et al 2011). Apesar da alta sensibilidade observada no uso do alvo kDNA para diagnóstico molecular, ele não é considerado ideal para aplicação de enzimas de restrição, por ser considerado um alvo heterogêneo. Isso dificulta a construção de padrões por RFLP devido ao grande número de fragmentos, restringindo a utilização dos iniciadores entre isolados próximos ou apenas permite a identificação de grupos ou isolados de mesma área (SILVA et al., 2010).

A PCR-RFLP do espaçador interno transcrito (ITS), está entre os métodos mais utilizados para o diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* spp. do Velho Mundo e Novo Mundo (SCHÖNIAN et al. 2011). Ele tem sido aplicado para a distinção de espécies simpátricas especialmente na região do Mediterrâneo, bem como para a identificação de casos importados (HARMS et al. 2003; AL-JAWABREH et al. 2004; RHAJAOUÏ et al., 2007). Representantes do complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*) ou complexo *L. brasiliensis* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, etc). Geram padrões de RFLP quase idênticos com uma grande variedade de enzimas de restrição, dificultando a análise final. Esse problema pode ser resolvido pelo sequenciamento do produto da PCR da

região do ITS1, o qual no caso do complexo *L. donovani*, permite uma clara separação de *L. infantum* da *L. donovani* (KUHLS et al. 2005, SCHÖNIAN et al, 2011). Outro alvo promissor que já foi caracterizado foi o gene de choque térmico de 70 kDa (hsp70), que permite a discriminação espécies do Novo e Velho Mundo utilizando a enzima de restrição *HaeIII* (GARCIA et al., 2004, 2005; PEREZ et al., 2007). No entanto, *L. braziliensis* e *L. Peruviana*, ambas pertencentes ao complexo de *L. braziliensis*, bem como a *L. naiffi* e *L. guyanensis* e *L. panamensis* ambas do complexo *L. guyanensis* apresentam um padrão idêntico de RFLP por *HaeIII* e só pode ser distinguida usando uma segunda enzima de restrição (GARCIA et al. 2004; DA SILVA et al. 2010, MONTALVO et al, 2010). Outro alvo para PCR-RFLP que apresenta bons resultados para diferenciação entre espécies em amostras clínicas é o mini-exon, alvo altamente sensível e específico presente nos membros da ordem Kinetoplastida e ausente no hospedeiro vertebrado ou no vetor invertebrado (MARFURT et al., 2003a, 2003b; SERIN et al., 2005).

Outra abordagem baseada em DNA é a técnica de RAPD (“Random Amplification of Polymorphic DNA) que utiliza-se de oligonucleótidos complementares a sítios específicos do genoma, mas não necessariamente conhecidos, que muitas vezes são polimórficos que origina produtos de PCR com padrões característicos e com diferentes tamanhos; o padrão obtido pode ser utilizado para distinguir diferentes espécies de *Leishmania* spp., e para estudar a variabilidade intra-espécie (SCHÖNIAN et al., 1996; NOYES et al., 1996; TOLEDO et al., 2002; ZEMANOVÁ et al., 2004).

A técnica de tipagem de sequencias multilocus (MLST) é uma análise baseada no sequenciamento de DNA de múltiplos genes, e é considerada uma técnica de alta resolução, com resultados compatíveis ao padrão ouro (MLEE), e ainda possui a vantagem de identificar SNPs que permite a distinção entre cepas de *L. infantum* (MAURICIO et al. 2006). Além disso, não necessita necessariamente da cultura estéril de parasitas e não requer da tipagem simultânea de cepas de referência (SCHÖNIAN et al, 2011).

A tipagem de microssatélites multilocus, do inglês “Multilocus microsatellite typing” (MLMT), é uma ferramenta baseada na amplificação de sequências de microssatélites, também chamada de sequências curtas repetidas em tandem ou sequências simples repetidas, compostas por 1 a 6 pb, abundantes, altamente polimórficas, presente nos genomas de todos eucariotos e procariotos (TOTH et al. 2000; MRAZEK et al. 2007). Nos últimos anos, o desenvolvimento de abordagens baseadas em microssatélites foi testado para tipagem dentro do gênero *Leishmania* para superar a falta de poder discriminatório de MLEE e de outros

métodos de tipagem molecular (BULLE et al. 2002; JAMJOOM et al. 2002b; OCHSENREITHER et al. 2006). É uma ferramenta promissora para estudos taxonômicos, epidemiológicos e de genética populacional, que pode ser usado diretamente em material biológico, sem cultivo do parasita. O poder discriminatório do MLMT é maior do que outros marcadores genéticos utilizados para tipagem de *Leishmania* spp., e assim como a técnica de MLST tem a capacidade de discriminar a nível de zimodemas (KUHLS et al., 2007; SCHÖNIAN et al., 2011). Apesar de MLMT e MLST apresentarem alto desempenho na identificação das espécies, não são considerados métodos de simples execução como PCR-RFLP (SCHÖNIAN et al., 2008) e necessitam da realização da PCR em separado para cada par de iniciadores (GHATEE et al. 2014).

3. REFERÊNCIAS

ADAMS, E.R. et al. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 82, p 591-596, 2010.

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.

AL-JAWABREH, A. et al. The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major*. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 9, p 812–816, 2004.

ALVAR, J. et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, 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. Kala-azar outbreak in Libo Kemkem. Ethiopia: epidemiologic and parasitologic assessment. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 77, p 275–282. 2007.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PloS one**, San Francisco, v. 7, p e35671, 2012.

ANDRADE, M.S. 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**, Brasília, v. 38, p 229-233, 2005.

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.

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.

ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, New York, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

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.

ATTAR, Z.J. et al. Latex agglutination test for detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 78, p. 11-16, 2001.

BADARÓ, R. Post-kala-azar dermal leishmaniasis associated with AIDS. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 6, p. 313–16, 2002.

BAILEY, G.G. et al. Leishmaniasis of the tongue treated with liposomal amphotericin. **British Journal of Infection**, London, v. 28, p 327–331, 1994.

BANŪLS, A.L; HIDE, M; TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **International journal for parasitology**, New York, v. 29(8), p1137-47, 1999^a.

BAÑŪLS, A.L., HIDE, M., PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, London, v.64, p.1-109, 2007.

BITTENCOURT, A. 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, 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, p.72–77, 2004.

BOSSOLASCO, S. et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p.5080–5084, 2003.

BOURGEOIS, N. et al. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. **Journal of Acquired Immune deficiency Syndromes**, New York, v. 48, p.13-19, 2008.

BRAGA, R.R. et al. Leishmania (Viannia) utingensis n.sp., a parasite from the sandfly Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata in Amazonian Brazil. **Parasite**, Paris, v 10, p 111–118, 2003.

BRANDÃO-FILHO, S.P. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à Leishmania (Viannia) braziliensis na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico HIV/Aids, 2013. Ano II ,nº 1, Brasília, p 61, 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1 ed. Brasília. 120 p, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. 1 ed. Brasília. 106 p, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Departamento de Informática do SUS Leishmaniose visceral: Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Sinan Net, 2010. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. Acesso em: 12 out. 2013, 16:44,43.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed, 3 reimpr. Brasília. 180 p, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 444 p, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, 60 p, 2006.

BRITO, M.E.F. et al Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasilia**, Brasília, v. 45, p. 425-429, 2012.

BULLE, B.L, et al. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, p. 3391–3397, 2002.

CAMPINO, L. et al. Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v.19, p. 396–398, 2000.

CARNAUBA, 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, p.e504-7. 2009.

