

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**

CÉSAR OMAR CARRANZA TAMAYO

**AVALIAÇÃO DA CO-INFECÇÃO POR *Leishmania* EM PESSOAS VIVENDO COM
HIV/AIDS ACOMPANHADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA:
Estudo transversal com ênfase na leishmaniose visceral**

**BRASÍLIA
2006**

CÉSAR OMAR CARRANZA TAMAYO

**AVALIAÇÃO DA CO-INFECÇÃO POR *Leishmania* EM PESSOAS VIVENDO COM
HIV/AIDS ACOMPANHADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA**

Estudo transversal com ênfase na leishmaniose visceral

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
MEDICINA TROPICAL.**

**Área de concentração: Clínica das doenças infecciosas e
parasitárias.**

ORIENTADOR: Dr. GUSTAVO ADOLFO SIERRA ROMERO

CO-ORIENTADORA: Dra. ANA RABELLO

BRASÍLIA

2006

Carranza Tamayo, César Omar

Avaliação da co-infecção por *Leishmania* em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília: Estudo transversal com ênfase na leishmaniose visceral./César Omar Carranza Tamayo – Brasília, 2006.

xx,92 p.

Dissertação (Mestrado). Medicina Tropical. Núcleo de Medicina Tropical. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília.

Bibliografia: p.69-79.

1. Leishmaniose visceral. 2. HIV. 3. Co-infecção *Leishmania*/HIV. 4. Diagnóstico. 5. Hospital Universitário de Brasília. 6. Estudo transversal
I - Título

Aos meus pais: Nelly e Horacio

À Willeke

Aos pacientes do Ambulatório de Doenças
Infecciosas e Parasitárias do Hospital
Universitário de Brasília.

AGRADECIMENTOS

À Profª Vanize Macêdo, minha orientadora no Curso de Especialização em Medicina Tropical, por acolher-me no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

Aos professores da Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, por compartilhar com seus alunos os conhecimentos e experiência deles.

Ao Prof. Gustavo Romero, pelo apoio contínuo no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Ana Rabello, do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou em Belo horizonte (MG), pela oportunidade do treinamento em técnicas moleculares no laboratório sob sua responsabilidade cargo e pelas excelentes observações ao trabalho.

Aos colegas do mestrado, pelo carinho e apoio durante a realização das matérias cursadas.

Ao pessoal do Laboratório de Leishmanioses, Roze e Harley, pela colaboração no processamento dos exames laboratoriais.

A Ana Teresa, aluna do PIBIC, pelo apoio nas distintas etapas do estudo.

No Hospital Universitário de Brasília, a Luíza e Giovanna, residentes de Infectologia que colaboraram na admissão dos pacientes ao estudo, ao pessoal do Arquivo e ao pessoal do Projeto Com-vivência, responsáveis pelo apoio psico-social das pessoas vivendo com HIV/aids.

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou em Belo horizonte (MG); especialmente à Claudia, Cristiane, Rachel, Tália e Zélia, pelos ensinamentos e o apoio no processamento dos exames laboratoriais nesse centro.

Ao pessoal técnico e administrativo do Núcleo de Medicina Tropical: Barbosa, Felício Leandro, Nelson e Regina, pela paciência e apoio em todo este tempo de desenvolvimento do mestrado.

Guardo este último párrafo para agradecer a todas las personas que colaboraron directa o indirectamente, de lejos o de cerca, para que pueda concluir este trabajo tan querido como sufrido. Em primer lugar a mi abuelita, mi Mamamina, que nos alimenta con su cariño y sus rezos; y con sus fuerzas nos enseña diariamente a vivir, aún con todos los males que la aquejan. A mis hermanos, cuya paciencia pongo a prueba todo el tiempo. A mis tios y primos, que desde sus hogares estuvieron siempre preocupados y preguntando por su sobrino o su primo que está lejos. Es óbvio que no puedo dejar de lado a la "colonia" peruana: A Juan por su apoyo desde la fase de planeamiento del proyecto hasta la última línea de las conclusiones; a Manuel y su esposa Joana, a Julia y a Joe por su paciencia, apoyo, y por estar ahí siempre para echarnos "unas aguas". A mis patas de la Gloriosa Promoción 90 de San Fernando, especialmente a Adrián Hernández, PhD (Madrid), gran referência cuando se trata de hablar de medicina y música, quien siempre estuvo resolviendo mis dudas y corrigiendo mis "bestialidades"; y a mi "broster" Neil Durand, MD, cirujano recién graduado que cada vez que paso por Lima me acoge em su casa para la respectiva amanecida entre Pisco y Nazca.

Toda ciência vem da dor. A dor busca sempre a causa das coisas, enquanto que o bem-estar inclina-se a estar quieto e a não voltar o olhar para trás.

Stefan Zweig

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	x
Lista de gráficos e figuras.....	xiii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xiv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xviii
Resumen.....	xix
1 Introdução.....	1
1.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos.....	1
1.2 Situação da epidemia de HIV/aids.....	4
1.3 Co-infecção HIV/Leishmaniose visceral.....	5
1.4 Diagnóstico da leishmaniose visceral.....	7
1.4.1 Demonstração e isolamento do parasito.....	7
1.4.2 Diagnóstico sorológico.....	9
1.4.3 Detecção de antígenos.....	11
1.4.4 Diagnóstico molecular.....	13
2 Objetivos.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 Métodos.....	17
3.1 Local de estudo.....	17
3.2 Pacientes.....	17
3.2.1 Critérios de inclusão.....	17
3.2.2 Critério de exclusão.....	17
3.2.3 Definição de caso suspeito de infecção sintomática por <i>Leishmania</i> spp.....	18
3.2.4 Definição de caso de infecção sintomática por <i>Leishmania</i> spp.....	18
3.2.5 Definição de caso de infecção assintomática por <i>Leishmania</i> spp.....	18
3.3 Procedimentos de coleta de dados e coleta, armazenamento e transporte de amostras biológicas.....	18
3.4 Testes sorológicos.....	19
3.4.1 Ensaio imuno-enzimático (ELISA) anti- <i>Leishmania chagasi</i>	19
3.4.2 ELISA anti-rK39.....	20
3.4.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) anti- <i>Leishmania chagasi</i>	21
3.5 Identificação do parasito.....	21
3.5.1 Pesquisa de <i>Leishmania</i> spp., em aspirado de medula óssea.....	21
3.5.2 Cultura do aspirado de medula óssea.....	21
3.6 Teste de identificação do DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	22
3.6.1 Reação em cadeia da polimerase.....	22
3.7 Análise estatística.....	24
3.8 Considerações éticas.....	26
4 Resultados.....	27
4.1 Características da amostra.....	27
4.1.1 Dados sócio-demográficos.....	27
4.1.2 Aspectos epidemiológicos relacionados ao risco de adquirir a infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	31
4.2 Antecedentes patológicos.....	32
4.3 Características da infecção pelo HIV.....	33
4.4 Prevalência da co-infecção <i>Leishmania</i> /HIV.....	38

4.5	Reação de imunofluorescência indireta.....	39
4.6	ELISA com antígeno bruto de <i>L. (L.) chagasi</i>	41
4.7	ELISA com antígeno rK39.....	44
4.8	Avaliação baseada na combinação dos resultados de todos os testes sorológicos... 47	
4.9	Concordância entre os testes sorológicos para <i>Leishmania</i> spp.....	50
4.10	Reação em cadeia pela polimerase para <i>Leishmania</i> spp em sangue e medula óssea	51
4.11	Avaliação do grupo de pacientes suspeitos de infecção sintomática por <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	54
5	Discussão.....	56
5.1	Representatividade da amostra.....	56
5.2	Necessidade de um padrão-ouro para a definição da infecção assintomática.....	57
5.3	Avaliação da especificidade dos testes em pessoas vivendo com HIV/aids e sintomas de LV.....	59
5.4	Limitações inerentes ao tipo de estudo.....	59
5.5	Padronização da PCR.....	60
5.6	Estimativa da prevalência da co-infecção <i>Leishmania</i> /HIV.....	60
5.7	Concordância entre os testes sorológicos.....	61
5.8	Fatores potencialmente associados com a positividade da sorologia para <i>Leishmania</i>	62
5.9	Interpretação da positividade global baseada na combinação dos três métodos sorológicos.....	63
5.10	Utilidade da PCR gênero-específica para a região conservada do k-DNA.....	66
5.11	Perspectiva.....	66
6	Conclusões.....	68
7	Referências bibliográficas.....	69
	Anexo 1 – Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.....	80
	Anexo 2 – Ficha de coleta de dados.....	82
	Anexo 3 – Características individuais dos pacientes com a síndrome suspeita de leishmaniose visceral.....	87
	Anexo 4 – Características individuais dos pacientes com testes positivos para <i>Leishmania</i> spp.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de sensibilidade e especificidade de testes para o diagnóstico da leishmaniose visceral.....	12
Tabela 2 - Comparação de sensibilidades dos testes para diagnóstico da LV entre população geral e pacientes com HIV.....	14
Tabela 3 - Idade e gênero de 163 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	27
Tabela 4 - Estado civil, escolaridade e ocupação de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	29
Tabela 5 - Naturalidade de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	30
Tabela 6 - Conhecimento sobre o vetor de leishmaniose e casos de LV humana e canina avaliado em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	31
Tabela 7 - Doenças não-infecciosas relatadas por 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	32
Tabela 8 - Antecedente de doenças infecciosas em 163 pacientes com HIV/aids acompanhados no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	33
Tabela 9 - Categorias de exposição e orientação sexual de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	34
Tabela 10 - Estágio da doença e contagem atual de células T CD4+ em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	35

Tabela 11 - Valores de carga viral do HIV em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	36
Tabela 12 - Uso de antiretrovirais em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	37
Tabela 13 - Doenças indicadoras de imunodeficiência relatadas em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	38
Tabela 14 - Estimativa da prevalência da co-infecção HIV/ <i>Leishmania</i> , utilizando vários testes diagnósticos em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	38
Tabela 15 - Características associadas à reatividade no teste de Imunofluorescência indireta - RIFI em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	39
Tabela 16 - Características associadas à reatividade segundo o método de ELISA com antígeno bruto de <i>L. chagasi</i> em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	43
Tabela 17 - Características associadas á reatividade segundo o método de ELISA com antígeno rK39 em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	45
Tabela 18 - Características associadas à reatividade a qualquer método sorológico em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	48
Tabela 19 - Concordância entre os testes sorológicos aplicados para o diagnóstico da infecção por <i>Leishmania</i> spp., em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	51

Tabela 20 - Características associadas à positividade ao teste de PCR para *Leishmania* spp. em sangue em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....52

Tabela 21 - Características dos pacientes com a síndrome suspeita de leishmaniose visceral avaliados entre 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....88

Tabela 22 - Características dos pacientes com testes positivos para *Leishmania* spp entre 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....90

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Gráfico 1 - Comparação das medianas das idades segundo gênero de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	28
Gráfico 2 – Unidade federada de residência de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	31
Gráfico 3 - Intervalo de tempo entre o diagnóstico confirmado da infecção pelo HIV e a avaliação atual em 163 pacientes acompanhados no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	34
Gráfico 4 - Distribuição segundo a faixa etária e o resultado da reação de ELISA com antígeno bruto de <i>L. (L.) chagasi</i> em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	42
Gráfico 5 - Sinais e sintomas dos pacientes sintomáticos (n=7) identificados entre 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	55
Figura 1 - Fotografia do gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, contendo as amostras positivas na reação em cadeia pela polimerase, identificados entre 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
aids	Síndrome de imunodeficiência adquirida
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CV	Carga viral do HIV
DAT	Teste de aglutinação direta
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
ELISA	Ensaio de imuno-absorbância associado a enzimas
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IL	Interleucina
IP	Inibidores de protease
ITRN	Inibidores de transcriptase reversa nucleotídeos
ITRNN	Inibidores de transcriptase reversa não nucleotídeos
LACEN	Laboratório central
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
NNN	Novy-McNeal-Nicolle
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PNDST/Aids	Programa Nacional de DST/Aids do Ministério da Saúde do Brasil
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
TARV	Terapia anti-retroviral
TB	Tuberculose
TNF	Fator de necrose tumoral
UDI	Usuários de drogas intravenosas

UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas para o HIV/Aids
SINAN	Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde

RESUMO

Foi realizado um estudo descritivo transversal com o objetivo de estimar a magnitude da co-infecção *Leishmania*/HIV em pessoas vivendo com HIV/aids atendidos no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário de Brasília. Foram incluídos no estudo 163 indivíduos, dos quais, sete apresentavam a síndrome clínica sugestiva de leishmaniose visceral e 156 eram assintomáticos em relação a essa síndrome. Após aceitação e assinatura do termo de consentimento, os pacientes foram submetidos à entrevista, exame clínico e coleta de sangue periférico para detecção da infecção por *Leishmania* spp. Os pacientes com a síndrome sugestiva de leishmaniose visceral foram submetidos também ao aspirado de medula óssea. O sangue coletado foi avaliado por meio das técnicas de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA com antígeno bruto de *L. chagasi* (ELISA), ELISA com antígeno rK39 (rK39) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) com alvo de amplificação de 120 pares de bases da região conservada do k-DNA. Os espécimes de medula óssea foram submetidos ao exame direto em lâminas coradas pelo Giemsa, cultura para *Leishmania* e PCR. Vinte e seis pacientes (16%) apresentaram resultado positivo nas provas sorológicas. A positividade foi de 2,4% pela RIFI; 12,3% pelo ELISA; e 4,9% pelo rK39. A PCR do sangue periférico foi positiva em 1,8% dos pacientes. Nenhum dos pacientes sintomáticos teve resultados positivos no material obtido da medula óssea. A exploração de prováveis fatores associados com a positividade dos testes aplicados não revelou associação com: gênero, exposição prévia a área endêmica de leishmaniose, história de casos de leishmaniose visceral no grupo familiar ou na vizinhança e uso de drogas injetáveis. Observou-se associação estatisticamente significativa entre ter pelo menos um teste positivo e ser mais jovem (33 versus 39 anos; $p=0,005$); ter sorologia positiva para doença de Chagas ($p=0,029$); não ter evoluído para aids ($p=0,004$); não estar em uso de tratamento antiretroviral ($p<0,001$); e apresentar uma intercorrência infecciosa no momento da coleta do sangue para a avaliação sorológica. O estudo mostrou a importância da co-infecção *Leishmania*/HIV na amostra avaliada, em uma região que não era considerada até o ano de 2005 como área endêmica de leishmaniose visceral e que apresenta unicamente casos esporádicos de leishmaniose tegumentar. Provavelmente o teste de ELISA com antígeno bruto de *Leishmania chagasi* seja o que apresente maior potencial como teste de triagem para a detecção sensível de indivíduos co-infectados, no entanto, a especificidade do ensaio principalmente em pacientes com co-infecção por *Trypanosoma cruzi* e outras doenças causadas por micobactérias possa estar comprometida. A complexidade da técnica de PCR e sua baixa

positividade nos casos assintomáticos ou subclínicos de co-infecção *Leishmania*/HIV limitam o seu uso como teste de triagem para a detecção sensível desta condição.

ABSTRACT

In order to estimate the magnitude of *Leishmania*/HIV co-infection, it was conducted a transversal study in people living with HIV/AIDS assisted at the outpatient Infectious and Parasitic Diseases Clinic of the Brasilia University Hospital. One hundred sixty-three patients were enrolled, seven of whom presented the clinical syndrome suggestive of visceral leishmaniasis and 156 were asymptomatic. After acceptance and signature of the informed consent, patients were submitted to a structured interview, clinical examination and collection of venous peripheral blood to detect the infection by *Leishmania* spp. Patients with suspicion of visceral leishmaniasis were submitted to bone marrow aspiration. The collected blood was evaluated by means of Indirect immunofluorescence test (IFAT), ELISA using soluble antigen of *Leishmania chagasi* (ELISA), ELISA with rK39 antigen (rK39) and polimerase chain reaction (PCR) targeted to a k-DNA conserved region of 120 bp. Bone marrow aspirate was submitted to direct examination in smears stained by Giemsa, culture for *Leishmania* and PCR. Twenty-six patients (16%) had positive serologic tests. The positivity was 2.4% by IFAT; 12.3% by ELISA; and 4,9% by rK39. PCR in blood was positive in three patients (1.8%). None of the symptomatic patients had positive results in bone marrow. The exploration of probable factors associated with the positivity of the applied tests did not revealed associations with: gender, previous exposition to visceral leishmaniasis endemic area, history of relatives or neighbors with visceral leishmaniasis, neither history of intravenous drug abuse. Significant statistical association was observed among positive tests and younger age (33 vs 39 years old; $p=0,005$); positive serologic test for Chagas disease ($p=0,029$); non-AIDS disease stage ($p=0,004$); non-use of antiretroviral therapy ($p<0,001$); and the presence of an infectious intercurrent at the moment of blood collection. The study demonstrated the importance of *Leishmania*/HIV co-infection in the assessed sample, in a region that was not considered as endemic area for visceral leishmaniasis until 2005, and only sporadic cases of cutaneous leishmaniasis in the last decades. The ELISA performed with soluble antigen of *L.chagasi* seems to be the method with the greater potential for the sensitive screening in order to detect *Leishmania*/HIV co-infected individuals. However, the specificity could be jeopardized in patients co-infected with *Trypanosoma cruzi* and other diseases caused by mycobacteria. The complexity and low positivity of PCR in the asymptomatic cases of *Leishmania*/HIV co-infection limit its use as screening of this condition.