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

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

CHAUDHARY, R.G.M; BILIMORIA, F.E; KATARE, S.K. Diffuse cutaneous leishmaniasis: co-infection with human immunodeficiency virus (HIV). **Indian Journal of Dermatology, venereology and leprology**, Nova Deli, v. 74, p. 641-643, 2008.

CHICHARRO, C. et al. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96 (1), p S93–99, 2002.

COHEN, M.S, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.365, n.6, p. 493-505, 2011.

CORTES, P. et al. Oral leishmaniasis in an HIV-positive patient caused by two different zymodemes of *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 9, p 438–439, 1997.

COTA, C.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, p e1665, 2012.

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, n.3, p. 570-7, 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, n.4, p e2816, 2014.

COUPPIE, P. et al. Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. **British Journal of Dermatology**, London, v. 151, p. 1165 – 1171, 2004.

COURA, J.R; GALVÃO-CASTRO, B; GRIMALDI G. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p.581–582, 1987.

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

CUPOLILLO, E, et al. Intergenetic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 73, p.145-155, 1995.

CUPOLILLO, E; GRIMALDI, G.J; MOMEN, H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, p.296–311, 1994.

DA CRUZ, A.M, et al. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p.537–542, 1999.

DA SILVA, L. A. et al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p.77–83, 2010.

DANTAS-TORRES, F; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, p.151–156. 2006.

DATRY, A. et al. AIDS-associated leishmaniasis: an unusual gastro-duodenal presentation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 84, p 239–240, 1990.

DAVID, C.V; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, Copenhagen, v. 26, n.2, p.293–307, 2012.

DE OLIVEIRA, C.I. et al. Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction – Based Detection of *Leishmania* in the Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 37, p e149-153, 2003.

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.

DENIAU, M.C. et al. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, n.1, p 115–133, 2003.

DEREURE, J. et al. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients in the south of France. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v.73, p 245–246, 1995.

DIRO, E. et al. Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. **Plos neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, p. e2869, 2014.

EL TAI, N.O. et al. Leishmania donovani: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. **Experimental Parasitology**, New York, v. 97, p. 35–44, 2001.

EZRA N, OCHOA MT, CRAFT N .Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. **Journal Global Infected Diseases** , Florida, v. p. 248–257, 2010.

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.

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.

GARCIA, F.C.B. et al. Métodos subsidiários para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmania em amostras cutâneo- mucosas. **Anais brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p 339-344, 2005.

GARCIA, L. et al. C.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.

GHATEE, M.A. et al. Heterogeneity of the internal transcribed spacer region in Leishmania tropica isolates from southern Iran. **Experimental Parasitology**, New York, v 144, p.44-51, 2014.

GILL, P; GHAEMI, A. Nucleic acid isothermal amplification Technologies: a review. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids** [S.l], v. 27, n.3, p 224-243, 2008.

GONTIJO, C.M.F; MELO M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and Prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v 7, p 1-12, 2004.

GRAÇA, G.C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, p 664-674, 2012.

GRANT, A. et al. Laryngeal leishmaniasis. **Journal of Laryngology and Otorhinology** [S.l] v. 108, p.1086–1088, 1994.

GRASA, J. et al. Nasal leishmaniasis in an HIV-positive patient. **Acta Otorhinolaringologica Española**, [S.l], v. 51, p.169–173, 2000.

GREENE, W.C. A history of AIDS: looking back to see ahead. **European Journal Immunology**, Weinheim, v. 37, n.1, p.94–102, 2007

GUERRA, J.A.O. et al. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v.85, p.524-527, 2011.

HAILU A , BERHE N. The performance of direct agglutination tests (DAT) in the diagnosis of visceral leishmaniasis among Ethiopian patients with HIV co-infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 96, p.25–30, 2002.

HAILU A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and infectious disease**, New York, v.42, n.4, p 251-256, 2002.

HAILU, A. et al. Visceral Leishmaniasis: New Health Tools are Needed. **Plos Medicine**, San Francisco, v. 2, n.7, p 590-594, 2005.

HARALAMBOUS, C. et al. Development of a molecular assay specific for the Leishmania donovani complex that discriminates L. donovani/Leishmania infantum zymodemes: a useful tool for typing MON-1. **Diagnostic Microbiology and infectious disease**, New York, v. 60, n.1, p 33–42, 2008.

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

HARMS G, SCHÖNIAN G, FELDMEIER H. Leishmaniasis in Germany. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, p.873–5, 2003.

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.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 354, p.1191-1199, 1999.

JAMJOOM, M.B. et al. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the Leishmania donovani complex. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 96, p.265–270, 2002.

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.

KHANDELWAL, K. et al. Patient presenting with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) as a first indicator of HIV infection in India. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 85, p. 64-65, 2011.

KRUCHTEN, S.D; BACON, K.M; LEE, B.Y. The impact of human immunodeficiency virus (HIV) co-infection on the economic burden of cutaneous leishmaniasis (CL) in Brazil and potential value of new CL drug treatments. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 91, p.520-527, 2014.

KUHLS, K. et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, Paris, v.7, p.1224-1234, 2005.

KUHLS,K. et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, Paris, v.9, p.334-343, 2007.

KUHLS, K. et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **Plos neglected tropical diseases**, San Francisco,v.5(6), p e1155, 2001.

LA LOMA, A, et al. Leishmaniasis or AIDS? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, n.3, p 421-422, 1985.

LAGUNA, F. et al. Prevalence of gastrointestinal leishmaniasis in Spanish HIV-positive patients with digestive symptoms. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v.89, p.1606, 1994.

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.

LAURENT, T. et al. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. **Infection, Genetics, Evolution**, Amsterdam, v. 7, p.206–212, 2007.

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

LINDOSO, J.A. et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **British Journal of Dermatology**, London, v.160, p.311 – 318, 2009.

LOCKWOOD DN, SUNDAR S. Serological tests for visceral leishmaniasis **BMJ London**, London, v.333, n.7571, p 711-712, 2006.

LOPEZ-VELEZ, R. et al. Parasitic culture of buffy coat for diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 937–939, 1995.

LOPEZ-VELEZ, R. et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfectd with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 58, p.436-443, 1998.

MACHADO, E.S. et al. Disseminated American muco-cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, p 487-492, 1992.

MARFURT, J. et al. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 46, n.2, p, 115–124, 2003.

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.

MARQUES, M.J.et al. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 65, p.902- 906, 2001.

MARTIN-SANCHEZ J. et al. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98(4), p 228-32, 2004.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p.82-99, 1992.

MATTOS, M. et al. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases, **Journal of the European Academy of Dermatology Venereology**, Amsterdam, v. 10, n.3, p.218-25, 1998.

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.

MAURICIO, I.L. et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). **International journal for parasitology**, New York, v.36, p.757–769, 2006.

MEDRANO, F.J. et al. The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v.59, p.155–162, 1998.

MEDRANO, F.J. et al Visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals, a common opportunistic infection in Spain? **AIDS**, London, v. 6, p.1499- 1503, 1992.

MEHTA, V.et al.Diffuse cutaneous leishmaniasis in HIV. **Dermatology Online Journal**, Davis, v. 15, n.4, p 9, 2009.

MERSON, M.H. et al. The history and challenge of HIV prevencion. **Lancet**, London, v.372, p. 475-488, 2008.

MIMORI, T.et al. Usefulness of sampling with Cotton swab for pcr-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the new World. **Acta tropica**, Basel, v.81, p.197-202, 2002.

MONTALVO, A.M. et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World. **Parasitology**, London, v. 137, p.1159–1168, 2010.

MORALES, M.A. et al. Molecular tracking of infections by Leishmania infantum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.95, p.104–107, 2001.