RESUMEN

Fue realizado un estudio descriptivo transversal con el objetivo de estimar la magnitud de la co-infección *Leishmania*/HIV en personas viviendo con HIV/SIDA atendidas en el Consultório de Enfermedades Infecciosas y Parasitárias del Hospital Universitário de Brasília. Fueron incluidos 163 individuos, de los cuales siete presentaban el síndrome clínico sugestivo de leishmaniasis visceral y 156 eran asintomáticos en relação al síndrome. Luego de la aceptación y firma del término de consentimiento, los pacientes fueron sometidos a entrevista, examen clínico y colecta de sangre periférica para detección de la infección por *Leishmania* spp. Los pacientes con el síndrome sugestivo de leishmaniasis visceral fueron sometidos también a aspirado de médula ósea. La sangre colectada fue evaluada por medio de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (RIFI), ELISA con antígeno bruto de *L. chagasi* (ELISA), ELISA con antígeno rK39 (rK39) y reacción en cadena de polimerasa (PCR) dirigida a amplificar 120 pares de bases de la región conservada del k-DNA. Las muestras de médula ósea fueron sometidas a examen directo em láminas teñidas con Giemsa, cultivo para *Leishmania* y PCR. Veintiseis pacientes (16%) presentaron resultado positivo en las pruebas serológicas. La positividad fue de 2,4% para RIFI; 12,3% para ELISA; y 4,9% para rK39. La PCR en sangre periférica fue positiva en 1,8% de los pacientes. Ningún paciente sintomático tuvo resultados positivos en médula ósea. La exploración de probables factores asociados con la positividad de las pruebas aplicados no reveló asociación con género, exposición previa a área endêmica de leishmaniasis visceral, historia de casos de leishmaniasis visceral en el grupo familiar o en la vecindad y uso de drogas inyectables. Se observó asociación estadísticamente significativa entre tener por lo menos una prueba positiva y ser más joven (33 vs 39 años; $p=0,005$); tener serología positiva para enfermedad de Chagas ($p=0,029$); no haber desarrollado SIDA ($p=0,004$); no estar en uso de tratamiento antiretroviral ($p<0,001$); y presentar una intercorrelación infecciosa concomitante a la obtención de sangre venosa para la evaluación. El estudio mostró la importancia de la co-infección *Leishmania*/HIV en la muestra evaluada, en una región que no era considerada hasta el año 2005 como área endêmica de leishmaniasis visceral y que presenta únicamente casos esporádicos de leishmaniasis cutánea. Probablemente, la prueba de ELISA con antígeno bruto de *L. chagasi* sea la que presente el mayor potencial como método de tamizaje para la detección sensible de individuos co-infectados, sin embargo, la especificidad de la prueba principalmente en pacientes con co-infección por *Trypanosoma cruzi* y otras enfermedades causadas por micobacterias puede estar comprometida. La complejidad de la técnica de PCR y su baja

positividad en los casos asintomáticos de co-infección *Leishmania*/HIV limitan su uso como método de tamizaje para la detección sensible de esta condición.

1 Introdução

Em 1903, Leishman e Donovan descreveram em relatos separados o protozoário hoje denominado *Leishmania (Leishmania) donovani*, observado no tecido esplênico de pacientes da Índia com uma doença que comprometia a vida dos afetados, a leishmaniose visceral⁽¹⁾.

A Leishmaniose visceral (LV) - também conhecida como calazar - é uma doença infecciosa de característica zoonótica causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. O gênero *Leishmania* é o mais complexo dentre os parasitos eucariontes que infectam o homem considerando a sua diversidade genética⁽²⁾. Nos últimos dez anos, apesar dos recursos de tratamento intensivo e das rotinas estabelecidas para o tratamento específico da LV, constatou-se aumento na letalidade da doença em diversas regiões do Brasil⁽³⁾.

1.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos

A LV é um problema de saúde pública mundial. Estima-se incidência anual de 600.000 casos e que 350 milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair a infecção^(4,5). A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata a presença da LV em 65 países, 34 dos quais também relataram a co-infecção com o vírus de imunodeficiência humana (HIV)⁽⁶⁾. As maiores taxas de prevalência são encontradas na América do sul, África central, sul europeu e no subcontinente indiano. A maioria (90%) dos casos de LV ocorrem nas áreas pobres e suburbanas de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil⁽⁵⁾.

Presente no mundo todo com exceção de Oceania e a Antártica, as espécies predominantes variam segundo a localização geográfica. Nas Américas 90% dos casos acontecem no Brasil⁽⁷⁾, onde a doença é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Na bacia mediterrânea - envolvendo o sul europeu, África do norte e oriente médio - a espécie responsável é a *Leishmania (Leishmania) infantum*; enquanto na Ásia e na África central ocorre a espécie *Leishmania (Leishmania) donovani*.

A doença é transmitida pela picada da fêmea de flebotomos dos gêneros *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* nas Américas. No Brasil, a principal espécie identificada como vetora é a *Lutzomyia longipalpis*. Recentemente a *Lutzomyia cruzi* foi identificada como vetor potencial de *L. (Leishmania) chagasi*⁽⁸⁾. Na Europa, descreveu-se um novo tipo de transmissão associada ao compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas injetáveis

(UDI). Esta categoria de exposição também está associada à transmissão do HIV na região do mediterrâneo europeu, o que aumentou a frequência de indivíduos co-infectados com *Leishmania*/HIV.^(9, 10) Este fato modificou o ciclo de transmissão da LV, convertendo-a em uma doença antroponótica entre usuários de drogas intravenosas, onde o próprio homem é o reservatório do parasito^(11, 12). Entre pacientes portadores do HIV e *Leishmania (Leishmania) infantum*, a capacidade para infectar flebótomos é maior do que entre pacientes não infectados pelo vírus, sendo a infectividade inversamente proporcional à contagem de células T CD4+⁽¹³⁾.

Os seres humanos são os únicos reservatórios para a *L. (L.) donovani*, enquanto os canídeos, especialmente os cães domésticos, são reservatórios para a *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, fazendo mais difícil o seu controle. Vários mamíferos foram identificados como reservatórios da doença. Os cães foram inicialmente descobertos como reservatórios no sul europeu e são considerados reservatórios importantes em outros lugares do mundo, junto com outros canídeos⁽¹⁴⁾. Os roedores são os principais reservatórios da doença na África central⁽¹⁵⁾.

Enquanto a doença é usualmente letal quando sintomática e não-tratada ou tratada tardiamente⁽¹⁶⁾, os indivíduos residentes em áreas endêmicas são expostos precocemente à infecção, resultando frequentemente em infecções subclínicas ou assintomáticas. O espectro da LV compreende quatro tipos de quadros^(3, 17, 18).

- a. Assintomática, identificada unicamente por provas sorológicas reagentes.
- b. Infecção subclínica ou oligossintomática que se apresenta como quadro inespecífico de mais de três semanas de duração, caracterizado por febre, tosse, mal-estar, diarreia, hepatomegalia e eventualmente esplenomegalia discretas. Alguns pacientes desenvolvem alterações laboratoriais inespecíficas e pouco significativas. Este quadro apresenta uma evolução flutuante por vários meses ou anos, podendo regredir sem tratamento, embora alguns indivíduos evoluam para a forma clássica.
- c. LV clássica, com a tríade de hepatoesplenomegalia, febre e citopenias.
- d. LV grave que geralmente inclui os sinais e sintomas da forma clássica na presença de qualquer um dos seguintes fatores considerados de mau prognóstico: idade inferior a seis meses ou superior a 65 anos; desnutrição grave; co-morbidades; ou pelo menos uma das seguintes manifestações clínicas: icterícia, fenômenos hemorrágicos, edema generalizado, ou sinais de toxemia como letargia, má

perfusão, cianose, taquicardia ou bradicardia, hipo ou hiperventilação e instabilidade hemodinâmica.

Um estudo realizado em 1986 com 86 crianças com sorologia positiva para *Leishmania* morando em área endêmica da Bahia⁽¹⁸⁾ mostrou que 23,2% dos pacientes permaneceram assintomáticos, 17,4% desenvolveram quadro clínico com escassez de sintomas, 15,1% evoluíram para a LV clássica e 44,2% resolveram o quadro após 35 meses de observação.

Um estudo realizado em Israel entre pessoas assintomáticas mostrou soroprevalência de 2,97% nas áreas endêmicas e de 1,02% nas áreas consideradas não endêmicas⁽¹⁹⁾. Um estudo na Síria mostrou soroprevalência de 23,2% entre crianças de até seis anos⁽²⁰⁾. No Brasil, migrações intensas da população rural para a periferia das grandes cidades têm contribuído para o desenvolvimento de um perfil de transmissão periurbano e urbano da infecção. Em Teresina (Piauí), a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) realizada entre co-habitantes assintomáticos de casos índice de LV foi positiva em 7,4%⁽²¹⁾. A infecção pode ficar latente por anos e emergir clinicamente no contexto do desenvolvimento de imunodeficiência. Casos subclínicos da infecção são freqüentes entre pacientes portadores do HIV, variando entre 10 e 50% dependendo da prevalência da área avaliada^(22, 23).

Os fatores de risco para desenvolver a doença não são totalmente conhecidos. A maioria das infecções por parasitos causadores de LV é provavelmente assintomática, calculando-se entre 5-20% a percentagem dos infectados que desenvolvem a doença^(24, 25). Um estudo com crianças acompanhadas por 10 anos no nordeste brasileiro mostrou que 12% dos indivíduos desta faixa etária com evidência de infecção, medida pela soroconversão, desenvolveu a doença clínica⁽²⁶⁾. Acredita-se que existam de 30 a 100 indivíduos com infecção assintomática por cada caso de doença, sendo necessária a intensificação das atividades de vigilância, detecção precoce e tratamento oportuno dos casos. Os fatores de risco identificados para o desenvolvimento da doença são a exposição a elevada carga parasitária no momento da picada, idade precoce, pobreza e desnutrição^(27, 28). Vários estudos, entre eles um estudo realizado no nordeste brasileiro têm identificado predisposição genética à doença⁽²⁹⁻³¹⁾. Outros fatores sociais como urbanização, desmatamento e migração; e climáticos, tais como a escassez de alimento devido à seca após o fenômeno de “El Niño”, têm sido identificados como fatores que aumentam a prevalência da LV^(32, 33). Entre pacientes vivendo com HIV, os casos de LV são mais freqüentes entre homens, usuários de drogas endovenosas e aqueles que já desenvolveram aids^(22, 34). Nestes pacientes, o uso de terapia antiretroviral (TARV) mostrou-se como fator protetor contra a LV⁽³⁵⁾.

Depois do período de incubação, que varia entre 10 dias a 24 meses (média de 2 a 6 meses)⁽⁷⁾, a LV apresenta-se como um quadro febril, levando à perda gradual de peso, tosse, dor abdominal, diarreia, visceromegalias, citopenias e hipergammaglobulinemia⁽¹⁰⁾. Devido à diversidade de manifestações clínicas e à capacidade de produzir pancitopenia, a morte pode ocorrer por complicações infecciosas ou hemorrágicas.

1.2 Situação da epidemia de HIV/aids

Após 25 anos de ter sido descrita pela primeira vez, a pandemia do HIV/aids já excedeu todas as expectativas na severidade e impacto. Descrita inicialmente entre homens que fazem sexo com homens (HSH), negros, e migrantes haitianos na América do Norte; a infecção mostrou que não respeita limites de sexo, origem, raça, nacionalidade nem condição sócio-econômica⁽³⁶⁾.

Segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas para o HIV/aids (UNAIDS), até dezembro de 2005 a estimativa era de 40.300.000 de pessoas vivendo com HIV/aids, com intervalo entre 36,7 e 45,3 milhões. Destes, 94,3% (43,4% mulheres e 50,9% homens) seriam adultos e o restante crianças. Segundo a mesma organização, no ano passado teriam sido infectados 4,9 milhões de pessoas, e teriam morrido 3,1 milhões de indivíduos infectados. O total das mortes relacionadas à infecção pelo HIV até 2005 estima-se em 25 milhões⁽³⁷⁾. Para América Latina, o número de casos estimados em 2003 era de 1,6 milhões e de 1,8 milhões em 2005. Pouco mais de um terço dos casos da América Latina ocorrem no Brasil.

Segundo o Programa Nacional de DST/Aids do Ministério da Saúde do Brasil (PNDST/Aids), o número de pessoas com aids oficialmente notificadas de 1980 até a 26ª semana epidemiológica de 2005 foi de 371.827, incluindo crianças e adultos. Porém, estima-se que existam cerca de 600.000 casos de pessoas infectadas pelo HIV, devido que a notificação é compulsória unicamente nos casos de aids, infecção em crianças e infecção em gestantes. A razão de masculinidade observada no Brasil é de 1,5. O número de óbitos registrados até 2004 é de 171.923. Os casos estão distribuídos em todas as regiões, principalmente no sudeste (63,1%) e sul (18%). A Região Centro-Oeste contribui com 5,7% dos casos registrados no país. No DF foram notificados 5005 casos de aids que correspondem a 23,7% do total notificado no centro-oeste até julho de 2005⁽³⁸⁾.

1.3 Co-infecção HIV/Leishmaniose visceral

O HIV infecta as células que expressam o receptor de superfície CD4, afetando principalmente linfócitos T, macrófagos e neurônios. O dano nas células responsáveis pela imunidade celular leva em média de 10 a 15 anos para desencadear um quadro de deficiência imune que aumenta a suscetibilidade a infecções que normalmente seriam controladas em pessoas com resposta imune competente⁽³⁹⁾. As infecções oportunistas ou sugestivas de imunodeficiência são causadas usualmente por microorganismos não patogênicos ou por patógenos que causam uma doença mais grave nos pacientes infectados pelo HIV quando comparada com a doença que provocam em indivíduos imunocompetentes⁽⁴⁰⁾. Ao afetar principalmente a resposta imune celular, a infecção pelo HIV favorece as infecções por vírus, parasitos e fungos. Poucas bactérias são consideradas oportunistas, com exceção das micobactérias. Algumas infecções por patógenos considerados persistentes possuem maior relevância já que apresentam um risco importante de reativação na vigência da imunodeficiência causada pelo HIV. Neste grupo, encontram-se as infecções por micobactérias, herpesvírus, *Toxoplasma gondii* e espécies de *Leishmania*.