MORENO, J. et al. HIV-Leishmania infantum co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.94, p 328–332, 2000.

MOSS, J.A. HIV/AIDS Review.**Radiologic Technology**, Baltimore,v. 84, p.247-270, 2013.

MOTAZEDIAN, H. et al. DNA extraction and amplification of Leishmania from archive, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool. v.96, p.31-34, 2002.

MRAZEK, J; GUO, X; SHAH, A. Simple sequence repeats in prokaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.104, p. 8472–8477, 2007.

MUNOZ, R.F. et al. Pleural and peritoneal leishmaniasis in an AIDS patient. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v.16, p.246–248, 1997.

MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 366, p 1561–1577, 2005.

NASCIMENTO, E.T. et al. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, p.298–300, 2011.

NASCIMENTO, E.T. 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, p.2848 – 2855, 2008.

NICODEMO, E.L. et al. Visceral leishmaniasis in AIDS patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo, v.32, p.310 – 311, 1990.

NIMRI, L., SOUBANI, R., GRAMICCIA, M. Leishmania species and zymodemes isolated from endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Jordan. **Kinetoplastida Biology and Disease**[S.l.], v.1 ,p.1–9, 2002.

NOYES, H.A; BELLI, A.A; MAIGON, R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v.55(1), p 98-105, 1996.

NOYES, H.A.et al. A nested-PCR-schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 2877–2881, 1998.

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.

OCHSENREITHER, S. et al. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, p. 495–503, 2006.

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.

OSKAM, L. et al. Biochemical and molecular characterization of *Leishmania* parasites isolated from an endemic focus in eastern Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 92, p.120-122, 1998.

PAREDES, R. et al. Leishmaniasis in HIV infection. **Journal of postgraduate medicine**, Bombay, v. 49, n. 1, p 39-49, 2003.

PARIDA, M. et al. Lopp mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique: perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in medical virology**, Chichester, v. 18, p.407-421, 2008.

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

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.

PEREZ, J.E. et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p.655–658, 2007.

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.

PINTADO, V. et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non- HIV-infected patients. A comparative study. **Medicine** , Baltimore, v. 80, n.1, p 54-73, 2001.

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia* (Nyssomyia) neivai (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, p. 593-595, 2009.

PRATLONG, F. et al. *Leishmania tropica* in Morocco. IV– Intrafocal Intrafocal enzyme diversity. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, Paris, v.66, p.100–104, 1991.

PRATLONG, F, et al. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42 (9), p 4077-82, 2004.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. 1. ed. Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, p. 291-309, 2003.

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.

RHAJAOUI, M. et al. New clinico-epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.13, p.1358–1360, 2007.

RIERA, C. et al. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post treatment follow-up. **European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 23, p.899–904, 2004

RIOUX, J.A. et al. Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria: 1. *Leishmania major*. Yakimoff an Schokhar (Kinetoplastida – Trypanosomatidae) infestation of *Psammomys obesus* Cretzschmar (Rodentia-Gerbillidae). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 65, p.203-207, 1990.

ROCHA, L.S. et al. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, p. 461-466, 2010.

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.

ROSELINO AM, et al . L. (L.) chagasi in AIDS and visceral leishmaniasis (kala-azar) co-infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo, v. 50, p 251-254, 2008.

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

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, London, v.2, p.1261-1262, 1903.

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**, Washington, v. 52, p.3147-3155, 2014.

RUSSO, R. et al. Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, n.1, p 99–105. 2003.

RYAN, J.R. et al. Enzyme-linked immuno-sorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (igM) and IgG antibodies in será from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n.3, p 1037-1043, 2002.

SAFEI, A; MOTAZEDIAN, M.H; VASEI, M. Polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. **Dermatology**, Basel, v. 205, p.18-24, 2002.

SAMPAIO, R.N. et al. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.35, n.6, p 651-654, 2002.

SANTOS-OLIVEIRA, J.R. et al. Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive patient simultaneously infected by two viscerotropic Leishmania species. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v.85, p.55-59, 2011.

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.

SCHALLIG, H.D., OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.7, p. 641-651, 2002.

SCHÖNIAN, G. et al. Identification and determination of the relationship of species and strains within the genus Leishmania using single primers in the polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 106, p.239–48, 1996.

SCHÖNIAN, G; KUHLS, K; MAURICIO, I.L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, London, v. 138, n.4, p 405-425, 2011.

SCHÖNIAN, G. et al. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.24, p.135–142, 2008.

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.

SCHÖNIAN, G. et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p.217–24, 2001.

SERIN, M.S. et al. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of mini-exon region. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 53, p.209-214, 2005.

SHAW, J. J; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. In PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. **London Academic Press, London**, v. 1, p. 291-363, 1987.

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, M. A. L. et al. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Revista eletrônica de Farmácia**[S.l], v.7, p.1-15, 2010.

SILVEIRA, F.T. et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp.—a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, Paris, v. 9, p.43–50, 2002.

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

SOUSA-GOMES, M.L. et al. Co-infection *Leishmania*/HIV in Brazil: Epidemiological, Clinical and Laboratorial Aspects. **Epidemiologia e Serviços Saúde**[S.l], v.20, n.4, 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.

TALMI-FRANK, D. et al. Detection and identification of OldWorld Leishmania by high resolution melt analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco. v. 4, p E581, 2010.

TOLEDO, A. et al. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Amsterdam. v.119(2), p 257-64, 2002.

TOTH, G; GASPARI, Z; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, New York, v.10, p.967–981, 2000.

UNAIDS. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS [UNAIDS] Global Report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic, 2013. Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf. Acesso em: 10 novem. 2013, 22:43:32.

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

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnostic of Cutaneous Leishmaniasis. **Current Opinion Infectious Diseases**, London, v. 16, p.97-101, 2003.

WHO Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/ HIV Coinfection, March 20–22, Addis Ababa, Ethiopia. March 22, 2007.

WHO. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization** [S.l.] Rep Ser 949: 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.l.], n. 54 ,p. 1-88, 1994.

YUSUF, S.M. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in HIV positive patient- a case report. **The Nigerian Journal Medicine**, Idiaraba, v. 19, n.1, p.112-4, 2010.

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.

ZEMANOVÁ, E. et al. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.70(6), p 613-7, 2004.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar as espécies de *Leishmania* spp. em pacientes com HIV/aids em Pernambuco

4.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar a população de estudo quanto aos aspectos clínicos e laboratoriais;
- b) Diagnosticar casos de coinfeção *Leishmania*– HIV/aids em pacientes portadores do vírus HIV;
- c) Identificar as espécies de *Leishmania* spp. em pacientes coinfectados *Leishmania* – HIV/aids;

ARTIGO: USE OF PCR-RFLP FOR THE DIAGNOSTIC OF LEISHMANIASIS IN HIV-INFECTED PATIENTS: SPECIES IDENTIFICATION AND ASSISTANCE TO ACCURATE CLINICAL APPROACH AND THERAPEUTIC.

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Fator de impacto: 1.931

Elis Dionisio da Silva ^{a*} Fábio Lopes de Melo^b, Leandro Batista Wanderley^b, Vera Magalhães^c, Rhaíssa Evelyn Moraes Ramos^b, Christian Robson de Souza Reis^b, Zulma Maria de Medeiros^b, Luiz Bezerra de Carvalho Junior^a Maria Almerice Lopes da Silva^b

^a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami (LIKA), Av Prof.Moraes Rego, S/N, 50670-901, PE BRAZIL; ^bFundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av Prof.Moraes Rego, S/N, 50740-465, PE BRAZIL; Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Av Prof.Moraes Rego, S/N 50670-901, PE BRAZIL.