Há uma década, a LV tem recebido maior atenção, como resultado da emergência do parasito como patógeno oportunista entre pacientes infectados pelo HIV⁽¹⁵⁾. A pandemia de HIV/aids nos últimos 20 anos tem modificado o espectro clínico da infecção por *Leishmania* spp., em diferentes aspectos⁽⁴¹⁾. Em 1997, a OMS relatou a ocorrência da co-infecção em 33 países. Na Europa, de 25-70% de casos adultos de LV acontecem entre pacientes com HIV⁽⁴²⁾. Também foi relatado que entre 1,5-9% de pacientes com HIV desenvolvem LV, seja primoinfecção ou re-infecção. Embora relatado que cerca de 85% dos co-infectados moram na Europa⁽¹⁰⁾, no Brasil, assim como na África central, na Índia e no Nepal as duas infecções se superpõem e a magnitude do problema não é conhecida.^(43, 44) Na Espanha, a LV é a quarta doença parasitária oportunista em pacientes vivendo com HIV/aids⁽³⁵⁾; depois da pneumocistose, a toxoplasmose e a criptosporidiose⁽⁴¹⁾. Nesse país, um estudo mostrou que 91,7% dos pacientes na faixa de 21-60 anos com LV atendidos em um grande hospital, também encontravam-se infectados pelo HIV⁽¹⁶⁾. A interação entre as duas doenças tem conseqüências funestas, com letalidade até cinco vezes maior entre os co-infectados e maior dificuldade de diagnóstico^(16, 44). A LV acelera a progressão da infecção pelo HIV para aids, e diminui a sobrevivência dos pacientes^(16, 45). Por outro lado, o HIV incrementa a possibilidade de desenvolver LV de 10-100 vezes em áreas endêmicas e aumenta as probabilidades de recaída^(10, 12). Esta última situação acontece entre 25-61% dos pacientes com HIV entre 6-12 meses do tratamento, respectivamente^(46, 47). Na Espanha foi mostrado que 7,5% dos casos

diagnosticados como recaídas de LV foram na realidade re-infecções⁽⁴⁸⁾. Dos pacientes com HIV que desenvolvem LV, 62 a 100% apresentam níveis de linfócitos T CD4+ menores do que 200 células/mm³^(12, 45)

A infecção pelo HIV e a LV podem causar sinais e sintomas semelhantes. Esta falta de especificidade dos achados clínicos dificulta o diagnóstico da co-infecção. Vale salientar que as manifestações pouco comuns da LV, tais como o acometimento de trato gastrointestinal, trato respiratório e pele podem também ser confundidas com as manifestações de outras doenças oportunistas frequentes na aids.^(11, 49) São descritos achados do parasito em lesões dérmicas de sarcoma de Kaposi, herpes zoster e em lesões similares a dermatomiosite⁽⁵⁰⁾. Com o aumento do número de pessoas imunossuprimidas, especialmente pelo uso difundido de imunossupressores e da infecção pelo HIV, são descritas espécies de *Leishmania* não-viscerotrópicas acometendo vísceras.^(51, 52) Estas localizações atípicas são consequência da disseminação parasitária e do defeito na imunidade celular, mostrando compromisso de diversos órgãos, como pele, mucosas, trato gastrointestinal, peritônio, laringe, pulmões, sinóvia, rins e até o cérebro^(45, 52). Entre 10-30% de todos os pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV são diagnosticados após a identificação de *Leishmania* em localizações atípicas^(53, 54). Este comportamento clínico é mais frequente em pacientes com imunodeficiência mais grave, considerando a contagem de células T CD4+^(54, 55). É interessante mencionar que um dos poucos casos de leishmaniose dérmica pós-calazar relatados na América do Sul foi descrito em um paciente com HIV⁽⁵⁶⁾. Embora algumas series mencionem que a esplenomegalia é menos frequente entre os pacientes vivendo com HIV/aids^(41, 50), a maioria dos autores concorda que as manifestações clínicas são semelhantes àquelas apresentadas nos indivíduos sem infecção pelo HIV^(44, 57, 58). De acontecer este fato, poderia trazer dificuldades diagnósticas, já que o método de diagnóstico parasitológico direto apresenta maior sensibilidade quando o material utilizado é o aspirado esplênico. Alguns estudos têm observado que a frequência e grau de citopenia são maiores em pacientes com aids^(16, 45, 59, 60).

A interação da *Leishmania* e o HIV em uma mesma célula (macrófago) induz a transcrição e liberação de vírus na circulação, mediado pelo aumento de TNF α e IL1 α ⁽⁶⁾. A redução do número de linfócitos T CD4+ leva à falta de reconhecimento dos antígenos da *Leishmania* para estimular linfócitos B. Isto leva à falha de ativação policlonal contínua das células B, que acontece nos indivíduos imunocompetentes⁽⁵⁹⁾. Desta maneira, explica-se a elevada frequência de resultados falso-negativos dos métodos de detecção por anticorpos em pacientes co-infectados. A inibição das respostas proliferativas de linfócitos e da produção de

anticorpos contra *Leishmania* spp., mediadas pelo HIV favorecem a disseminação do parasito, permitindo localizações atípicas e explicando a elevada carga parasitária. Especificamente, a diminuição da resposta imune celular diminui a utilidade dos testes de reação intradérmica a antígeno de *Leishmania* para o diagnóstico da LV em pacientes com aids⁽⁴¹⁾.

Como comentado acima, a própria infecção pelo HIV pode manifestar-se com a sintomatologia e sinais clínicos da LV, dificultando a detecção desta última⁽³¹⁾. O impacto real da co-infecção *Leishmania*-HIV é provavelmente subestimado pela falta de vigilância e notificação adequada dos casos⁽⁴¹⁾. No Brasil, segundo o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) são 211 casos de co-infecção entre os anos 2000 e 2004⁽⁶¹⁾. Na Espanha, entre 13-47% de pacientes com HIV apresentam a LV como primeira infecção grave⁽¹⁶⁾. O advento da TARV altamente ativa tem provocado a queda da incidência da LV, como mostrado em dois estudos europeus. Na França, observou-se queda de $11,6 \pm 1,2$ episódios por 10.000 pessoas/ano antes de 1996, para $6,7 \pm 0,7$ episódios por 10.000 pessoas/ano depois de 1996, quando começou a ser utilizada TARV nesse país⁽³⁴⁾. Na Espanha, houve queda de 1,68 por 100 pessoas/ano para 0,58 por 100 pessoas/ano⁽³⁵⁾. Embora o saquinavir e o indinavir mostrem atividade leishmanicida in vitro⁽⁶²⁾, a TARV nem sempre previne a recaída nos pacientes com aids, portanto, alguns autores recomendam a profilaxia secundária da parasitose mesmo em pacientes em uso de TARV^(16, 63-65), mas esta conduta não é consenso pela ausência de estudos clínicos controlados que evidenciem o benefício da profilaxia⁽⁶⁶⁾.

1.4 Diagnóstico da leishmaniose visceral

O diagnóstico da LV é um problema importante ainda sem solução, por vários motivos. As técnicas de maior sensibilidade requerem pessoal com experiência e/ou equipamento complexo, difíceis de serem encontrados em áreas endêmicas. É nestas áreas onde estes métodos são mais necessários, mas ao mesmo tempo menos disponíveis. Este fato retarda o diagnóstico, o que pode ser fatal para os pacientes. Um estudo na Índia estimou o tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo em 7,7 meses⁽¹⁰⁾.

1.4.1 Demonstração e isolamento do parasito

O diagnóstico da LV é até hoje baseado na demonstração do parasito nos tecidos do doente, seja por meio do exame microscópico direto ou do isolamento em cultura⁽⁶⁷⁾. Os parasitos na forma de amastigotas são observados no citoplasma de macrófagos e monócitos, em preparações coradas com Giemsa ou Leishman, e observados sob microscópio de imersão.

O aspirado esplênico apresenta a maior sensibilidade, de 98%⁽¹⁵⁾, mas a dificuldade técnica e operacional para realizar com segurança o procedimento limitam sua utilização. Este procedimento é arriscado e não isento de graves complicações, principalmente quando se pratica em pacientes imunossuprimidos e trombocitopênicos. O aspirado esplênico apresenta algumas contra-indicações, de modo que podem ser necessárias algumas precauções como fazer o procedimento com guia ecográfica, observar a gravidade da plaquetopenia e as alterações das provas de coagulação, assim como ter disponíveis concentrados de plaquetas e uma sala cirúrgica em caso de sangramento inesperado. As complicações, quando ocorrem, costumam ser graves. Por conta dos riscos da punção de vísceras sólidas intra-abdominais, o lugar preferido para a coleta de material é a medula óssea que tem sensibilidade de 60-70% em adultos e de até 90% em crianças e doentes maciçamente infectados⁽⁶⁸⁾, e que em algumas ocasiões requer múltiplos aspirados. Em pacientes soropositivos para o HIV, devido à hipoplasia e às alterações fibróticas da medula óssea na fase avançada de imunodeficiência, o rendimento do aspirado medular diminui para 83,3%, apesar da carga parasitária ser elevada⁽⁴⁹⁾. Este valor é menor quando comparado ao rendimento entre pacientes imunossuprimidos por outras causas e os doentes graves sem imunodeficiência. A sensibilidade dos métodos de diagnóstico parasitológico em pacientes com HIV é menor em situações de recaída. Este tipo de método não é adequado para utilização rotineira em condições de atendimento com poucos recursos laboratoriais e de suporte clínico, pois implica procedimentos invasivos, experiência por parte do médico e tempo prolongado para seu processamento, no caso da inoculação em animais de laboratório ou em meio de cultura⁽³³⁾. A utilização de métodos invasivos para o diagnóstico é considerada pouco prática quando é preciso avaliar grandes surtos ou acompanhar a evolução dos pacientes⁽²³⁾.

Em pacientes vivendo com HIV, devido à elevada carga parasitária, o exame direto de sangue periférico ou sua cultura são úteis no diagnóstico da LV sintomática⁽¹¹⁾. O achado de parasitos no sangue periférico é pouco usual em pacientes sem imunodeficiência e está associado ao risco confirmado de disseminação da doença entre UDI e ao risco potencial de transmissão por meio de vetores tendo como fonte alimentar o reservatório humano⁽³³⁾. A identificação de amastigotas de *Leishmania* em sangue periférico permitiu o diagnóstico de até 50% dos casos em algumas séries^(69, 70). Já na avaliação da LV subclínica entre pacientes com HIV, a sensibilidade baixa para 7,7%⁽²³⁾. Quando utilizada a camada leucocitária, o rendimento da hemocultura em médio Novy-McNeal-Nicolle chega a 70%⁽⁷¹⁾.

1.4.2 Diagnóstico sorológico

Entre pacientes com LV, são observados altos níveis de anticorpos antes da resposta de células T⁽⁷²⁾. Esta resposta humoral tem sido explorada para o diagnóstico da doença em pacientes imunocompetentes, mediante a sorologia, com resultados alentadores. Como já comentado no caso do diagnóstico parasitológico das pessoas vivendo com HIV/aids, o diagnóstico sorológico é ainda mais difícil nesse grupo⁽⁵⁹⁾. Embora alguns estudos mostrem sensibilidade similar da sorologia quando comparada à população sem a infecção pelo HIV^(73, 74), a maioria de estudos em pessoas vivendo com HIV mostram que só a metade deles apresentam resultados reagentes^(16, 41, 75). Os pacientes com resultados positivos correspondem àqueles com contagens maiores de linfócitos T CD4⁺⁽⁴¹⁾. Até um quinto dos pacientes co-infectados mostram resultados negativos em todos os testes sorológicos⁽¹²⁾. Por conta disso, em pacientes vivendo com HIV/aids, o padrão ouro para o diagnóstico da LV continua sendo o isolamento ou a visualização do parasito⁽⁴¹⁾.

No Brasil, a reação sorológica mais utilizada para o diagnóstico da LV é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) por ser a que está disponível na rede de atenção à saúde do Sistema Único de Saúde (SUS). A sensibilidade da RIFI é cerca de 100% e a especificidade de 98%. A RIFI mostrou sensibilidade e especificidade perto do 100% em um estudo brasileiro realizado entre pacientes sem infecção pelo HIV⁽⁷⁶⁾. Os resultados dos estudos realizados com a RIFI nas pessoas vivendo com HIV/aids mostram melhor rendimento quando comparados a outras provas sorológicas, porém existem estudos que apresentam resultados variáveis. Em alguns estudos realizados em pacientes com HIV, a sensibilidade baixou para 11-64%^(16, 49, 59). A RIFI em pacientes imunossuprimidos por causas distintas ao HIV apresentam sensibilidade similar⁽⁴⁹⁾. O valor da RIFI no acompanhamento dos pacientes é baixo, pois as variações de título diferem muito entre os sujeitos e as reações tendem a permanecer positivas por muitos anos após a cura clínica.

O teste de aglutinação direta (DAT), baseado na aglutinação de promastigotas inteiras lisadas com tripsina, é usado para medir anticorpos contra antígeno bruto (total) de *Leishmania*. Esta prova apresenta sensibilidade acima de 91% entre pessoas não infectadas pelo HIV^(33, 77), com especificidade de 72-100%^(42, 78). Alguns autores recomendam este método em substituição do diagnóstico parasitológico em estudos de campo em áreas endêmicas⁽⁷⁹⁾. Entre pacientes com co-infecção a sensibilidade é menor, mas a diferença não é significativa, razão pela qual continua a ser realizada em alguns locais⁽⁸⁰⁾. Problemas importantes para a difusão deste teste são: a necessidade de cadeia de frio para o armazenamento dos antígenos⁽⁵⁾; o custo elevado; a variabilidade das espécies entre

continentes; e a variabilidade entre os próprios lotes do kit⁽⁶⁷⁾. Uma inovação neste teste é a utilização do antígeno liofilizado que é termoestável, facilitando seu uso no campo⁽⁵⁰⁾. O teste não diferencia entre pacientes com a doença ativa de portadores assintomáticos ou pacientes curados, não sendo útil para o acompanhamento⁽³³⁾.

Um tipo de *Western blot* específico para diagnóstico de *Leishmania* spp., mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 73% quando foram avaliados soros de pacientes vivendo com HIV, resultados menores do que os observados em pacientes imunocompetentes. Nestes últimos, a especificidade e a sensibilidade mostram-se próximas a 100%. Além disso, este teste não apresenta reações cruzadas com malária, tuberculose, tripanossomíase africana e leishmaniose cutânea⁽⁸¹⁾.

O teste de ELISA é usado como ferramenta de diagnóstico sorológico da LV. A técnica é altamente sensível e a especificidade depende do antígeno utilizado. Vários antígenos têm sido testados^(33, 50, 82). O mais comum é o antígeno bruto, derivado do lisado de promastigotas de *Leishmania* spp. Sua sensibilidade varia entre 80-100%, mas apresenta reações cruzadas em pacientes com malária, tuberculose e toxoplasmose^(33, 42). Um estudo feito em São Paulo com uma pequena amostra de pacientes co-infectados com *Leishmania*/HIV (n=5) mostrou reatividade ao ELISA com antígeno bruto de *L. major* em todos os pacientes. Quando aplicado o mesmo teste entre 91 pacientes infectados da Região Nordeste, a positividade foi observada em 91%⁽⁸³⁾.

O antígeno rK39 -antígeno de 39 aminoácidos pertencente à superfamília das cinesinas, proteínas motoras da *Leishmania* spp.- foi identificado originalmente em culturas de *Leishmania (L.) chagasi* e tem mostrado ótimo rendimento quando utilizado na sorologia⁽⁷²⁾. Além disso, possui vantagens de apresentar menos reações cruzadas nos casos de tuberculose⁽⁸⁴⁾, malária, hanseníase, doença de Chagas e leishmaniose cutânea^(72, 85). Atualmente conta-se com um teste rápido em formato de imunocromatografia desenhado em forma de fita.⁽⁸⁴⁾ A detecção de anticorpos tipo IgG em ensaios de ELISA com antígeno rK39 mostrou inicialmente em pacientes com LV na Índia sensibilidade de 100% e especificidade de 98-100%^(33, 72). No Sudão, mostrou sensibilidade entre 67-92% e especificidade de 56%^(86, 87). Testado no Brasil, em Natal (RN) o teste de ELISA com antígeno rK39 mostrou sensibilidade de 94,7% e especificidade de 98,2%⁽⁸⁸⁾. Em pacientes de Montes claros (MG) e Vitória (ES), comparou-se o teste rápido de fita reagente com o ELISA com antígeno bruto de *L. (L.) chagasi*, mostrando sensibilidades de 90 e 89%, e especificidades de 100 e 98%, respectivamente. O padrão ouro nesse estudo foi a identificação do parasito, seja por exame direto ou mediante cultura⁽⁸⁵⁾. O rK39 como antígeno de um teste de ELISA mostrou em

pacientes com infecção pelo HIV sensibilidade de 71% na Índia⁽⁸⁹⁾ e 22% na Espanha⁽⁵⁹⁾. Os estudos com fita reagente têm mostrado sensibilidade de 67-100% e especificidade de 98-100%.^(72, 77, 84-86, 90) Os melhores resultados de sensibilidade foram observados no Nepal⁽⁷⁷⁾ e na Índia⁽⁸⁴⁾, e os piores no Sudão⁽⁸⁶⁾ e na Venezuela⁽⁹⁰⁾. Um outro estudo feito no Nepal mostrou sensibilidade similar aos anteriores, mas a especificidade foi de 71%⁽⁷⁸⁾. Os anticorpos contra o antígeno rK39 têm relação com a atividade da LV⁽⁹¹⁾, mostrando-se negativos ou fracamente positivos nos casos assintomáticos⁽⁸⁸⁾. Alguns autores sugerem sua utilização na decisão de tratar pacientes de áreas endêmicas sem a necessidade da demonstração parasitológica da LV⁽³³⁾. A necessidade de equipamento complexo, técnicos qualificados, acesso à fonte de energia elétrica e seu custo elevado não permitem ainda a ampla utilização das técnicas sorológicas⁽⁴²⁾.