*Corresponding author: Tel: +55 81 21012662; E-mail: dionisio.elis@gmail.com

ABSTRACT

Background: In Brazil there is a large area of leishmaniasis and HIV infection, which favored an increased incidence of coinfection *Leishmania*-HIV/AIDS. This study aimed to evaluate the use of PCR-RFLP for identification of *Leishmania* species in patients with HIV / AIDS, providing data to assist in the correct clinical therapeutic approach of patients.

Methods: The study enrolled patients with HIV/ AIDS admitted to three referral hospitals for HIV / AIDS in the Metropolitan Region of Recife (RMR) - PE from June / 2013 to December / 2014. PCR was performed on DNA from blood samples, which targeted the ITS-1 region. The identification of species was performed by PCR-RFLP ITS1 and confirmed by sequencing and alignment of the sequences in GenBank.

Results: The study included 236 patients with HIV / AIDS, 21 of them was found *Leishmania* DNA using PCR - ITS1, of 66% were male, with predominant age range 25 to 39 years and

80.9% in urban regions. In VL/HIVco-infection cases, *L.infantum* was identified by PCR-RFLP in 15 (71.4%) patients and 17 (80.9%) by sequencing of amplicons.

Conclusions: Confirmation of results by sequencing and alignment indicate that PCR-RFLP is a safe technique to identify *L. infantum* in patients with HIV / AIDS. The use of PCR-RFLP in the routine of health services can assist in developing strategies for prevention and control and medical assistance to co-infected patients, becoming an important indicator for follow-up need.

Keywords: Leishmaniasis, Co-infection, Diagnostic, HIV, AIDS, PCR, RFLP.

INTRODUCTION

In some regions of the world, one of the main factors that become control of leishmaniasis a difficult task is its association with other diseases, such as immune deficiency syndrome-AIDS, pandemic disease and high severity¹. *Leishmania*-HIV /AIDS co-infection cases have been registered in 35 countries worldwide, with broad expansion in several countries². Brazil is the epicenter of the leishmaniasis in the Americas, commonly rural disease, presenting growing incidence in urban conglomerates. In addition, HIV / AIDS is expanding to small towns and rural areas. Overlapping of these diseases leads to an increase number of coinfection in the country^{3,4}.

Leishmania-HIV / AIDS diagnose is particularly difficult task. Defining clinical and epidemiological features are tough due to the development of ectopic expression, presence of opportunistic diseases associated, and areas where more than one *Leishmania* spp. co-exist⁴. In general, these patients have low levels of CD4 + lymphocyte counts, which may prevent a complete immune recovery. Therefore, *Leishmania*-HIV / AIDS coinfecting patients have lower rates of healing, higher rates of toxicity to drugs, increase mortality rates and relapses^{5,6}.

Laboratory diagnosis is traditionally based on the results of serological tests, bone marrow cytology and in vitro isolation and in vitro isolation. In co-infected cases, serologic tests are limited, due to immunosuppression and to not allow discrimination between species⁷. The parasitological diagnosis is an invasive procedure that may cause serious complications, requiring appropriate environment and technical trained, and do not allow identification species due to morphological similarities^{8,9,10}.

The multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) is considered the gold standard for the identification of *Leishmania* spp., however, a laborious technique, expensive and time consuming .It requires prior isolation and culture of parasite¹¹. PCR assays are promising alternatives, been widely used for diagnosing infectious diseases and epidemiological studies due to its high sensitivity and especificity¹². Internal transcribed spacer target (ITS) amplification is the most widely used for diagnosing and identification of *Leishmania* spp. of Old World and New World. Furthermore, digestion of the PCR products (amplicons) with restriction enzymes allows identification of *Leishmania* spp., thereby leading to rapid characterization of the parasite^{13,14}.

This study aimed to evaluate the use of PCR-RFLP for identification of *Leishmania* spp. in HIV/AIDS admitted to referral hospitals, providing data to assist in the correct clinical therapeutic approach.

MATERIAL AND METHODS

Samples and Study Area

A prospective study was conducted in three referral hospitals for HIV / AIDS in Pernambuco, Brazil, from June 2013 to December 2014. We included patients over 18 years, HIV positive confirmed by ELISA or Western blot¹⁵.

After patients have written informed consent, blood samples were collected for molecular diagnosis. Demographic information, stage of infection HIV, previous *Leishmania* diagnosis, previous or concomitant infections associated, clinical features, laboratory and parasitological data, treatment, adverse effects and clinical course.

DNA extraction

DNA from blood samples was extracted using the commercial kit QIAamp DNA Blood Mini KitTM (USA) according to the manufacturer's instructions.

PCR amplification

PCR was performed using internal transcribed spacer (ITS1). Primers used in the reactions were: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') and L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3')¹³. DNA amplification was performed in 50 µl reaction mix containing 2 µl of template DNA, 25 µl of 2x GoTaq[®] Green Master Mix (Promega Corp., Madison, WI) and 2.5 µl (10 pmol/ microl) of each primer. GoTaq[®] Green Master Mix presents the following conditions: Green GoTaq 2x Reaction Buffer (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, and 3 mM MgCl₂. Amplification was performed under conditions described by SCHÖNIAN et al (2003), 94 ° C initial denaturation for 5 min and 35 cycles: 94 ° C for 1 min; 67 ° C for 2 min; 72 ° C for 1 min and a final extension at 72 ° C for 5 minute in Lifepro thermal Cycler (Bioer Technology). The expected final product was 300-350bp depending on *Leishmania* spp.

The PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis with 0.5 µg/ml ethidium bromide¹⁶ for 25 min at 90 V in TAE buffer and visualized by a transiluminator by ultraviolet light and photographed with the L-Pix EX Imaging System (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). A 100 bp DNA ladder was used in each run as size standard.

RFLP analysis of amplified ITS1

ITS1 PCR products (15µl) was digested with *Hae*III 1µl for 1 hour and 30 minutes at 37 ° C using conditions recommended by the supplier (Invitrogen, CA, USA). The restriction fragments were subjected to electrophoresis in 3% agarose gel to 100V in 1.0 x TAE buffer and visualized and photographed in transiluminator after staining in ethidium bromide (0.5 µg / ml)¹⁶. Banding patterns were compared with each species defined by SCHÖNIAN et al. 2003.

ITS1 Sequencing

The products obtained after amplification of the ITS-1 were purified using the PureLinkTM Quick PCR Purification Kit (Invitrogen, CA, USA). Sequencing reaction was carried out using the same primers used in PCR with the Big Dye kit reagents from Applied Biosystems (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1[®]) in automated

sequencer, ABI PRISM 3100 model (Applied Biosystems). The analysis sequencing was performed using the programs Collection 3100 Date version 1.1 and sequencing Analysis version 3.7 also from Applied Biosystems. The obtained sequences were analyzed and aligned using the programs SeqMan™ II, EditSeq™, Megalign™, MapDraw™, Lasergene software package, version 7.0., DNASTAR® Inc., Madison, WI.

Statistical Analysis

The degree of agreement between the PCR-RFLP and sequencing was determined by the Kappa index, using the Lands and Koch interpretation criteria¹⁸.

Ethical issues

The project was approved by the Research Ethics Committee of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). This study was conducted according to the Helsinki Declaration and Resolution 196/96 of the National Health Council of the Ministry of Health, which regulates research involving human subjects in Brazil.

RESULTS

During June 2013 and December 2014, a total of 236 individuals with HIV/AIDS were investigated, 159 (67.4%) were male and 77 (32.6%) were female, range 18-81 years, predominantly age 30 to 39 years (36.5%) (Table 1), most (172 (72.9%)) resident in the metropolitan region of Recife (RMR), Pernambuco. The average CD4 count was 221.05 cells / mm³ (range 1-1460).

ITS-1-PCR from blood was positive in 21 (8.9%) (Figure 1), being considered *Leishmania*-HIV/AIDS co-infected patients. 14 (66.6%) were male and 7 (33.3%) female, both sexes with predominant age ranging 25 to 39 years (Table 2). 17 (80.9%) lived in metropolitan region of Recife. None of them had Leishmaniasis previous episode.

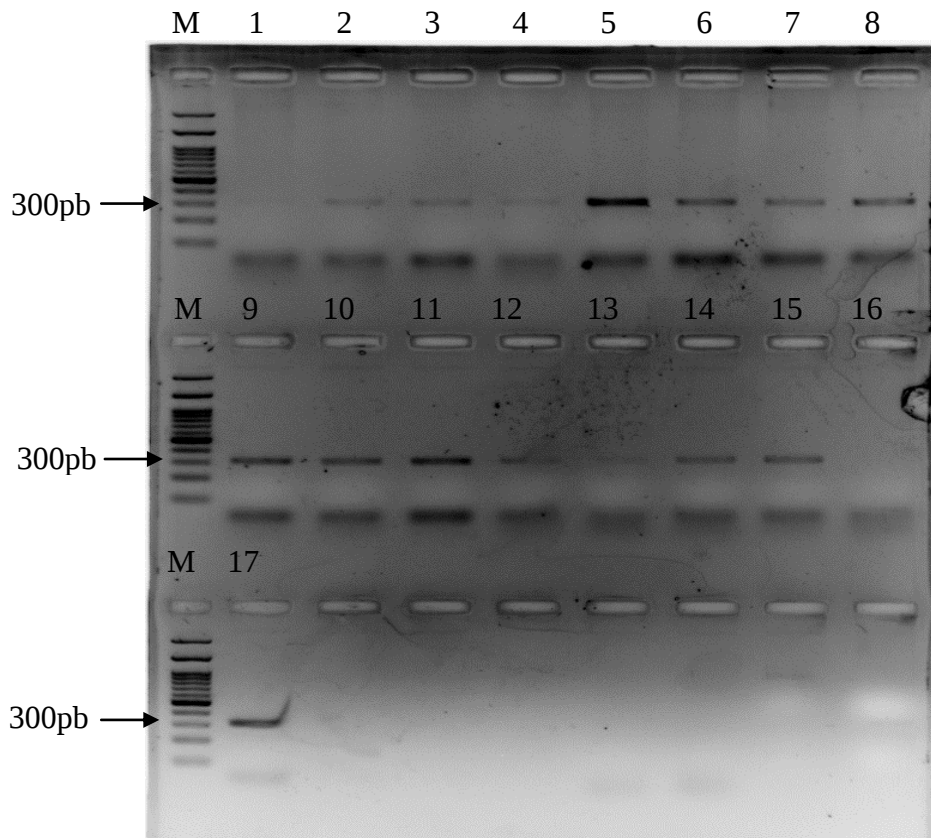


Figure 1. Electrophoresis on 2% agarose gel of ITS-1 region (350pb) from *Leishmania* spp. M: 100pb molecular weight ladder (invitrogen). Lanes 1-15: Clinical samples, Lane 16: Negative Control, Lane 17: Reference strain of *L.infantum*: MHOM/BR/1974/PP75.

Table 1. Age distribution of HIV-infected patients.

Age (years)	Frequency	Percentage
18-24	16	6.8%
25-29	29	12.3%
30-34	38	16.1%
35-39	48	20.4%
40-44	30	12.7%
45-49	29	12.3%
50-59	35	14.8%
60+	10	4.2%
Total	236	100%

Table 2. . Age distribution of *Leishmania*-HIV/AIDS co-infected patients.

Age (years)	Frequency	Percentage
18-24	2	9.5%
25-29	5	23.8%
30-34	3	14.3%
35-39	4	19%
40-44	2	9.5%
45-49	2	9.5%
50-59	2	9.5%
60+	1	4.8%
Total	21	100%

The most frequent clinical features in this co-infected group was fever, weight loss and diarrhea (Table 3). Viral load was detectable in 90.9% and CD4 + cells, the average was 132.6 cells / mm³ (range 12-614). In 72.7% CD4 + count was below 200 cells / mm³ (Table 4).

Table 3. Clinical data of *Leshmania*-HIV/AIDS coinfecting patients.

Signs and Symptoms	Frequency/Total	Percentage
Fever	16/21	76.20%
Weight loss	15/21	71.40%
Diarrhea	12/21	57.1%
Cough	11/21	52.4%
Cutaneous lesions	7/19	36.80%
Hepatomegaly	4/19	21%
Eplenomegaly	2/19	10.50%

Table 4. Laboratorial data of *Leshmania*-HIV/AIDS co-infected patients.

Laboratorial data	Frequency/Total	Percentage
Leucocytes(mm ³) <5.000	11/20	55%
Viral Load (cópias/ml) > 50	10/11	90.90%
Platelets(mm ³) < 150.000	8/21	30.10%
CD4+ cell (cél/μl) < 200	8/11	72.70%
Creatinin (mg/dL) >1.2	6/19	31.60%
Urea (mg/dL)>50	2/19	10.50%

HaeIII digestion of PCR products revealed the *L.infantum* patterns (55, 72, and 184pb) to 15 samples (Figure 2). Sequencing was made to ascertain species by RFLP. In 17 (80.9%) samples, significant homology was revealed by *L.infantum* sequence of NCBI BLAST database and 4 (19%) had no significant homology (Table 5).

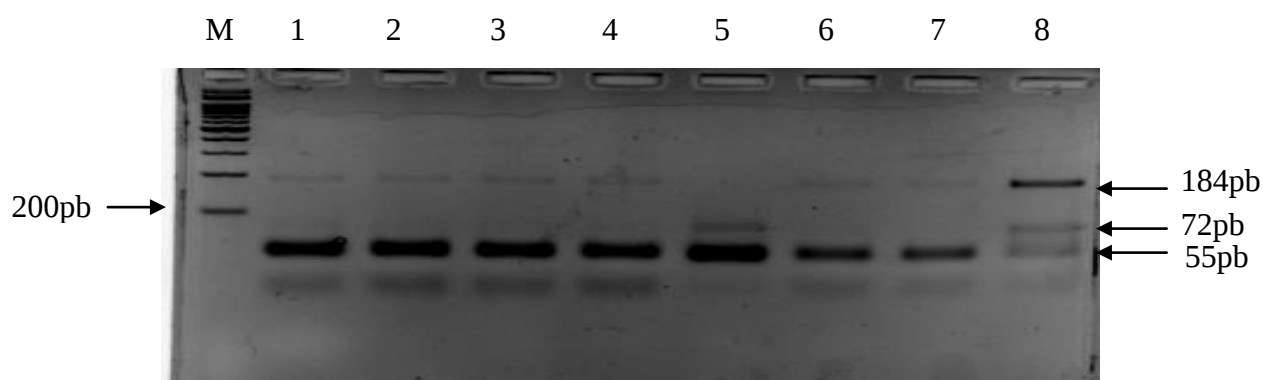


Figure 2. RFLP banding patterns analyzed on 3% agarose gel. Lanes 1-7: Characterization of *Leishmania* species in clinical samples. Lane 8: Reference strain of *L. infantum*: MHOM/BR/1974/PP75.