Existem ainda testes que avaliam anticorpos contra *Leishmania* spp., em urina para o diagnóstico da LV. O ELISA em urina mostrou sensibilidade de 93,3% e especificidade de 97,3% nos testes iniciais⁽⁹²⁾. O mesmo pesquisador desenhou um teste de aglutinação em urina, que mostrou uma sensibilidade de 90,7% e especificidade de 96,4%⁽⁹³⁾. Estes testes mostraram valores similares aos realizados em soro e têm a vantagem de precisar do uso de uma amostra biológica de mais fácil obtenção do que sangue, principalmente em crianças.

1.4.3 Detecção de antígenos

Outro teste de fácil manipulação é o teste do látex (KATEX), que detecta antígenos de *Leishmania* spp. na urina mediante anticorpos monoclonais. Em animais de experimentação, a antigenúria foi observada desde uma semana após a infecção⁽⁹⁴⁾. Os testes mostram sensibilidade entre 68 e 100% e especificidade de 100%⁽³³⁾. Este teste poderia ser uma alternativa aos testes imunológicos entre pacientes imunossuprimidos, que apresentam resposta de anticorpos fraca⁽⁵⁰⁾. Um estudo que incluiu 206 pacientes (dois deles co-infectados com HIV), mostrou sensibilidade de 95% e especificidade de 100%⁽⁹⁵⁾. A eliminação urinária do antígeno diminui com o tratamento, podendo ter valor no acompanhamento da terapia. O desenvolvimento de um teste para detectar antígenos circulantes no sangue periférico encontra-se em processo de aprimoramento, devido que mostrou problemas de reações com autoanticorpos, complexos imunes circulantes e proteína amilóide⁽⁹⁶⁾.

A sensibilidade e a especificidade de alguns métodos diagnósticos para LV são descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de sensibilidade e especificidade de testes para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

Método	Tipo do Antígeno	Sensibilidade %	Especificidade %	Status HIV	Observações	Referência
Detecção de anticorpos						
Aglutinação direta	Ag bruto	90	96,7	Não avaliado	Área endêmica Sudão	Ziljstra,EE et al, 2001 ⁽⁸⁶⁾
Aglutinação direta	Ag bruto(<i>L.donovani</i>)	84	85	Não avaliado	Área endêmica Sudão	Veeken,H et al, 2001 ⁽⁸⁷⁾
Aglutinação direta	Ag bruto(<i>L.donovani</i>)	99	82	Não avaliado	Área endêmica Nepal	Chappuis,F et al, 2003 ⁽⁷⁸⁾
ELISA	Ag bruto(<i>L.donovani</i>)	98	68	Não avaliado	-	Badaro,R et al, 1996 ⁽⁹⁷⁾
ELISA	Ag bruto (<i>L. chagasi</i>)	95,6	65	Não avaliado	Área endêmica Brasil	Braz,RFS et al, 2002 ⁽⁸⁸⁾
ELISA	rK39 (<i>L. chagasi</i>)	99	100	Não avaliado	-	Badaro,R et al, 1996 ⁽⁹⁷⁾
ELISA	rK39 (<i>L. chagasi</i>)	93,3	98,8	Não avaliado	Área endêmica Brasil	Braz,RFS et al, 2002 ⁽⁸⁸⁾
ELISA	rLiP2a e rLip2b	40-50	100	Negativos	Área endêmica Espanha	Soto, M et al, 1996 ⁽⁸²⁾
Imunofluorescência	Ag bruto(<i>L. infantum</i>)	72	-	Positivos	-	Gari-Toussaint et al, 1994 ⁽⁹⁸⁾
Imunofluorescência	Ag bruto(<i>L. infantum</i>)	78	-	Positivos	-	WHO, 1995
Teste rápido em fita	rK39 (<i>L. chagasi</i>)	97	71	Não avaliado	Área endêmica Nepal	Chappuis,F et al, 2003 ⁽⁷⁸⁾
Teste rápido em fita	rK39 (<i>L. chagasi</i>)	92-93	59-70	Não avaliado	Área endêmica Sudão	Veeken,H et al, 2001 ⁽⁸⁷⁾
Teste rápido em fita	rK39 (<i>L. chagasi</i>)	67	96,7	Não avaliado	Área endêmica Sudão	Ziljstra,EE et al, 2001 ⁽⁸⁶⁾
Detecção de antígenos						
Aglutinação KATEX (em urina)	Usa anticorpo (<i>L. donovani</i>)	81,4	87,2-100	Não avaliado	Áreas endêmicas e não endêmicas	Attar,ZJ et al, 2001 ⁽⁹⁴⁾
Detecção de DNA						
PCR em sangue	-	91	100	Não avaliado	Área endêmica Brasil	Disch, J et al, 2003 ⁽⁹⁹⁾
PCR em sangue	-	100	100	Positivos	Área endêmica Itália	Bossolasco et al, 2003 ⁽⁴⁷⁾

1.4.4 Diagnóstico molecular

Há aproximadamente uma década, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) vem despertando interesse no diagnóstico de diversas doenças infecciosas⁽¹⁰⁰⁾, entre elas a LV⁽¹⁵⁾. Seu uso é desprovido das complicações dos procedimentos invasivos, pois é possível realizá-la utilizando sangue periférico e outros tecidos^(101, 102). A detecção de DNA parasitário persistente em um paciente tratado tem sido utilizada como provável marcador do risco de recaída após a cura inicial⁽¹⁵⁾. Quando avaliado como nested-PCR para *Leishmania* em pacientes com HIV/aids, mostrou sensibilidade de 95,45% em sangue periférico e de 100% em medula óssea⁽¹⁰³⁾. No Brasil, utilizando iniciadores (*primers*) para a amplificação de uma região conservada de DNA do cinetoplasto, o teste mostrou resultados similares aos obtidos em outros países⁽⁹⁹⁾. Baseados nesta mesma tecnologia, atualmente é possível avaliar a carga parasitária usando técnicas sofisticadas de PCR-ELISA⁽¹⁰⁴⁾ e PCR em tempo real⁽¹⁰⁵⁾. Por não precisar de procedimentos invasivos para a obtenção das amostras, ser de rápido processamento, ser muito sensível e ter potencial para a avaliação da resposta ao tratamento e a predição de recaídas^(47, 101, 106), a PCR constitui-se em um método promissor para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com LV.

A PCR é mais sensível do que o uso combinado de várias técnicas convencionais no diagnóstico de LV subclínica, provavelmente porque os pacientes com infecção subclínica possuem cargas parasitárias relativamente baixas, geralmente indetectáveis com as técnicas convencionais. O teste de PCR-ELISA é mais sensível do que os testes tradicionais de PCR, alcançando sensibilidade e especificidade de 100%, mesmo em pacientes infectados pelo HIV^(104, 107). O exame pode ser feito em sangue periférico, o que evita procedimentos invasivos, prevenindo riscos e complicações⁽¹⁰⁷⁾. Além disso, a través de análise de variabilidade genética, é possível fazer o acompanhamento epidemiológico dos casos, no intuito de diferenciar as recaídas causadas por falhas do tratamento ou por cepas resistentes das reinfecções^(48, 96). É possível que os métodos de detecção de DNA de *Leishmania* spp., se adequadamente simplificadas, venham no futuro apresentar impacto significativo no cenário de atendimento de pacientes em fase aguda da infecção, quando ferramentas diagnósticas rápidas e seguras são críticas para a decisão terapêutica com a conseqüente melhora do prognóstico⁽¹⁰⁰⁾.

Apesar do avanço tecnológico das últimas décadas, o rendimento da maioria das provas diagnósticas nos casos dos pacientes co-infectados com LV e HIV mostra-se aquém do esperado, como descrito na seguinte tabela. ^(33, 50, 81).

Tabela 2 - Comparação da sensibilidade dos testes para diagnóstico da LV em população geral e em pacientes vivendo com HIV/aids.

Procedimento diagnóstico	Sensibilidade	
	População geral %	Pacientes com HIV %
Medula óssea		
Aspirado	60-85	62-93
Biópsia	40-80	38-80
Cultura	50-100	50-100
PCR	100	82-100
Aspirado esplênico	95-100	85-100
Biopsia hepática	50-75	68-87
Biópsia de linfonodo	40-58,3	38-50
Sangue periférico	SD	50-53
PCR em sangue	73,2-96	97-100
em medula óssea	100	100
Hemocultura	0-30	25-89
Deteção de antígeno		
KATEX	68-100	SD
Sorologia		
RIFI	55-70	22-68
DAT	91-100	16-68
ELISA com Ag bruto	80-100	22-58
ELISA rK39**	67-100	72-78
Western blot	100	70,6-100

* SD: Sem dados disponíveis

** Sensibilidades menores correspondem a estudos fora do subcontinente indiano

A capacidade da *Leishmania* de causar infecção assintomática torna difícil seu diagnóstico devido à dificuldade de suspeição clínica, além da falta de especificidade de alguns sinais e sintomas, como febre prolongada, emaciação e citopenias presentes em outras doenças que acometem os indivíduos portadores de HIV/aids⁽⁵²⁾. O tratamento nos casos de co-infecção *Leishmania*/HIV também se torna mais difícil pelo maior número de recaídas

após tratamento e pela presença de outras infecções que dificultam o manejo do paciente^(41, 108).

A magnitude e as características clínicas da co-infecção *Leishmania*/HIV são ainda pouco conhecidas no Brasil. A LV, inicialmente circunscrita ao nordeste brasileiro, sofreu expansão para as outras regiões do país e mudou sua expressão predominantemente rural para o acometimento da população urbana. Devido à presença de reservatórios e vetores na grande maioria dos estados brasileiros, focos de LV têm sido descritos em todas as regiões do país, acometendo durante as últimas décadas a população de grandes centros urbanos. Por outro lado a epidemia de HIV apresenta um processo de interiorização o que favorece o acometimento de indivíduos por ambas as infecções. Brasília, capital do país com menos de 50 anos de fundação, é um bom exemplo de urbanização da doença. No Distrito Federal foi identificada a presença de *Lutzomyia longipalpis*, de cães infectados com *L. chagasi* e recentemente foi notificado o primeiro caso autóctone de LV humana. Considerando a relevância da co-infecção *Leishmania*/HIV foi realizado um estudo transversal para estimar sua prevalência e detectar possíveis fatores de risco na população de pessoas vivendo com HIV/aids no Hospital Universitário de Brasília, onde na última década foram tratados pelo menos quatro pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV que se apresentaram com a síndrome de LV.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estimar a magnitude da co-infecção *Leishmania*/HIV-aids em uma população de pacientes soropositivos para HIV atendidos no Hospital Universitário de Brasília.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar a prevalência de infecção assintomática por *Leishmania* em pacientes soropositivos para HIV acompanhados no Hospital Universitário de Brasília (HUB) utilizando testes sorológicos (ELISA com antígeno bruto e rK39, e imunofluorescência indireta), assim como a detecção molecular do parasito pela PCR.
- Estimar a prevalência de leishmaniose visceral (LV) em pacientes soropositivos para HIV com a síndrome sugestiva de LV, utilizando para o diagnóstico a detecção do parasito por métodos convencionais e a detecção de DNA de *Leishmania* mediante técnicas moleculares.
- Estimar a especificidade das provas sorológicas em pacientes sintomáticos com a síndrome suspeita de LV.
- Comparar o desempenho das técnicas utilizadas para estimar a prevalência de infecção assintomática.
- Estudar possíveis associações entre as características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes e a positividade dos testes.

3 Métodos

3.1 Local de estudo

O estudo foi realizado no Ambulatório e na Enfermaria de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário de Brasília. A instituição funciona como um centro de referência para o atendimento de pessoas vivendo com HIV/aids oferecendo serviços de acompanhamento ambulatorial com fornecimento de tratamento antiretroviral na própria unidade, acompanhamento psico-social por equipe multiprofissional e serviços de internação e de pronto atendimento por ocasião das intercorrências que indicam a hospitalização. O número de pacientes acompanhados no ambulatório é de aproximadamente 300, com variações devidas à mobilização dos pacientes que mudam de residência ou de local de atendimento. Os serviços ambulatoriais funcionam três dias por semana e os serviços de internação e de pronto atendimento de forma ininterrupta.

3.2 Pacientes

Foram convidados 170 pacientes do Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Os pacientes foram abordados entre março e setembro de 2005. Destes, 163 aceitaram participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A amostra não foi selecionada aleatoriamente e os pacientes foram convidados durante uma das consultas de rotina marcadas durante o período descrito. Os critérios de inclusão e exclusão se detalham a continuação.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Ser maior de 18 anos;
- Ter diagnóstico da infecção pelo HIV pelo método de ELISA, confirmado com Imunofluorescência Indireta (IFI) ou *Western Blot*;
- Realizar acompanhamento ambulatorial ou estar internado no HUB; e
- Assinar o termo de consentimento informado, livre e esclarecido.

3.2.2 Critério de exclusão

- Recusa ou contra-indicação para a realização dos exames de diagnóstico.

3.2.3 Definição de caso suspeito de infecção sintomática por *Leishmania* spp.

Paciente com síndrome clínica sugestiva de LV, caracterizado por no mínimo duas das seguintes condições:

- Febre por mais de duas semanas sem outro diagnóstico etiológico;
- Hepatomegalia ou esplenomegalia; e
- Presença de qualquer citopenia: anemia, leucopenia ou plaquetopenia.

3.2.4 Definição de caso de infecção sintomática por *Leishmania* spp.

Paciente com a síndrome suspeita descrita acima que apresente diagnóstico parasitológico ou PCR positivos.

3.2.5 Definição de caso de infecção assintomática por *Leishmania* spp.

Paciente com resultado positivo (Sorologia ou PCR) para leishmaniose que no momento da avaliação não apresente sintomas sugestivos descritos acima.

3.3 Procedimentos de coleta de dados e coleta, armazenamento e transporte de amostras biológicas.

Os pacientes foram entrevistados para obtenção de dados demográficos, clínicos e epidemiológicos relevantes; posteriormente, foram submetidos ao exame clínico para investigação de sinais sugestivos de LV. Os pacientes com quadro sugestivo do LV foram entrevistados e examinados enquanto permaneciam internados. Os dados foram registrados na ficha especificamente elaborada para tal fim (Anexo 01).

Após o exame clínico, foram coletados 8 mL de sangue por punção venosa em dois tubos com 4 mL cada um. O sangue foi coletado sob técnica asséptica e conservado em tubos com anticoagulante EDTA. Os pacientes com quadro sugestivo de LV foram ainda submetidos à aspiração da medula óssea por punção de espinha íliaca postero-superior, prévia anti-sepsia e anestesia local.

As amostras de sangue foram identificadas e um dos tubos passou por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos para separação do soro. O conteúdo do segundo tubo foi congelado diretamente a -20°C até a realização do procedimento de extração de DNA para a aplicação da técnica de PCR. Todas as amostras de sangue e soro foram conservadas a -20°C no Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

Amostras de soro foram enviadas resfriadas com pacotes de gelo para o Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, em Belo Horizonte (MG), onde foram realizados os exames sorológicos (ELISA e RIFI), descritos abaixo.

As amostras de medula óssea foram utilizadas para realizar o esfregaço em lâminas, as quais foram fixadas em metanol por 3 minutos e coradas segundo o método de Giemsa. Uma a duas gotas da amostra de medula foram colocadas em meio RPMI enriquecido com soro fetal bovino 20% (V/V) e transportadas para o laboratório a temperatura ambiente para posterior inoculação em meio de cultura, mediante a técnica descrita abaixo. De 1-2 mL da amostra foram coletados em tubo com anticoagulante EDTA e congelados a -20°C até a realização do procedimento de extração de DNA para a aplicação da técnica de PCR.

As amostras de medula óssea foram também enviadas para cultura de micobactérias no Laboratório central -LACEN- do Distrito Federal em Brasília, de bactérias aeróbicas no Laboratório de Bacteriologia do HUB, e cultura de fungos no Laboratório de Micologia do HUB, segundo os protocolos seguidos em cada unidade. Os exames dirigidos para detectar a possível infecção por *Leishmania* na medula óssea foram realizados no Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

3.4 Testes sorológicos

3.4.1 Ensaio imuno-enzimático (ELISA) anti-*Leishmania chagasi*

O antígeno solúvel de *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi preparado segundo protocolo definido por Ho et al⁽¹⁰⁹⁾., promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/pp75) cultivadas por sete dias em meio de cultura NNN/LIT foram usados para a preparação do antígeno solúvel. Empregou-se a concentração de 9×10^7 promastigotas/mL de tampão salina/fosfato (PBS), sendo a suspensão submetida a sonificação seis vezes por 20 segundos em banho de gelo e posterior centrifugação a 10.000 g por 30 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi alíquotado e conservado a -70°C até o uso. A concentração de proteínas na suspensão antigênica foi determinada a través do método descrito por Lowry et al., (1951).