Table 5. Results of PCR-RFLP-ITS1 and sequencing in *Leishmania*-HIV/AIDS co-infected patients.

	PCR-RFLP-ITS1	SEQUENCING
Total number of samples	21	21
<i>Leishmania infantum</i>	15(71.4%)	17(80.9%)
Unidentified samples	6 (28.6%)	4 (19%)

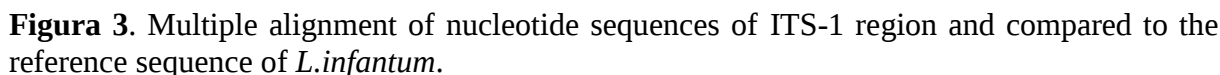
When the tests were compared, it was found agreement results in 13 (61.9%), *L. infantum* specie was identifies by both sequencing and PCR-RFLP. In 2 (9.5%), the results were discordant. According agreement analysis, tests showed moderate agreement (kappa 0.22) (Table 6).

Tabela 6. Comparison between PCR-RFLP and sequencing on 21 samples of *Leishmania*-HIV/AIDS co-infected patients.

		Sequencing		
		<i>L. infantum</i>	Negativo	Total
PCR-RFLP	<i>L. infantum</i>	13	2	15
	Negative	4	2	6
	Total	17	4	21

Kappa index: 0,22

ITS-1 region of Nucleotide sequences of eight samples were aligned with the nucleotide sequence of *L. infantum* (GenBank Accession nth **KC347301.1**) intending to find SNPs showing no variations. The others sequences, despite the homology *L. infantum*, had several sequencing errors, not allowing the assessment of the SNPs (Figure 3).



Leishmania-HIV/AIDS co-infection has been described around the world. This study described a clinical and laboratorial profile of co-infected, besides PCR-RFLP application to identification *Leishmania* spp.

Prevalence rate varies according to the diagnostic method applied. It is observed that even in HIV-infected, when the criteria adopted are serological techniques, the rate is higher in relation to molecular techniques, being explained due to cross-reactions with other parasites and the detecting antibodies arising from previous infections^{19, 20, 21, 22}. ITS-1 - PCR technique has high specificity and sensitivity, with performance evaluated in a great number

of clinical samples, being possible to detect about 0.2 parasites per sample¹³. Therefore, a 8.9% rate using this method becomes a risk of transmission to VL in the region and can be an important indicator for the follow-up needs and a regular screening in HIV/AIDS subjects, enabling the agility of correct treatment guidance in cases of disease reactivation.

The male gender was majority, in agreement with other studies published in Brazil in the Mediterranean area. This predominance is present in HIV/AIDS, leishmaniasis and *Leishmania*-HIV/AIDS coinfecting cases as well^{4,8,19,23,24}.

Leishmaniasis are more frequent in children, in *Leishmania*-HIV/AIDS co-infection cases, the predominant population of young-adult, this is one of the main aspects that differ from immunocompetent individuals with Visceral Leishmaniasis and American Tegumentary Leishmaniasis^{2,8,20, 25,26}. Although we have not included herein patients under 18, the age of the co-infected population was matched to previous studies.

HIV-infection in rural areas and the concomitant expansion of leishmaniasis to suburban and urban areas keep the occurrence of *Leishmania*-HIV/AIDS co-infection in many parts of the world^{27,28}. The results suggest that co-infection is prevalence in urban areas, because 80.9% of the cases were from this region, previously by others^{29, 30}.

It is suggested that *Leishmania*-HIV/AIDS co-infected patients develop a condition called "chronic active visceral leishmaniasis", due to the presence of relapses for several years and the continued circulation of the parasite in blood, even in asymptomatic periods³¹. It is therefore important one monitoring to prevent progression of the disease. However, the most appropriate diagnostic method for identifying asymptomatic cases and to detect the natural evolution of parasitaemia is still a challenge. Real-time PCR is a promising technique to identify such cases, but is still considered a high cost of technical and there is the need for inter-laboratory standardization^{32, 33}. Although most coinfecting of our study have fever (76.2 %), only in 2 patients, the symptoms were followed by pancytopenia and hepatosplenomegaly, classic triad of VL. Cutaneous lesions present in 36.8% with no typical pattern for ATL. It is suggested that the others co-infected individuals (90.5%) had asymptomatic or subclinical VL expression.

One of the main indicators of immunosuppression is the dosage of CD4 + cells. It was observed in 72.7% of cases, indexes less than 200 cells/mm³. The occurrence of leishmaniasis is more frequent in low levels of CD4+ cells, which predisposes to be a risk factor for reactivation of latent infection and the development of other opportunistic infections^{34,35, 36}.

Leishmania detection and identification in areas where there is more than one current species is especially useful for epidemiological studies and the correct treatment guidance²³. In Pernambuco *L.infantum* is responsible for VL and *L.brasiliensis* for ATL. Because of the possibility of visceralization of dermatropic species and cutaneous manifestation in VL, isolation and characterization of species in immunosuppressed individuals is of great relevance^{36, 37,38}. The multilocus isozyme electrophoresis is considered the gold standard for the identification of *Leishmania* species, but is considered a laborious technique and time-consuming, because previous isolation of the parasite in culture is needed. In the present study, we used PCR-RFLP described by Schönian, et al (2003) which is capable of distinguishing all clinically relevant species of *Leishmania*. Considering 21 positive cases by ITS-1-PCR, it was possible to identify *L.infantum* by RFLP in 71.4% of samples.

DNA sequencing is a high precision laboratory technique that presents great performance for species identification, being based on comparison of homologous sequences in databases (GenBank). It is not necessary isolation of reference strains for species identification, as well as in PCR-RFLP cultivation of parasite are not needed¹¹. Depending on the target, you can perform a molecular characterization by identifying variations (SNPs) between species in databases and determination of different zymodemes. However, it is present only in reference laboratories, being still considered a high cost technique when compared to PCR-RFLP^{39, 40}.

Sequencing allowed the identification of *L.infantum* in 80.9% of cases. There was a moderate agreement between the tests ($k = 0.22$) when sequencing and PCR-RFLP were compared. In a study using skin samples and mucosal found a correlation of 61% between sequencing and PCR-RFLP targeting the kDNA for species identification of cutaneous leishmaniasis⁴¹. In Italy, a study with *Leishmania*-HIV/AIDS co-infected cases applied PCR-RFLP targeting repetitive sequences present in the Old World *Leishmania* spp. PCR-RFLP showed 100% agreement with the electrophoresis multilocus enzymes for the 19 co-infected

patients, however this target does not allow the distinction of *Leishmania* species in the New World, as *L.brasiliensis* and *L.peruviana*³². In the Mediterranean area and in Brazil where the ATL is common, the risk of visceralization typically dermatropic species can be considered a problem that has not been well investigated in individuals with HIV/AIDS, except for case reports^{33, 42}. Although not observe the presence of *L.brazileinsis* species in our study, there is the prospect of further research by PCR-RFLP, not only in blood but also in skin and mucosa samples.

The broad spectrum of clinical manifestations of leishmaniasis depends on genetics and parasite characteristics associated with the susceptibility of the host. Studies indicate that immune suppression may select certain subpopulations of *Leishmania*, conferring selective advantage to the parasite^{43,44,45}. In a study conducted in the Mediterranean was found that isolated from *Leishmania*- HIV/AIDS co-infected have a high level of enzyme polymorphism⁴⁶. In a study conducted on the African east was found considerable polymorphisms between strains isolated from VL-HIV/AIDS coinfecting patients of *L.donovani* using the repeating region HASPB (K26), however in *L.infantum* these variations were rare⁴⁷.

PCR-RFLP of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) is among the most widely used methods for the diagnosis and identification of *Leishmania* spp. of Old World and New World¹¹. ITS region in *L.donovani* complex has low levels of polymorphism when compared to other *Leishmania* complex⁴⁸. The alignment of the sequences obtained ITS1 our study revealed no changes to the reference sequence for *L.infantum* (Figure 6). GELANEW et al (2010)⁴⁹ reported a rare case in which it was observed variations both following ITS-1 and for Hsp70 to *L.donovani* in individual from Ethiopia that had a frame Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) concomitantly with LV.

CONCLUSIONS

In conclusion, the use of PCR-RFLP can be considered a reliable tool for *L.infantum* identification in blood of patients with HIV/AIDS. PCR-RFLP is applicable in health services because it is a simple technique, high sensitivity and specificity, which may aid in the development of therapeutic strategies for prevention and control.

REFERENCES

1. Nuno marques S, Cabral S, Sá R et al. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana - Na era da terapêutica anti-retrovirídica de alta eficácia. *Acta med port*, 2007; 20:291-298.
2. WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Available: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf. [Accessed: 22 January 2015].
3. Profeta da Luz ZM, Pimenta DN, Cabral AL et al. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med Trop*, 2001;34(3):249–54.
4. Rabello A, orsini M, Disch. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol*, 2003; 97:17-28.
5. Cota CF, de Sousa MR, Fereguetti TO et al. Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. *Plos Negl Trop Dis*, 2013; 7:e1665.
6. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A et al. The relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 2008; 21:334-359.
7. Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non- HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine*, 2001; 80(1): 54-73.
8. Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:298–319.
9. Aviles H, Belli A, Armijos R et al. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol*, 1999; 85:181–187.
10. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002; 9:951-958.

11. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL et al. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*, 2011; 138(4):405-425.
12. Graça GC, Volpini AC, Romero GA et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012; 107:664-674.
13. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47:349–358.
14. Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
15. Centers for Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992;41(RR-17):1-19.
16. Hajjarian, H; Vasigheh, F; Mohebbi, M et al. Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *J clin lab anal*, 2011; 25:20-4.
17. Landis JR & Koch J. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977; 33:159–174.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. SinanNet. Available: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.pdf>. [Accessed: 23 Dez 2014].
19. Orsini M, Canela JR, Disch J et al. High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. Infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(5):283-8.
20. Carranza-Tamayo CO, Santana T, Assis M. et al. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasília, Federal District, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103:743–748.

21. Gállego M; Martín-Sánchez J; García-García J et al. The subclinical infection by *Leishmania infantum* in patients infected by the human immunodeficiency virus in Spain. In: Third World Congress on Leishmaniasis; 2005;141.
22. Pineda JA; Gallardo JA, Macias J et al. Prevalence of and factors associated with visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients in southern Spain. *J Clin Microbiol.*1998; 36: 2419-22.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. 1 ed. Brasília. 106 p, 2011.
24. Cruz I, Javier N, Javier M. et al. *Leishmania*/HIV co- infections in the second decade. *Indian J Med Res* 123. 2006; 123(3): 357-88.
25. Sousa-Gomes ML, Maia-Elkhoury A, Pelissari D et al. Co-infection *Leishmania*/HIV in Brazil: Epidemiological, Clinical and Laboratorial Aspects. *Epidemiol Serv Saúde.* 2011; 20(4): 519-526.
26. Daher EF, Fonseca PP, Gerhard ES et al. Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and co-infection in 15 patients from Brazil. *J Parasitol.* 2009; 95:652-5.
27. WHO. Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/ HIV Coinfection, March 20–22, Addis Ababa, Ethiopia. March 22, 2007.
28. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27:305-1318.
29. Lima IP, Muller MC, Holanda TA et al. 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.* 2013; 46:156–160.
30. Cota GF, Sousa MR, Mendonça AL et al. *Leishmania*-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. *Plos Negl Trop Dis.* 2014;8(4):e2816.
31. Bourgeois N, Bastien P, Reynes J et al. ‘Active chronic visceral leishmaniasis’ in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med.* 2010;11:670-3.

32. Antinori S, Calattini S, Longhi E 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. **Clin Infect dis.** 2007;44:1602–1610.
33. Toz, S; Culha, G; Zeyrek, F et al. A Real-time ITS1-PCR based method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. 2013; 7:e2205.
34. Kubar J, Marty P, Lelièvre A et al. Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4⁺-Lymphocyte counts. *AIDS*.1998; 12:2147-53.
35. Lopez-velez R, Videal S, Marquez M, et al. Amphotericin B lipid complex versus treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV –infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:540-3.
36. Okwar I, uzonna J. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol res.* 2013; v 56(1), p 163-171.
37. Couppie P, Clyti E, Sobesky M et al. Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-Infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *Br J Dermatol.*2004;151(6):1165-71.
38. Cunha J, Carrilo E, Sanchez C et al Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV⁺ and HIV⁻ patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors.* 2013; 6:122.
39. Gangneux JP; Menotti J; Lorenzo F et al. Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world leishmania infections in area of nonendemicity. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(4):1419-1422.
40. Mahmoudzadeh-Nikham H, Abrishami F, Doroudian M et al. The Problem of Mixing up of *Leishmania* isolates in the Laboratory: Suggestion of ITS1 Gene Sequencing of Verification of Species. *Iran J Parasitol.* 2011, 6(1); 41-48.

41. Garcia FC, Medeiros AC, Santos S et al. Métodos subsidiários para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmania em amostras cutâneo- mucosas. *An bras Dermatol*. 2005; 80(3):339-344.
42. Kumar, R; Bumb RA; Ansari NA et al. Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76: 896-901.
43. Oliveira F; Valette R; Schubach A et al. Genetic polymorphism in *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected in mucosal leishmaniasis of HIV-infected and non-HIV-infected patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(11): 683-7.
44. Jimenez MI, Laguna F, de la Torre F et al. New *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995; 89(1):33.
45. Saporito L, Giammanco G, Grazia S et al. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int j infect dis* . 2013; 17(8): e572-6.
46. Pratlong, W; Cacopardo L; Nigro J et al. Enzymatic polymorphism during *Leishmania*/HIV co-infection a study of 381 *Leishmania* strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 2003; 91(1):47-56.
47. Zackay, A; Nasereddin A; Takele Y et al. Polymorphism in the HASPB repeat region of East African *Leishmania donovani* strains. *Plos Negl Trop Dis*. 2013; 7(1), e2031.
48. Schönian G, Schnur L, el Fari M et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001; 95:217–24, 2001.
49. Gelanew T; Amogne W; Abebe T et al. A clinical isolate of *Leishmania donovani* with ITS-1 sequence polymorphism as a cause of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL/VL) in an Ethiopian HIV-positive patient on HAART. *Br J Dermatol*. 2010; 163(4):870-4.

5. CONCLUSÕES

Esse estudo indica que os casos de coinfeção *Leishmania*-HIV/aids presentes em Pernambuco constitui um risco de transmissão para LV na região, por apresentar uma taxa de prevalência de coinfeção *Leishmania*-HIV/aids acima da média nacional. Esse dado pode ser um importante indicador para a necessidade do “follow-up” e de um “screening” periódico em indivíduos com HIV/aids, permitindo a agilidade do correto direcionamento terapêutico em casos de reativação da doença. Os casos coinfectados caracterizam-se por ser indivíduos adulto-jovens, predominantemente do sexo masculino e sem etiologia e características clínicas definidas. A confirmação dos resultados pela análise de sequenciamento e alinhamento indica que a PCR-RFLP é uma técnica segura para identificar *L. infantum* em pacientes com HIV/aids. Assim, O uso da PCR-RFLP na rotina nos serviços de saúde pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle e na assistência médica prestada aos pacientes coinfectados.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, será realizado um monitoramento dos casos identificados para o diagnóstico precoce de possíveis casos de reativação da leishmaniose; a investigação de *Leishmania* spp. em indivíduos com HIV/aids terá continuidade em amostras clínicas provenientes de pele e mucosa, além da utilização de alvos moleculares que permitam a identificação de variações inter-específicas de *Leishmania* spp. nesse grupo de pacientes.