Para a reação de ELISA foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços e fundo chato (NUNC®). As placas foram sensibilizadas com $3 \mu\text{g/ml}$ de solução antigênica de *L. chagasi* em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6. Nesta etapa, foram colocados $100 \mu\text{L}$ /poço da suspensão antigênica e as placas foram incubadas *overnight* na geladeira, a temperatura de

2-8°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,5% (PBST₂₀, pH 7,2-7,4). Posteriormente, na etapa de bloqueio, foram utilizados 150 µL/poço e solução de albumina bovina (SIGMA®) a 2% em PBST₂₀. Após incubação por 60 minutos a 37 °C, as placas foram novamente lavadas e procedeu-se à incubação do soro. As amostras foram diluídas em PBST₂₀ na proporção de 1:1000 para a pesquisa de anticorpos IgG contra *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo colocados 100 µL desta diluição em cada poço. Após nova etapa de incubação a 37°C e lavagem, adicionou-se a solução de anti-imunoglobulina humana IgG ligada à peroxidase na diluição 1:500 em PBST₂₀. Após incubação e lavagem, acrescentou-se à solução de ABTS (2, 2' azino bis 3-ethylbenzothiazole sulphonic acid) para revelação. Após o desenvolvimento de cor, procedeu-se à leitura da absorvância de cada poço a 405 nm em espectrofotômetro leitor de ELISA (BIORAD®). Todas as amostras foram testadas em duplicata. As reações foram validadas através da avaliação do desempenho dos controles positivo e negativo presentes em cada placa em relação à respectiva faixa de variação previamente definida. Os valores de controle positivo e controle negativo, aceitáveis para cada placa de ELISA foram definidos pela média mais três desvios-padrão de 40 poços contendo os soros controle em uma reação de ELISA com os mesmos reagentes das amostras testadas. O resultado da amostra correspondeu à média aritmética dos resultados da duplicata. Considerou-se positiva a amostra com absorvância maior da media aritmética dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão.

3.4.2 ELISA anti-rK39

A pesquisa de anticorpos séricos anti-rK39 foi realizada empregando-se o mesmo protocolo de reação descrito para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi*, com algumas modificações. Na etapa de sensibilização, empregou-se a concentração antigênica de 50 ng/poço e as amostras foram diluídas na proporção de 1:100 para a pesquisa de IgG. O antígeno foi cedido ao Centro de Pesquisas René Rachou por S. G. Reed, Corixa Corp. (Scattle, Washington, Estados Unidos de América). Considerou-se positiva (como no caso do ELISA com antígeno bruto) a amostra com absorvência maior da media aritmética dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão.

3.4.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) anti-*Leishmania chagasi*

A RIFI foi realizada seguindo uma variação das instruções do fabricante (Biomanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ). Na etapa de sensibilização das lâminas, foram adicionados 10 µL de solução antigênica em cada orifício e estas foram incubadas a temperatura ambiente por 12 horas. As amostras de soro foram preparadas nas diluições 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640; e 10 µL de cada diluição dispensados na lâmina. O soro foi incubado a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida. Após esse período, as lâminas foram lavadas por três minutos em PBS; três minutos em água reagente tipo II e secas ao ar. Em seguida, procedeu-se à etapa de incubação da solução de anti-inmuglobulina humana ligada à fluoresceína na proporção de 1:100 em PBS, acrescida de Azul de Evans 1:25; cada orifício da lâmina recebeu 15 µL dessa solução e as etapas de incubação e lavagem anteriormente descritas foram repetidas. Para análise ao microscópio de fluorescência, procedeu-se à montagem das lâminas com lamínula e glicerina tamponada. Foram considerados positivos todos os soros que apresentaram fluorescência a partir da diluição 1:80.

3.5 Identificação do parasito

3.5.1 Pesquisa de *Leishmania* spp., em aspirado de medula óssea

Após a fixação dos esfregaços com metanol absoluto durante 3 minutos, as lâminas foram secadas ao ar ambiente e posteriormente coradas com solução de Giemsa diluído (3 gotas da solução padrão concentrada por mililitro de água tamponada – pH 7,2) por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água corrente e secadas a temperatura ambiente. A leitura das lâminas foi realizada com microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento 1000X). As lâminas foram examinadas pelo pesquisador, avaliando pelo menos 1000 campos com o intuito de detectar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. Todas as lâminas disponíveis foram avaliadas por um segundo pesquisador para confirmar o resultados inicial. Foram avaliadas pelo menos três lâminas de cada paciente.

3.5.2 Cultura do aspirado de medula óssea

Foram colocadas duas gotas do aspirado de medula óssea em 2 ml de meio RPMI (GIBCO®) enriquecido com soro fetal bovino com concentração final V/V de 20%. As amostras no meio líquido foram transportadas a temperatura ambiente para o laboratório, onde foram distribuídas em seis tubos (cada amostra) contendo meio de cultura semi-sólido

constituído por ágar-sangue de coelho (15%) elaborado com ágar base DIFCO, código 0696-17. Os tubos foram mantidos em estufa com temperatura de 22 a 24° C e observados a cada quatro dias por um mês, utilizando um microscópio invertido. Planejou-se a realização de passagens sucessivas no mesmo meio de cultura a partir da positividade para conseguir a expansão que permitisse a criopreservação dos parasitos em nitrogênio líquido.

3.6 Teste de identificação do DNA de *Leishmania* spp

3.6.1 Reação em cadeia da polimerase

Os testes de detecção de DNA de *Leishmania* spp., foram realizados em dois tipos de amostras: sangue e medula óssea. A técnica foi similar em ambos os casos, variando na diluição das amostras de medula óssea, tentando aumentar o rendimento da prova. Os iniciadores (*primers*) utilizados são dirigidos para amplificar 120 pares de bases da região conservada do kDNA, de *Leishmania* spp.

Foram obtidos controles positivos mediante o isolamento do DNA de uma cultura em crescimento exponencial de *Leishmania (L.) chagasi* (MCER/BR/79/M6445) em meio líquido. Para iniciar a extração do DNA parasitário foi utilizada a solução de lise celular do kit *Genomic Prep Blood DNA Isolation Kit-Amersham Biosciences, UK*; a purificação posterior foi realizada adicionando solução de fenol mais clorofórmio-álcool isoamílico; em seguida procedeu-se à precipitação de proteínas com solução de clorofórmio; e finalmente a precipitação do DNA foi realizada com isopropanol 100%, e a lavagem com etanol 70%. O DNA obtido foi armazenado em alíquotas de 5µL em solução de Tris-EDTA (TE) a -70°C até sua amplificação. A reação de PCR foi realizada com diluições seriadas (10X) deste DNA para a determinação da menor quantidade de DNA que a reação foi capaz de detectar. O DNA extraído foi diluído progressivamente desde 1/10 até 1/10.000.000. O último controle com reação positiva foi aquele com título 1/10.000. Portanto, elegeu-se como marcador de controle positivo o DNA de cultura diluído até 1/1.000.

A extração de DNA de amostras de sangue e aspirado de medula óssea foi realizada com um sistema comercial para extração (*Genomic Prep Blood DNA Isolation Kit-Amersham Biosciences, UK*). O material obtido foi suspenso na solução de hidratação do próprio kit e armazenado entre 2-8°C até o momento da amplificação.

Foram utilizados três oligonucleotídeos iniciadores para amplificar o fragmento da região conservada do minicírculo de *Leishmania* spp.

Oligonucleotídeos

FW 5' GGG TAG GGG CGT TCT GCG AA

BW B - 5'CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC

Ca- 5'GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC

Utilizaram-se duas amostras negativas, uma de padrão negativo e outra que foi tratada de maneira semelhante durante o processo de extração exceto pela colocação do material biológico sob análise. Cada processo de extração foi realizado simultaneamente para 6 ou 7 amostras. O procedimento de amplificação foi realizado em um termociclador *Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400* (The Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, Estados Unidos da América do Norte) com a seguinte programação:

Etapa 1	5 min 95°C desnaturação
Etapa 2	30 segundos 66°C anelamento
Etapa 3	30 segundos 72°C extensão
Etapa 4	30 segundos 95°C desnaturação
Etapa 5	Repetir etapas 2 a 4, 39 vezes
Etapa 6	30 segundos 66°C anelamento
Etapa 7	5 min 72°C extensão
Etapa 8	∞ 4°C

Finalizada a reação, os tubos foram armazenados na geladeira a 4°C até a preparação do gel. Os produtos amplificados foram examinados por meio de eletroforese em gel de poli-acrilamida a 6% e corado pela prata. Utilizando um marcador de peso molecular, identificou-se o tamanho do fragmento amplificado. O controle positivo demonstrava exatamente a migração do fragmento desejado.

Para a padronização do teste, foram necessários múltiplos ensaios, visando melhorar o rendimento no laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical onde a reação não tinha sido realizada anteriormente. A padronização da extração do DNA não foi

necessária, já que com o uso do protocolo recomendado pelo fabricante, obteve-se o produto desejado.

Para a amplificação do DNA foi necessário testar diversas condições de reação descritas a seguir:

Condições de reação	Concentrações testadas	Concentração escolhida
Concentração de magnésio na reação (mM)	1,0; 1,5; 2,0; e 2,5	1,5 mM
Concentração do primer Forward (μ M)	0,6 e 1,2	0,6 μ M
Concentração dos primers Backward (μ M)	0,3 e 0,6 de cada	0,3 μ M
Concentração da enzima Taq polimerase (U/20 μ L)	1,0; 1,25; e 1,5	1,5U/20 μ L
Temperatura de anelamento ($^{\circ}$ C)	62 e 66	66 $^{\circ}$ C

Na fase da corrida eletroforética, foram testadas algumas outras variáveis. O marcador de peso molecular foi diluído a concentrações de 0,05; 0,075 e 0,1 μ g/ μ L, a melhor resolução para a sua visualização foi observada na concentração de 0,075 μ g/ μ L. A voltagem foi testada desde 50 até 150 volts, com intervalos de 25 volts. A melhor corrida sem efeitos de sobreaquecimento do gel foi observada a 125 volts. O tempo foi testado desde 30 até 180 minutos, com intervalos de 15 minutos entre cada prova. Observou-se que o menor tempo necessário para uma adequada separação dos produtos amplificados foi de 120 minutos.

3.7 Análise estatística

Foi construído um banco de dados no programa SPSS versão 12.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos da América*) com todas as características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e os resultados dos exames laboratoriais. O Programa Epi info 6.04 (*Centers for Disease Control, Atlanta, Estados Unidos da América*) foi utilizado para calcular os intervalos de confiança 95 das prevalências dos testes aplicados e a razão de chances (*Odds ratio*) com seus respectivos intervalos de confiança 95.

Na descrição das características da amostra foram calculadas proporções para as variáveis categóricas e medidas de tendência central (médias e medianas) e de dispersão (desvio padrão e quartis 25-75) para as variáveis contínuas.

Para a avaliação da infecção assintomática foram calculadas as prevalências baseadas nos dados da positividade de cada um dos testes diagnósticos e a prevalência global pela combinação de resultados, com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC_{95%}) para cada um dos testes realizados. A sensibilidade e a especificidade das provas sorológicas e

moleculares para a detecção da doença não foram calculadas devido ao pequeno número de pacientes sintomáticos avaliados neste estudo.

Foi realizada uma análise exploratória das características epidemiológicas e clínicas que poderiam estar associadas com uma maior probabilidade de apresentar testes positivos. A significância das associações foi calculada por meio do teste de qui-quadrado para as variáveis categóricas e por meio do t de Student para variáveis contínuas de distribuição normal. Quando pertinente, foram utilizados testes não paramétricos na análise de variáveis contínuas, assim como o teste exato de Fisher para as variáveis categóricas. O nível de significância para considerar as associações como potencialmente relevantes foi de $p < 0,05$.

Foi calculada a concordância entre as provas por meio do índice *Kappa*, utilizando os seguintes parâmetros:

Teste 1	Teste 2	
	Positivo	Negativo
Positivo	a	b
Negativo	c	d

Concordância bruta : $a+d/a+b+c+d$

$Kappa = (P \text{ observada} - P \text{ esperada}) / (1 - P \text{ esperada})$

Onde:

P observada= Concordância bruta; e

$P \text{ esperada} = [(a+b)(a+c)] + [(c+d)(b+d)] / (a+b+c+d)^2$

Foram calculados os respectivos intervalos de confiança para o *Kappa* e o índice interpretado segundo a seguinte tabela de valores:

<i>Kappa</i>	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,40	Fraca
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

3.8 Considerações éticas

A pesquisa redundou em benefício individual para os pacientes, gerando informação sobre o status de infecção por *Leishmania* spp., o que possibilitará o tratamento oportuno e precoce, caso o paciente se torne sintomático. Para os pacientes sintomáticos trouxe o benefício de aumentar a possibilidade de definir melhor o diagnóstico utilizando um número maior de testes diagnósticos que usualmente não estão disponíveis devido ao seu custo elevado e à laboriosidade requerida para a sua realização no laboratório. Nenhum paciente foi submetido a procedimentos invasivos que não sejam recomendados rotineiramente para a abordagem diagnóstica de pessoas com sintomas sugestivos de leishmaniose visceral. A participação no estudo foi voluntária e todos os direitos do paciente foram garantidos cumprindo com o estabelecido na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado, livre e esclarecido prévio à coleta das amostras.

4 Resultados

4.1 Características da amostra

Das 300 pessoas estimadas vivendo com HIV/aids regularmente acompanhadas no Ambulatório de Doenças Infecciosas e parasitárias do Hospital Universitário de Brasília (HUB) foram avaliadas 163, correspondendo a 54% do universo de pacientes do estudo.

4.1.1 Dados sócio-demográficos

A idade dos participantes variou de 20 a 74 anos. Os valores desta característica não apresentaram distribuição normal, com mediana de 37 anos e quartis 25 e 75 de 33 e 44, respectivamente. A análise por estratos de idade mostrou predomínio de indivíduos entre 20 e 40 anos, 112 eram do gênero masculino (68,7%) e 51 do gênero feminino (31,3%) com razão de masculinidade de 2,2 (Tabela 3). As medianas das idades agrupadas segundo gênero não mostraram diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney $U=2556,5$; $p=0,283$), como mostrado na gráfico 1.

Tabela 3 – Idade e gênero de 163 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Característica	Valor (n=163)
Gênero	
Masculino (%)	112 (68,7)
Feminino (%)	51 (31,3)
Razão de masculinidade	2,2
Idade	
Mediana em anos (quartis 25 e 75)	37 (33 e 44)
20-40 anos (%)	96 (58,9)
41-60 anos (%)	61 (37,5)
≥60 anos (%)	6 (3,7)

O estado civil predominante foi o dos solteiros, com 85 indivíduos (52,1%), seguido pelos casados/união estável, com 57 indivíduos (35%). Sobre a escolaridade, número semelhante de pacientes cursou o primeiro grau incompleto ($n=47$, 28,8%) e o segundo grau

completo (n=46, 28,2%). A seguinte categoria em frequência foi a dos indivíduos com primeiro grau completo (n=35, 21,5%). Nos extremos desta característica temos sete indivíduos que manifestaram ser analfabetos (4,3%) e 14 com escolaridade de terceiro grau completo (8,6%).

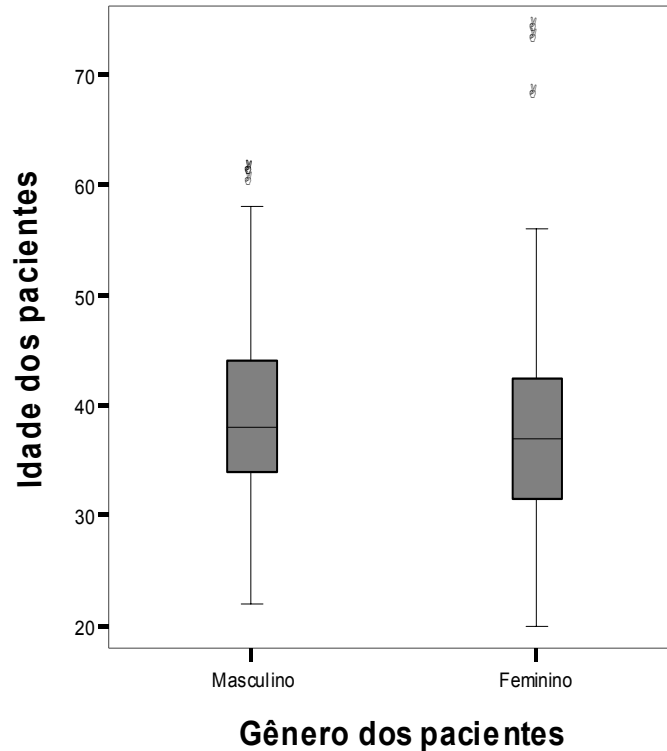


Gráfico 1 - Comparação das medianas das idades segundo gênero de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Não houve diferenças entre grau de escolaridade quando comparados por gênero e idade. Em relação à ocupação, a maior frequência observada foi de donas de casa (n=36, 22,1%), os outros grupos com representação relevante foram os desempregados e aposentados, com 20 indivíduos cada um (12,3%). O restante se dividiu entre diversos tipos de ocupação, desde trabalhadores braçais até profissionais autônomos. Estas variáveis são apresentadas na tabela 4. Os dados sobre a naturalidade dos pacientes mostraram que a maior frequência correspondeu aos indivíduos nascidos no Distrito Federal e estados vizinhos, porém houve registro de 20 estados. (Tabela 5)

Tabela 4 – Estado civil, escolaridade e ocupação de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Característica	Frequência	%
Estado civil		
Solteiro(a)	85	52,1
Casado(a)/união estável	57	35,0
Separado(a)/divorciado(a)	13	8,0
Viúvo(a)	08	4,9
Escolaridade		
Analfabeto	07	4,3
Primeiro grau incompleto	47	28,8
Primeiro grau completo	35	21,5
Segundo grau incompleto	10	6,1
Segundo grau completo	46	28,2
Superior incompleto	04	2,5
Superior completo	14	8,6
Ocupação		
Dona de casa	36	22,1
Aposentado	20	12,3
Desempregado	20	12,3
Vendedor	11	6,7
Motorista	08	4,9
Funcionário público	06	3,7
Outros	62	38,0

Os dados sobre o município de residência no momento da avaliação mostraram predominância de moradores do Distrito Federal (n=117 , 71,8%), seguido por residentes de municípios pertencentes a estados vizinhos. (Gráfico 2)

Tabela 5 – Naturalidade de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Estado	Frequência	%
AL	01	0,6
AM	01	0,6
AP	01	0,6
BA	12	7,4
CE	08	4,9
DF	45	27,6
ES	01	0,6
GO	18	11,0
MA	15	9,2
MG	23	14,1
PA	03	1,8
PB	07	4,3
PE	04	2,5
PI	09	5,5
PR	01	0,6
RJ	04	2,5
RN	01	0,6
RS	03	1,8
SC	01	0,6
SP	05	3,1

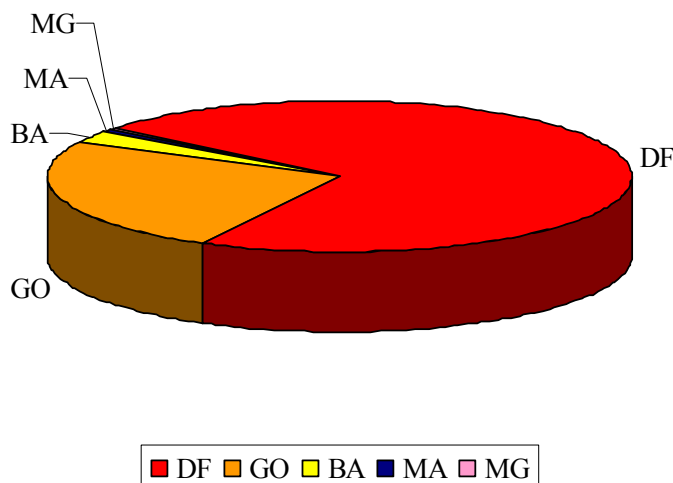


Gráfico 2 – Unidade federada de residência de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

4.1.2 Aspectos epidemiológicos relacionados ao risco de adquirir a infecção por *Leishmania spp.*

A informação sobre a naturalidade, procedência e locais de residência durante os últimos oito anos foi comparada à lista de municípios com transmissão autóctone de LV registrados entre 1998 e 2005 (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2005). Observou-se que 104 pacientes (63,8%) moraram em municípios com transmissão autóctone de LV. Brasília não foi incluída como município com transmissão de LV, pois o relato do primeiro caso da doença data de agosto de 2005.

O conhecimento do vetor foi inquirido chamando-o pelo nome popular (“O senhor conhece o mosquito palha?, E o asa branca?, E o mosquito chamado birigui? E aquele chamado tatuquira?”). Onze pacientes relataram convívio com cão suspeito de ser portador de LV. Um destes pacientes não tinha morado em área reconhecida como endêmica para LV. Um paciente relatou caso de LV na família.(Tabela 6).

Tabela 6 – Conhecimento sobre o vetor de leishmaniose e casos de LV humana e canina avaliado em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Categoria	Conhecimento do vetor (%)	Caso de LV na família (%)	Caso de LV na vizinhança (%)	Convívio com LV canina (%)
Resposta positiva	03 (1,8)	01 (0,6)	04 (2,5)	11 (6,7)
Resposta negativa	160 (98,2)	162 (99,4)	159 (97,5)	152 (93,3)

4.2 Antecedentes patológicos

O histórico de doenças infecciosas e não-infecciosas foi sumarizado a partir da informação obtida durante as entrevistas e comprovada na investigação dos prontuários. Das doenças não-infecciosas, a hipertensão foi a mais freqüente com 17 casos (10,4%), seguida de dislipidemia com seis casos (3,7%), e cinco pacientes (3,1%) com epilepsia. Com menor freqüência, foi relatado diabetes (quatro pacientes). Neoplasias, asma brônquica, lipodistrofia e depressão foram identificadas em três pacientes. As doenças agrupadas como "Outras patologias" incluíram um caso de cada uma das seguintes condições: artrite reumatóide, artrose, acidente vascular cerebral, bócio, catarata, doença celíaca, doença de Crohn, gota, hiperplasia prostática benigna, litíase renal, miomatose uterina, psicose, rinite alérgica, tendinite, tromboembolismo pulmonar e valvulopatia reumática (Tabela 7).

Tabela 7 – Doenças não-infecciosas relatadas por 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Comorbidade	n	Porcentagem
Hipertensão arterial	17	10,4
Dislipidemia	07	4,3
Epilepsia	05	3,1
Diabetes mellitus	04	2,5
Neoplasias	04	2,5
Asma brônquica	03	1,8
Gastrite	03	1,8
Lipodistrofia	03	1,8
Depressão	03	1,8
Dermatite seborréica	02	1,2
Etilismo crônico	02	1,2
Púrpura trombocitopênica imune	02	1,2
Psoríase	02	1,2
Outras patologias	16	9,8

Dentre as doenças infecciosas que poderiam estar associadas com a produção de anticorpos que apresentam reações cruzadas nos testes sorológicos para o diagnóstico de LV, foram registrados antecedentes ou doença ativa de: tuberculose (23 casos, 14,1%), hepatite C (14 casos, 8,6%), hepatite B (10 casos, 6,1%), malária (5 casos, 3,1%), doença de Chagas (4

casos, 2,5%), hanseníase (2 casos, 1,2%) e um caso (0,6%) de leishmaniose tegumentar. Só os casos de hepatites virais e doença de Chagas foram confirmados por sorologia. A confirmação do restante das condições foi conferida nos prontuários. Outras doenças infecciosas foram também relatadas, com nove casos de sífilis (5,5%), sete de toxoplasmose (4,3%) e cinco casos de dengue (Tabela 8).

Tabela 8 – Antecedente de doenças infecciosas em 163 pacientes com HIV/aids acompanhados no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Doença	Frequência	%
Tuberculose	23	14,1
Hepatite C	14	8,6
Hepatite B	10	6,1
Sífilis	09	5,5
Toxoplasmose	07	4,3
Malária	05	3,1
Dengue	05	3,1
Hepatite A	02	1,2
Leishmaniose tegumentar	01	0,6
Outros	05	3,1

4.3 Características da infecção pelo HIV

Observaram-se as categorias de exposição associadas à infecção pelo HIV. A categoria sexual sem proteção foi a predominante, com 154 indivíduos (94,5%) relatando essa forma de contágio. Destes, 40 (26%) relataram parceiro soropositivo para HIV. Quinze (9,2%) pacientes relataram uso de drogas injetáveis, e 10 (6,1%) relataram uso de sangue ou hemoderivados. Um paciente relatou contágio associado a agressão sexual e uma por transmissão congênita. Ambos os últimos pacientes relataram comportamento heterossexual, embora não associado à infecção.

Sobre a orientação sexual, 120 pacientes (73,6%) declararam comportamento heterossexual, 25 homens (15,3%) afirmaram ter sexo com homens e 18 (11%) serem bissexuais (Tabela 9).

Tabela 9 – Categorias de exposição e orientação sexual de 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Categoria	Homens		Mulheres		Total	
	Freq	%	Freq	%	Freq	%
Categoria de exposição						
Sexual	105	64,4	49	30	154	94,4
- Heterossexual	62	38,0	49	30,1	111	68,1
- Bissexual	18	11,0	-	-	18	11,0
- Homens que fazem sexo com homens	25	15,4	-	-	25	15,3
Usuário de drogas injetáveis*	14	8,6	01	0,6	15	9,2
- Heterossexual	11	6,7	01	0,6	12	7,4
- Bissexual	02	1,2	-	-	02	1,2
- Homens que fazem sexo com homens	01	0,6	-	-	01	0,6
Transfusão + heterossexual**	07	4,3	03	1,8	10	6,1
Congênito	-	-	01	0,6	01	0,6
Agressão sexual	01	0,6	-	-	01	0,6

* Cinco dos 15 indivíduos relataram exposição exclusiva por uso de drogas injetáveis

** Dois dos 10 indivíduos relataram exposição exclusiva por transfusão sanguínea.

O intervalo de tempo entre o diagnóstico confirmado da infecção pelo HIV e a avaliação transversal durante o estudo não mostrou uma distribuição normal. A mediana do diagnóstico foi de 57 meses (intervalo de 1 a 240, quartis 25 e 75 de 21 e 101, respectivamente). Quando estratificada em anos, a distribuição não foi corrigida. A estratificação em anos mostrou que 78 (47,9%) pacientes tinham cinco anos ou mais de diagnóstico, seguido por aqueles com 1 a 3 anos de diagnóstico (n=40, 24,5%) (Gráfico 3)

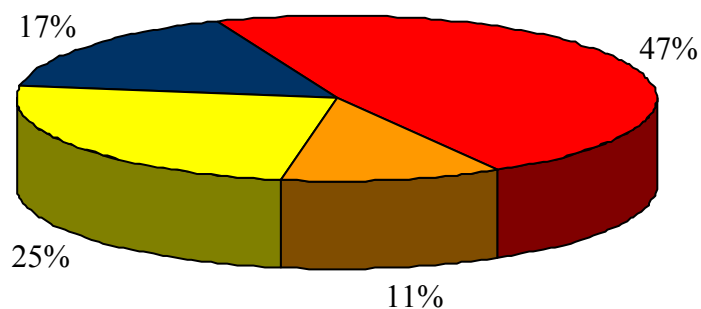


Gráfico 3 – Intervalo de tempo entre o diagnóstico confirmado da infecção pelo HIV e a avaliação atual em 163 pacientes acompanhados no Hospital Universitário de Brasília, 2005.



A avaliação sistemática dos prontuários sobre contagem de linfócitos T CD4+ (CD4) durante a evolução da doença e presença de doenças oportunistas mostrou que 114 (69,9%) pacientes apresentaram, em algum momento, contagens menores de 200/ μ L ou alguma doença definidora de aids. Estes pacientes foram considerados como portadores de imunodeficiência grave. Os valores de CD4 no momento da avaliação apresentaram mediana de 314 células/ μ L e distribuição não normal. Quando categorizados pelo corte de 200 células/ μ L observou-se que 122 (74,8%) pacientes apresentaram valores inferiores a este valor. (Tabela 10)

Tabela 10 – Estádio da doença e contagem atual de células T CD4+ em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Variável	Frequência	%
Imunodeficiência grave		
Sim	114	69,9
Não	49	30,1
Contagem atual de células T CD4+		
Mediana (intervalo 25 e 75)	314 células/ μ L (196 e 470)	
< 200 células/ μ L	122	74,8
\geq 200/ μ L	41	25,2

A quantificação da carga viral do HIV no sangue periférico (CV) dos pacientes avaliados não apresentou distribuição normal, com mediana de 0 (indetectável) e intervalos de 0 a 500.000 cópias/mL. Este fato pode ser devido a que 82 (50,3%) pacientes apresentaram CV indetectável associada ao uso de antiretrovirais. Quando avaliados nos seus valores logarítmicos, a curva dos pacientes com carga viral maior que 50 cópias/mL mostrou distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov = 0,2). A média geométrica foi de 3,86, com desvio padrão de 0,11. O limite de detecção segundo o laboratório central do Distrito Federal (LACEN-DF) é de 50 cópias/mL. A tabela 11 mostra valores relacionados à carga viral dos pacientes avaliados.

Tabela 11 – Valores de carga viral do HIV em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Carga viral	Valores	%
Mediana de cópias/ μ L (intervalo 25 e 75)	0 (0 e 10.135)	
Categorias		
Indetectável (menor que 50 cópias)	82	50,3
De 50 a 10.000 cópias/mL	40	24,5
De 10.000 a 100.000 cópias/mL	29	17,8
Maior que 100.000 cópias/mL	12	7,4

O uso de TARV foi avaliado nos pacientes, do ponto de vista qualitativo e quantitativo. Cento vinte e nove pacientes (79,1%) referiram ser usuários de TARV, dos quais 84 (51,5%) referiram usar inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) mais um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN), seguido por 42 (25,8%) de pacientes que substituíram o ITRNN por um inibidor da protease (IP). Três pacientes relataram, e a informação foi confirmada pela avaliação do prontuário, o uso exclusivo de ITRN. Dois deles usavam Zidovudina (AZT) mais Didanosina (ddI) e um deles usava Zidovudina mais Lamuvidina (3TC) e Abacavir (ABV). A combinação contendo ITRNN mais utilizada foi AZT+3TC+Efavirenz (EFZ), usada por 40 (24,5%) pacientes; seguida pela combinação de AZT+3TC+Nevirapina (NVP), usada por 18 (11%) pacientes. Das combinações contendo IP, a mais freqüente foi AZT+3TC+Nelfinavir (NFV), usado por 11 (6,7%) pacientes. (Tabela 12)

A tabela 13 mostra as doenças indicadoras de imunodeficiência registradas por entrevista e a revisão de prontuários dos pacientes avaliados que abrange todo o período de acompanhamento no Hospital Universitário de Brasília.

O uso de quimioprofilaxia para infecções oportunistas foi relatado por 42 (25,7%) pacientes. A freqüência maior correspondeu aos usuários de trimetropim-sulfametoxazol (n=34, 20,9%), usado como profilaxia primária contra *Pneumocystis jiroveci* e *Toxoplasma gondii*. Quatro (2,5%) pacientes relataram uso de sulfadiazina mais pirimetamina e ácido folínico como profilaxia secundária contra *Toxoplasma gondii*, enquanto dois pacientes estavam sendo nebulizados mensalmente com pentamidina como profilaxia da infecção por *Pneumocystis jiroveci*. Um paciente relatou profilaxia secundária com fluconazol para *Criptococcus neoformans*.

Tabela 12 – Uso de antiretrovirais em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Categoria	Frequência	%
Uso de antiretrovirais		
Sim	34	20,9
Não	129	79,1
<hr/>		
Esquema contendo ITRNN	84	65,1
AZT+3TC+EFZ	40	31,0
AZT+3TC+NVP	18	14,0
3TC+d4T+EFZ	12	9,3
3TC+d4T+NVP	09	7,0
Outros esquemas com ITRNN	05	3,8
Esquema contendo IP	42	32,5
AZT+3TC+NFV	11	8,5
AZT+ddI+IDV	04	3,1
AZT+3TC+LPV/r	03	2,3
3TC+d4T+LPV/r	03	2,3
Outros esquemas com IP	21	16,3
Esquema contendo só ITRN	03	2,4
AZT+ddI	02	1,6
AZT+3TC+ABC	01	0,8

Tabela 13 – Doenças indicadoras de imunodeficiência relatadas em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Doença	Frequência	%	Em atividade
Pneumocistose	36	22,1	01
Toxoplasmose	28	17,2	02
Herpes zoster	21	12,9	-
Citomegalovirose	10	6,1	01
Candidíase esofágica	09	5,5	-
Neurocriptococose	06	3,7	-
Tuberculose extrapulmonar	04	2,5	08
Sarcoma de Kaposi	02	1,2	01
Criptosporidíase	02	1,2	-
Outras	03	1,8	01

4.4 Prevalência da co-infecção *Leishmania*/HIV

A magnitude da co-infecção *Leishmania*/HIV foi avaliada por meio de testes sorológicos para detecção de anticorpos e a PCR nos sangue periférico. Todos os pacientes foram submetidos aos quatro testes diagnósticos utilizados. A prevalência global de co-infecção na amostra analisada foi de 16%. As prevalências obtidas com cada teste e os seus respectivos intervalos de confiança estão mostrados na tabela 14.