**Termo de consentimento livre e esclarecido para investigação de leishmaniose em
pacientes portadores de HIV/Aids**

Convidamos o (a) Sr (a) _____, acompanhado (a) no Hospital _____, para participar do projeto de pesquisa **PREVALÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Leishmania* spp. E SEU ENVOLVIMENTO NO QUADRO CLÍNICO DE LEISHMANIOSE EM PORTADORES DO VÍRUS HIV NO ESTADO DE PERNAMBUCO** coordenado por Maria Almerice Silva, cujo objetivo é conhecer as espécies de *Leishmania* e seu envolvimento na leishmaniose visceral ou tegumentar em portadores do vírus HIV no estado de Pernambuco.

Caso o médico que esta o (a) acompanhando (a) nesse Hospital indique, coletaremos cerca de 30 ml (6 colheres de chá) de urina para pesquisar substância liberada pelo micróbio (antígeno: teste de aglutinação do látex), e 10 ml (2 colheres de chá) de sangue coletado na veia para identificar substancias que o corpo humano produz contra o micróbio (exame de anticorpo: imunofluorescência indireta, teste de aglutinação direta e teste rápido) e para pesquisar material genético (DNA) do micróbio da leishmaniose (reação em cadeia de polimerase - PCR). Caso também seja indicação clínica, faremos uma 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 diagnostico do micróbio de Calazar.

Na presença de lesões na pele, poderá ser coletado na ferida, caso o médico indique, material para pesquisar a presença do micróbio e poderá ser feito um teste para pesquisar substâncias contra o organismo, os anticorpos, através da injeção de 0,1 mL de substâncias produzidas pelo micróbio na minha pele.

Informamos que todos os exames serão coletados com material estéril (“sem infecção”), sendo realizados por profissionais capacitados do próprio Hospital. O exame na veia não causa nenhum desconforto além da “picada” da agulha que pode algumas vezes causar uma pequena mancha roxa (hematoma) que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento. É esperado que após a coleta do líquido presente dentro do osso possa haver um pequeno sangramento e dor no local da punção que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento ou apenas com o uso de remédio para dor.



Informamos que esses exames serão importantes para seu tratamento, pois o diagnóstico de leishmaniose visceral ou tegumentar associada ao HIV/AIDS, quando feito cedo, contribui para que o seu tratamento seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida. Os resultados desses exames serão entregues ao Sr (a) e ao seu médico

assistente, que deixará o resultado no seu prontuário. Na dependência do(s) resultado(s) positivo(s), o Sr. (a) será acompanhado (a) pelo médico e/ou tratado para leishmaniose na Unidade hospitalar de origem.

O (A) Sr (a) é livre para interromper a qualquer momento sua participação na pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico. Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para exame de laboratório, 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.

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).

Recife, ____ de _____ de 20 ____

Assinatura do usuário

Endereço - Rua (usuário ou responsável)

Nº/Aptº

Bairro

Cidade

- Estado

Testemunha:

Assinatura Membro da Equipe de Pesquisa

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Maria Almerice Lopes da Silva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2695.

Dra. Zulma Medeiros, biomédica 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 2101-2662.

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



3.4q	Tem apresentado sangramento em alguma parte do corpo? (SANG) Sim 1 Não 2 Não sabe 8	SANG __
3.5q	Tem tido tosse? (TOS) Sim 1 Não 2 Não sabe 8	TOS __
3.6q	Tem tido diarreia? (DIAR) Sim 1 Não 2 Não sabe 8	DIAR __
3.7q	Tem notado perda de peso? Sim 1 Não 2 Não sabe 8	PPESO __
3.8q	Se sim, quantos quilos? (PKG) _____ kg	PKG __ _ __

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

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

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



6.3f	Linfócitos _____/mm ³ Data ____/____/____	LNF _ _ _ _ _ _ _ _ LNFD ____/____/____
6.4f	Hemoglobina (99,99=não sabe) _____ g/dL Data ____/____/____	HB _ _ _ _ _ _ _ _ HBD ____/____/____
6.5f	Hematócrito (99,99=não sabe) _____ % Data ____/____/____	HTC _ _ _ _ _ _ _ _ HTCD ____/____/____
6.6f	Plaquetas (999,999=não sabe) _____/mm ³ Data ____/____/____	PLAQ _ _ _ _ _ _ _ _ PLAQD ____/____/____
6.7f	AST (9999=não sabe) _____ U/L Data ____/____/____	AST _ _ _ _ _ _ _ _ ASTD ____/____/____
6.8f	ALT (9999=não sabe) _____ U/L Data ____/____/____	ALT _ _ _ _ _ _ _ _ ALTD ____/____/____
6.9f	Ureia (99=não sabe) _____ mg/dL Data ____/____/____	UREA _ _ _ _ _ _ _ _ UREAD ____/____/____
6.10f	Creatinina (99,99=não sabe) _____ mg/dL Data ____/____/____	CREA _ _ _ _ _ _ _ _ CREAD ____/____/____
6.14f	Albumina (99,99=não sabe) _____ g/dL Data ____/____/____	ALB _ _ _ _ _ _ _ _ ALBD ____/____/____
6.15f	Proteínas totais (99,99=não sabe) _____ g/dL Data ____/____/____	PROT _ _ _ _ _ _ _ _ PROTD ____/____/____
6.16f	Globulina (99,99=não sabe) _____ g/dL Data ____/____/____	GLOB _ _ _ _ _ _ _ _ GLOBD ____/____/____
6.18f	Carga viral mais recente _____ cópias/mL Data ____/____/____	CV _ _ _ _ _ _ _ _ CVD ____/____/____
6.19f	Log da carga viral mais recente _____ Data ____/____/____	LCV _ _ _ _ _ _ _ _ LCVD ____/____/____
6.20f	<u>Maior</u> carga viral já apresentada _____ cópias/mL Data ____/____/____	MCV _ _ _ _ _ _ _ _ MCVD ____/____/____
6.21f	Contagem de CD4 mais recente _____ células/mm ³ Data ____/____/____	CD4 _ _ _ _ _ _ _ _ CD4D ____/____/____
6.22f	<u>Menor</u> contagem de CD4 _____ células/mm ³	MCD4 _ _ _ _ _ _ _ _



Data ____/____/____	MCD4D ____/____/____
---------------------	----------------------

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

Observações:

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

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CPqAM/FIOCRUZ/PE



Título do Projeto: "Prevalência de espécies de Leishmania SPP e seu envolvimento no quadro clínico de leishmaniose em portadores do vírus HIV no estado de Pernambuco".

Pesquisador responsável: Maria Almerice Lopes da Silva.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 07/02/13

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 11/13

Registro no CAAE: 13197313.6.0000.5190

PARECER Nº 24/2013

O Comitê avaliou as modificações introduzidas 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 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 08 de maio de 2016. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 08 de maio de 2013.

Coordenadora do CEP/CPqAM

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 08/05/2014.

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