Tabela 14 – Estimativa da prevalência da co-infecção *Leishmania*/HIV, utilizando vários testes diagnósticos em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Teste aplicado	Reagentes	Prevalência (%)	IC 95%
Imunofluorescência indireta com promastigotas de <i>L. chagasi</i>	04	2,4	0,8 a 6,6
ELISA com antígeno bruto de <i>L. chagasi</i>	20	12,3	7,8 a 18,5
ELISA com antígeno rK39	08	4,9	2,3 a 9,8
PCR para <i>Leishmania spp</i> em sangue	03	1,8	0,5 a 5,7
Prevalência global*	26	16,0%	10,9 a 22,7

* Pacientes com pelo menos um resultado positivo em qualquer um dos testes.

4.5 Reação de imunofluorescência indireta

Quatro pacientes tiveram resultado positivo por este método. Considerando que o número de pacientes com resultado positivo foi pequeno não foram realizadas todas as comparações possíveis para explorar a associação da positividade com características clínicas ou demográficas, limitando o uso de testes estatísticos. Nenhum paciente com resultado positivo pela RIFI referiu ser usuário de drogas injetáveis e dois pacientes moravam em Sobradinho, cidade onde recentemente foi descrito o primeiro caso autóctone de LV no Distrito Federal. Dois pacientes com sorologia positiva para doença de Chagas mostraram reatividade à RIFI, sem mostrar reatividade nos outros testes sorológicos utilizados. Das características associadas à infecção pelo HIV observou-se que os quatro pacientes reagentes estavam em uso de antiretrovirais por terem atingido em algum momento contagens de linfócitos T CD4+ <200 células/μL. A contagem de CD4 no momento da avaliação foi maior que 200 células/μL nos quatro pacientes com medianas significativamente mais elevadas, quando comparados com os pacientes não-reagentes (Mann-Whitney U=122,5; p=0,036). Todos os pacientes reagentes apresentaram níveis de CV indetectável. Três deles usavam inibidores de protease (IP), com o esquema de AZT+3TC+NFV em dois casos e 3TC+ddI+IDV no outro. Não houve associação entre intercorrências infecciosas no momento da avaliação e reatividade à RIFI.

A tabela 15 descreve as características avaliadas com seus respectivos testes de significância estatística.

Tabela 15 – Características associadas à reatividade no teste de Imunofluorescência indireta - RIFI em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

	RIFI		p	OR	IC95
	Negativa	Positiva			
<i>Características pessoais</i>					
Idade em anos (mediana)	39,1	38,0	0,69*		
Quartis 25 - 75	33 – 44	32 – 46,5			
Gênero					
Feminino	50	01	1,0**	1,37	0,14-13,56
Masculino	109	03			
Comportamento sexual					
Heterossexual	117	03	1,0**	0,92	0,094-9,17
HSH ou bissexual	42	01			

Tabela 15. continuação....

	RIFI		p	OR	IC95
	Negativa	Positiva			
<i>Características epidemiológicas</i>					
Exposição a área endêmica					
Não	58	01	0,54	1,72	0,18-16,94
Sim	101	03	***		
Uso de drogas injetáveis					
Não	144	04	0,68	1,04	0,053-20,15
Sim	15	0	***		
Antecedente de transfusão					
Não	149	04	0,77	1,58	0,08-31,39
Sim	10	0	***		
Convívio com cães doentes					
Não	148	04	0,75	1,44	0,073-28,32
Sim	11	0	***		
Familiares com LV					
Não	158	04	0,97	11,74	0,418-329,6
Sim	01	0	***		
Vizinhos com LV					
Não	155	04	0,90	3,84	0,18-82,58
Sim	04	0	***		
<i>Antecedentes patológicos associados a reatividade cruzada</i>					
Doença de Chagas					
Não	156	02	0,004	52,0	5,38-502,65
Sim	03	02	***		
Tuberculose					
Não	132	03	0,53	1,63	0,16-16,27
Sim	27	01	***		
TB ativa (n=08)	08	0			
Hanseníase					
Não	157	04	0,95	7,0	0,29-167,94
Sim	02	0	***		
Malária					
Não	154	04	0,88	3,12	0,15-65,45
Sim (antecedente)	05	0	***		
<i>Características da infecção pelo HIV</i>					
Tempo de doença					
Mediana em meses	57	76	0,58*		
Quartis	21 - 101	31,2 - 103,5			
Estádio aids					
Sim	48	01	1,00**	1,29	0,13-12,79
Não	111	03			

Tabela 15. continuação....

	RIFI		p	OR	IC95
	Negativa	Positiva			
Uso de TARV					
Não	34	0	0,58**	2,47	0,13-47,08
Sim	125	04			
Uso de IP					
Não	120	01	0,05**	9,23	0,93-91,32
Sim	39	03			
Contagem de CD4 (células/ μ L)					
Mediana	308	535,5	0,04*		
Quartis	189 - 463	441,7 - 565,5			
Intercorrências infecciosas no momento da avaliação					
Não	134	03	0,50**	1,79	0,18-17,88
Sim	25	01			

* Mann Whitney U test

** Teste exato de Fisher bi-caudal

*** Teste exato de Fisher uni-caudal

4.6 ELISA com antígeno bruto de *L. (L.) chagasi*

A padronização do ponto de corte para este teste resultou em uma média de densidade óptica de 0,127 e desvio padrão de 0,051. Com esses dados definiu-se como ponto de corte o valor de 0,28. Vinte pacientes apresentaram resultado reagente. A prevalência estimada com este método foi de 12,3%. Os pacientes com o teste reagente foram mais jovens do que aqueles com o resultado do teste negativo. Houve maior número de pacientes com teste positivo entre 30-39 anos, embora proporcionalmente houve mais pacientes com o teste positivo na categoria anterior. A distribuição dos casos positivos por faixa etária está demonstrada no gráfico 4. Como no caso da RIFI, o uso de drogas injetáveis não esteve associado com a reatividade no teste de ELISA. As características epidemiológicas não apresentaram associações significativas com a reatividade a este teste. As doenças que têm sido associadas com reações cruzadas nos testes sorológicos para detectar anticorpos contra *Leishmania* spp., também não mostraram associações estatisticamente significantes. Um paciente com doença de Chagas mostrou-se positivo ao teste de ELISA com antígeno bruto, mas não à RIFI. Este paciente teve xenodiagnóstico positivo em duas oportunidades, a última em setembro de 2005. Das características associadas à infecção pelo HIV não houve diferenças nas medianas do tempo de diagnóstico. Observou-se que dos 20 pacientes reagentes ao teste de ELISA, 13 encontravam-se sem uso de TARV. Dos sete restantes, um

paciente encontrava-se em uso de IP. Esta associação foi altamente significativa (Teste exato de Fisher; $p < 0,001$) e uma proporção maior de pacientes com teste positivo nunca apresentou diagnóstico de aids baseado em níveis de linfócitos T CD4+ < 200 células/ μ L. As médias do logaritmo da carga viral foram semelhantes nos dois casos (Negativos=3,85 e Positivos=3,92; $t = -1,02$; $p = 0,32$). Ao contrario da RIFI, a positividade para o teste de ELISA mostrou-se mais freqüente entre pacientes com CV detectável ($X^2 = 11,368$; $p = 0,001$). Oito dos vinte pacientes com teste positivo apresentavam alguma infecção no momento da avaliação. Houve maior proporção de resultados positivos entre pacientes com alguma intercorrência infecciosa no momento da avaliação (Teste exato de Fisher; $p = 0,005$). Destes, três corresponderam à tuberculose, a que não mostrou associação com o teste positivo. Três de cinco pacientes com tuberculose ativa no momento da avaliação tiveram resultados positivos ao ELISA (Teste exato de Fisher; $p = 0,06$). Na tabela 16 descrevem-se os resultados a análise exploratória de variáveis potencialmente associadas à reatividade no teste de ELISA com antígeno bruto de *L. (L.) chagasi*.

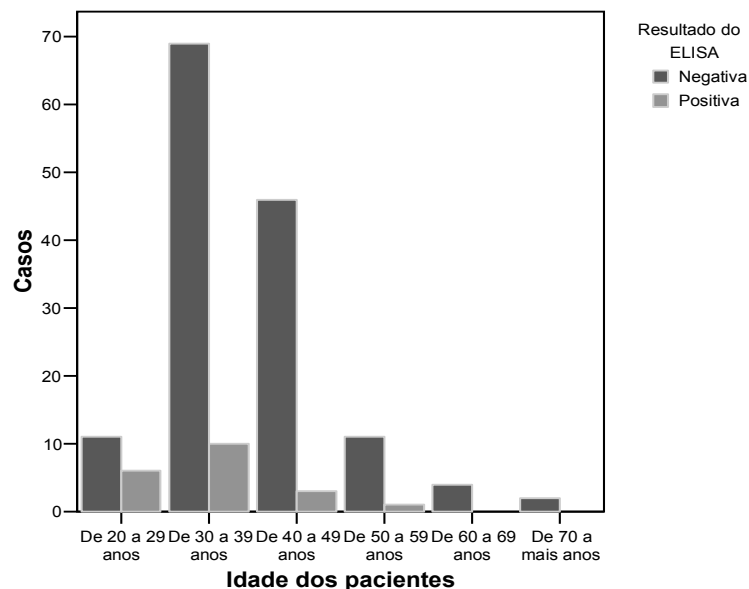


Gráfico 4 - Distribuição segundo a faixa etária e o resultado da reação de ELISA com antígeno bruto de *L. (L.) chagasi* em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Tabela 16 - Características associadas à reatividade segundo o método de ELISA com antígeno bruto de *L. chagasi* em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

	ELISA com antígeno bruto de <i>L. (L.) chagasi</i>		p	OR	IC95
	Negativo	Positivo			
<i>Características pessoais</i>					
Idade (mediana)	39	33	0,002*		
Quartis	34 – 44	27,5 - 37			
Gênero					
Feminino	45	06	1,0**	1,07	0,39-2,97
Masculino	98	14			
Comportamento sexual					
Heterossexual	105	15	0,88 ***	0,92	0,31-2,70
HSH ou bissexual	38	05			
<i>Características epidemiológicas</i>					
Exposição a área endêmica					
Não	53	06	0,36 ****	1,37	0,5-3,79
Sim	90	14			
Uso de drogas injetáveis					
Não	129	19	0,68 ****	0,49	0,06-3,90
Sim	14	01			
Antecedente de transfusão					
Não	135	18	0,35 ****	1,88	0,37-9,53
Sim	08	02			
Convívio com cães doentes					
Não	135	17	0,14 ****	2,98	0,72-12,32
Sim	08	03			
Familiares com LV					
Não	142	20	0,88 ****	2,32	0,09-58,81
Sim	01	0			
Vizinhos com LV					
Não	139	20	0,59 ****	0,76	0,04-14,57
Sim	04	0			
<i>Antecedentes patológicos associados a reatividade cruzada com Leishmania spp</i>					
Doença de Chagas					
Não	139	19	0,48 ****	1,83	0,19-17,24
Sim	04	01			
Tuberculose					
Não	119	16	0,46 ****	1,24	0,38-4,04
Sim	24	04			
TB ativa (n=08)	05	03			

Tabela 16. continuação...

	ELISA com antígeno bruto de <i>L. (L.) chagasi</i>		p	OR	IC95
	Negativo	Positivo			
Hanseníase					
Não	141	20	0,77	1,38	0,06-29,78
Sim	02	0	****		
Malária					
Não	139	19	0,48	1,83	0,19-17,24
Sim (antecedente)	04	01	****		

Características da infecção pelo HIV

Tempo de doença					
Mediana em meses	59	259	0,07*		
Quartis	25 – 101	10,2 – 99,7			
Estádio aids					
Não	38	11	0,01**	0,29	0,11-0,77
Sim	105	09			
Uso de TARV					
Não	21	13	<0,001	0,09	0,03-0,26
Sim	122	07	***		
Uso de IP					
Não	102	19	0,02**	0,13	0,02-1,01
Sim	41	01			
Contagem de CD4 (células/ μ L)					
Mediana	268	291	0,54*		
Quartis	209 - 470	93,3 - 473			
Intercorrências infecciosas no momento da avaliação					
Não	125	12	0,005	4,63	1,67-12,87
Sim	18	08	***		

* Mann Whitney U test

** Qui-quadrado

*** Teste exato de Fisher bi-caudal

**** Teste exato de Fisher uni-caudal

4.7 ELISA com antígeno rK39

Para o ensaio com o antígeno rK39, a padronização do ponto de corte apresentou média de 0,094 e desvio padrão de 0,03. Por tanto, o ponto de corte foi definido em 0,184. A aplicação deste teste resultou na reatividade de oito amostras. A prevalência resultante foi de 4,9%. Cinco homens e três mulheres tiveram o teste positivo. A variável sexo não mostrou

associação significativa. A idade mostrou mediana de 37 anos em ambos os grupos. Só um dos pacientes com o teste positivo teve o antecedente de uso de drogas injetáveis. Avaliadas as características epidemiológicas e as doenças com potencial de reação cruzada, não se observaram associações significativas. Dos pacientes com antecedentes de doença de Chagas, hanseníase, malária e leishmaniose tegumentar, nenhum teve o teste positivo. Dois pacientes com tuberculose tiveram o teste positivo, embora só um deles apresentou atividade da doença no momento da avaliação. O tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV mostrou mediana de 66,5 meses para os casos com teste negativo e 42 meses para os pacientes com teste positivo. Esta diferença foi semelhante segundo o teste aplicado (Mann-Whitney $U=515,5$; $p=0,422$). Embora os oito pacientes com o teste positivo tiveram mais de um ano de diagnóstico, esta característica não teve diferença significativa. Quatro indivíduos em cada grupo encontravam-se em estágio aids. O uso de TARV foi relatado em três dos oito pacientes com o teste positivo, com associação significativa ($X^2=8,837$; $p=0,01$). Destes três pacientes em uso de TARV, só um deles usava IP. A mediana do CD4 mostrou valor de 268 células/ μL nos pacientes com o teste negativo e 334 células/ μL nos casos positivos, sem associação significativa nesta diferença. A comparação das medianas da carga viral entre os pacientes com teste positivo (9.212 cópias/mL) e negativo (10.251 cópias/mL) não mostrou diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney $U=398,5$; $p=0,07$). Houve diferença quando categorizados, pois só um paciente com carga viral indetectável teve o teste positivo, contra sete no grupo de carga viral presente (Teste exato de Fisher; $p=0,03$). As intercorrências infecciosas mostraram associação estatística significativa com a reatividade no teste de ELISA com antígeno rK39 (Teste exato de Fisher; $p=0,023$).

A consolidação dos dados apresentados anteriormente e os resultados da análise exploratória de variáveis potencialmente associadas à reatividade no teste de ELISA com antígeno rK39 estão descritos na tabela 17.

Tabela 17 - Características associadas à reatividade segundo o método de ELISA com antígeno rK39 em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

	ELISA com antígeno rK39		p	OR	IC95
	Negativo	Positivo			
<i>Características pessoais</i>					
Idade (mediana)	37	37	0,71*		
Quartis	33 – 44	30,5 – 47,7			

Tabela 17. Continuação...

	ELISA com antígeno rK39		p	OR	IC95
	Negativo	Positivo			
Gênero					
Feminino	48	03	0,70	0,75	0,17-3,26
Masculino	107	05	**		
Comportamento sexual					
Heterossexual	113	07	0,682	0,38	0,05-3,22
HSH ou bissexual	42	01	**		
<i>Características epidemiológicas</i>					
Exposição a área endêmica					
Não	55	04	0,31	0,55	0,13-2,29
Sim	100	04	***		
Uso de drogas injetáveis					
Não	141	07	0,55	1,44	0,17-12,55
Sim	14	01	***		
Antecedente de transfusão					
Não	145	08	0,59	0,82	0,04-15,12
Sim	10	0	***		
Convívio com cães doentes					
Não	146	06	0,09	5,41	0,95-30,69
Sim	09	02	***		
Familiares com LV					
Não	154	08	0,95	6,06	0,23-160,1
Sim	01	0	***		
Vizinhos com LV					
Não	151	08	0,81	1,98	0,09-39,87
Sim	04	0	***		
<i>Antecedentes patológicos associados a reatividade cruzada com Leishmania spp</i>					
Doença de Chagas					
Não	150	08	0,77	1,61	0,08-31,58
Sim	05	0	***		
Tuberculose					
Não	129	06	0,41	1,65	0,32-8,65
Sim	26	02	***		
Tb ativa (n=08)	07	01			
Hanseníase					
Não	153	08	0,90	3,61	0,16-81,30
Sim	02	0	***		
Malária					
Não	150	08	0,77	1,61	0,08-31,58
Sim (antecedente)	05	0	***		

Tabela 17. Continuação...

	ELISA com antígeno rK39		p	OR	IC95
	Negativo	Positivo			
<i>Características da infecção pelo HIV</i>					
Tempo de doença					
Mediana em meses	66,5	42	0,42*		
Quartis	21 – 101	30 - 137			
Estádio aids					
Não	45	04	0,24**	0,41	0,10-1,71
Sim	110	04			
Uso de TARV					
Não	29	05	0,01**	0,14	0,03-0,61
Sim	126	03			
Uso de IP					
Não	114	07	0,68**	0,40	0,05-3,33
Sim	41	01			
Contagem de CD4 (células/ μ L)					
Mediana	268	334	0,97*		
Quartis 25 - 75	196 – 464	156 – 504,5			
Intercorrências infecciosas no momento da avaliação					
Não	133	04	0,02**	6,05	1,41-25,97
Sim	22	04			

* Mann-Whitney U test

** Teste exato de Fisher bi-caudal

*** Teste exato de Fisher uni-caudal

4.8 Avaliação baseada na combinação dos resultados de todos os testes sorológicos

Avaliados os três testes sorológicos apresentados anteriormente, observou-se reatividade em 26 pacientes. A prevalência global, definida como a reatividade em qualquer um dos testes sorológicos aplicados, foi de 16%, como mostrado na tabela 14.

A maioria dos pacientes com teste positivo apresentou reatividade no ELISA com antígeno bruto de *Leishmania* spp., com 20 indivíduos. Dos 26 pacientes reagentes 18 eram homens e 8 mulheres. Os pacientes com testes positivos apresentaram menor idade quando comparados com os não-reagentes. As medianas da idade foram de 33 e 39 anos, respectivamente (Mann-Whitney U=1.119; p=0,005). Só um dos pacientes com o teste positivo referiu antecedente de uso de drogas injetáveis. A exposição a área endêmica para LV não mostrou associação com a possibilidade de apresentar testes positivos ($X^2=0,033$; p=0,855). O conhecimento do vetor e os antecedentes de contato com caso humano ou canino

de LV não mostraram diferença entre os grupos. Das doenças com potencial para apresentar reação cruzada com os testes sorológicos para *Leishmania* spp., unicamente a doença de Chagas mostrou associação significativa, pois três dos cinco pacientes com este quadro apresentaram positividade em pelo menos um dos testes ($X^2=7,465$; $p=0,029$). O tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV teve mediana de 73,5 meses para os casos com teste negativo e 27 meses para os pacientes com teste positivo. Esta diferença foi semelhante segundo o teste aplicado (Mann-Whitney $U=1.510$; $p=0,219$). Quando classificados em pacientes com mais e menos de um ano de diagnóstico, houve maior proporção de casos entre os pacientes com menos de um ano de diagnóstico (Teste exato de Fisher; $p=0,04$). Quinze dos 34 pacientes sem uso de TARV (44,1%) apresentou algum teste positivo, contra só 11 dos 129 do grupo que usava TARV (8,5%) ($X^2=25,423$; $p<0,001$). A mediana da contagem de CD4 foi de 258,5 células/ μ L entre os casos negativos e 291 células/ μ L entre os positivos, sem diferenças significantes entre os grupos. A mediana de carga viral foi significativamente maior entre os casos com algum teste positivo (12.156 cópias/mL) comparada àquela dos casos com testes negativos (9.451 cópias/mL; MWU test=1267; $p=0,013$). Os pacientes em estágio aids tiveram menor frequência de testes positivos ($X^2=8,324$; $p=0,004$). Novamente, a presença de alguma intercorrência infecciosa no momento da avaliação esteve associada à positividade dos testes sorológicos ($X^2=8,038$; $p=0,009$). Nesta análise, a tuberculose ativa não se associou à apresentação de algum teste positivo.

Tabela 18 – Características associadas à reatividade a qualquer método sorológico em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

	Reatividade a testes sorológicos para <i>Leishmania</i> spp.		p	OR	IC95
	Negativa	Positiva			
<i>Características pessoais</i>					
Idade em anos (mediana)	39	33	0,005*		
Quartis	34 – 44	29,7 - 38			
Gênero			0,95**	1,03	0,42-2,55
Feminino	43	08			
Masculino	94	18			
Comportamento sexual			0,68**	0,81	0,30-2,18
Heterossexual	100	20			
HSH ou bissexual	37	06			

Tabela 18. Continuação...

	Reatividade a testes sorológicos para <i>Leishmania spp.</i>		p	OR	IC95
	Negativa	Positiva			
<i>Características epidemiológicas</i>					
Exposição a área endêmica					
Não	50	09	0,86**	1,09	0,45-2,62
Sim	87	17			
Uso de drogas injetáveis					
Não	123	25	0,27	0,35	0,04-2,80
Sim	14	01	***		
Convívio com cães doentes					
Não	129	23	0,25	2,10	0,52-8,52
Sim	08	03	***		
Famíliares com LV					
Não	136	26	0,84	1,72	0,07-43,30
Sim	01	0	***		
Vizinhos com LV					
Não	133	26	0,50	0,56	0,03-10,71
Sim	04	0	***		
<i>Antecedentes patológicos associados a reatividade cruzada</i>					
Doença de Chagas					
Não	135	23	0,03	8,80	1,39-55,61
Sim	02	03	***		
Tuberculose					
Não	114	21	0,48	1,18	0,40-3,45
Sim	23	05	***		
TB ativa (n=08)	05	03			
Hanseníase					
Não	135	26	0,71	1,02	0,05-21,92
Sim	02	0	***		
Malária					
Não	133	25	0,59	1,33	0,14-12,40
Sim (antecedente)	04	01	***		
<i>Características da infecção pelo HIV</i>					
Tempo de doença					
Mediana em meses	73,5	27	0,22*		
Quartis	25 – 101	12,5 – 101			
Estádio aids					
Não	35	14	0,004	0,29	0,12-0,70
Sim	102	12	**		

Tabela 18. Continuação...

	Reatividade a testes sorológicos para <i>Leishmania</i> spp.		p	OR	IC95
	Negativa	Positiva			
Uso de TARV					
Não	19	15	<0,001	0,12	0,05-0,30
Sim	118	11	**		
Uso de IP (n=42)					
Não	99	22	0,19	0,47	0,15-1,47
Sim	38	04	**		
Contagem de CD4 (células/ μ L)					
Mediana	258,5	291	0,615*		
Quartis	192,5 - 460,5	198,2 - 516,7			
Intercorrências infecciosas no momento da avaliação					
Não	120	17	0,01	3,74	1,44-9,71
Sim	17	09	****		

* Mann Whitney U test

** Qui-quadrado

*** Teste exato de Fisher uni-caudal

**** Teste exato de Fisher bi-caudal

4.9 Concordância entre os testes sorológicos para *Leishmania* spp.

A comparação entre os testes mostrou baixa concordância bruta ou ajustada pelo índice *kappa*. A comparação entre a RIFI e os testes de ELISA foram os de pior concordância, com resultados negativos. O valor do *kappa* entre RIFI e ELISA com antígeno bruto foi de -0,043; e entre RIFI e ELISA com antígeno rK39 foi de -0,034. O *kappa* entre os dois testes de ELISA teve o valor de 0,385, correspondendo a uma concordância fraca.

A tabela 19 mostra os resultados das concordâncias segundo cada comparação realizada.

Tabela 19 – Concordância entre os testes sorológicos aplicados para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp., em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

		Reação de imunofluorescência indireta	
		Negativa	Positiva
ELISA com	Negativo	139	04
antígeno bruto	Positivo	20	0
Total		159	04
Concordância bruta=85,28%		<i>Kappa</i> =-0,043	

		Reação de imunofluorescência indireta	
		Negativa	Positiva
ELISA com	Negativo	151	04
antígeno rK39	Positivo	08	0
Total		159	04
Concordância bruta=92,64%		<i>Kappa</i> =-0,034	

		ELISA com antígeno bruto	
		Negativo	Positivo
ELISA com	Negativo	141	14
antígeno rK39	Positivo	02	06
Total		155	08
Concordância bruta=90,18%		<i>Kappa</i> =0,385	

4.10 Reação em cadeia pela polimerase para *Leishmania* spp em sangue e medula óssea

Foi observada positividade ao teste em três pacientes. Os três pacientes foram assintomáticos e apresentaram resultado positivo no teste de ELISA com antígeno bruto. Um deles apresentou também reatividade ao teste de ELISA com antígeno rK39. O escasso número de testes positivos prejudicou a análise estatística. Neste grupo, duas pacientes foram mulheres e um homem. A mediana da idade dos casos positivos foi de 31,5 anos. Os três pacientes referiram exposição a área endêmica. Além disso, dois referiram contato com cão portador de LV. A comparação com a positividade a outras doenças com reações sorológicas

cruzadas não foi importante para este teste. Nenhum dos pacientes referiu ter usado drogas injetáveis nem ter recebido transfusão em algum momento. Sobre a infecção pelo HIV, a mediana do tempo de diagnóstico foi de 16,5 meses. Um paciente tinha menos de um ano de diagnóstico. Só um deles encontrava-se em uso de TARV, com esquema composto por AZT+3TC+EFZ. Esse era o único paciente em estágio aids da infecção pelo HIV. Os três pacientes tinham contagem de células T CD4+ acima de 200 células/ μ L. Dois deles apresentavam alguma intercorrência infecciosa no momento da avaliação. Um deles apresentou sinusite aguda e a outra estava em tratamento por doença pélvica inflamatória.

A comparação dos dados categorizada segundo positividade ou não ao teste de PCR aparece na tabela 20.

Tabela 20 - Características associadas à positividade ao teste de PCR para *Leishmania* spp. em sangue em 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

	PCR para <i>Leishmania</i> spp. em sangue		p	OR	IC95
	Negativo	Positivo			
<i>Características pessoais</i>					
Idade (mediana)	37	31,5	0,04*		
Quartis	33,2 – 44	29 (só 25)			
Gênero					
Feminino	49	02	0,23**	0,22	0,02-2,49
Masculino	111	01			
Comportamento sexual					
Heterossexual	117	03	0,57**	0,39	0,02-7,62
HSH ou bissexual	43	0			
<i>Características epidemiológicas</i>					
Exposição a área endêmica					
Não	59	0	0,257	4,10	0,21-80,83
Sim	101	03	***		
Uso de drogas injetáveis					
Não	145	03	0,75	1,34	0,07-21,18
Sim	15	0	***		
Antecedente de transfusão					
Não	150	03	0,83	2,05	0,10-42,32
Sim	10	0	***		
Convívio com cães doentes					
Não	151	01	0,01	33,56	2,77-405,91
Sim	09	02	***		

Tabela 20. Continuação...					
	PCR para <i>Leishmania</i> <i>spp.</i> Em sangue		p	OR	IC95
	Negativo	Positivo			
Famíliares com LV					
Não	159	03	0,98	15,19	0,52-442,31
Sim	01	0	***		
Vizinhos com LV					
Não	156	03	0,93	4,97	0,22-111,16
Sim	04	0	***		
<i>Características da infecção pelo HIV</i>					
Tempo de doença					
Mediana em meses	67	16,5	0,04*		
Quartis	21,7 – 101	10 (só 25)			
Estádio aids					
Não	47	02	0,21**	0,21	0,02-2,35
Sim	113	01			
Uso de TARV					
Não	32	02	0,11**	0,13	0,01-1,42
Sim	128	01			
Uso de IP					
Não	118	03	0,58**	0,40	0,02-7,87
Sim	42	0			
Contagem CD4 (células/ μ L)					
Mediana	277	401,5	0,49*		
Quartis	190,7 – 468,5	291 (só 25)			
Intercorrências infecciosas no momento da avaliação					
Não	136	01	0,07**	11,25	0,98-129
Sim	24	02			

* Mann-Whitney U test

** Teste exato de Fisher bi-caudal

*** Teste exato de Fisher uni-caudal

O gel com as amostras positivas na PCR é mostrado na figura 1. O primeiro e o último canal correspondem ao marcador de peso molecular (MPM) ϕ X-174 RF DNA-*Hae* III, o seguinte canal mostra o controle positivo (C+), proveniente de uma cultura de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. De esquerda à direita, os seis canais seguintes correspondem ao DNA extraído do sangue dos pacientes. Os três primeiros correspondem a pacientes com resultado positivo e os três últimos a pacientes com resultado negativo. Os números correspondem ao número da ficha de cada um deles. O nono canal (C+2) corresponde a controle de DNA

extraído de medula óssea (diluído 1/10), proveniente de um indivíduo sabidamente positivo para *Leishmania* spp. O penúltimo canal (C-), mostra o controle negativo da respectiva reação.

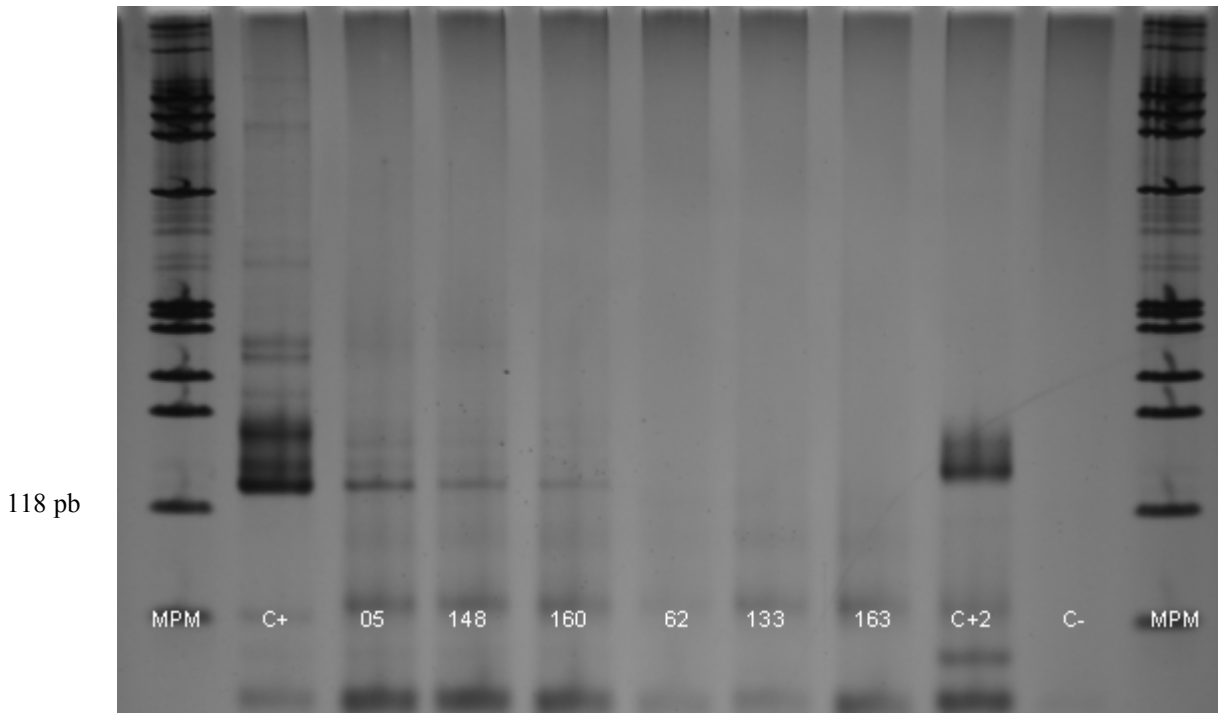


Figura 1 – Fotografia de um gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, contendo as amostras positivas na reação em cadeia pela polimerase, identificados entre 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

4.11 Avaliação do grupo de pacientes suspeitos de infecção sintomática por *Leishmania (L.) chagasi*

Segundo os critérios relatados na metodologia foram identificados sete pacientes suspeitos de LV. Seis deles foram avaliados durante a internação para investigar alguma intercorrência associada à infecção pelo HIV. O restante foi avaliado de forma ambulatorial por sintomas de febre, tosse, hepatoesplenomegalia, leucopenia e plaquetopenia. Um paciente tinha o antecedente de LV tratada em duas oportunidades. O diagnóstico final no momento da avaliação foi de pneumonia bacteriana. Os sinais e sintomas dos sete pacientes descrevem-se no gráfico 5.

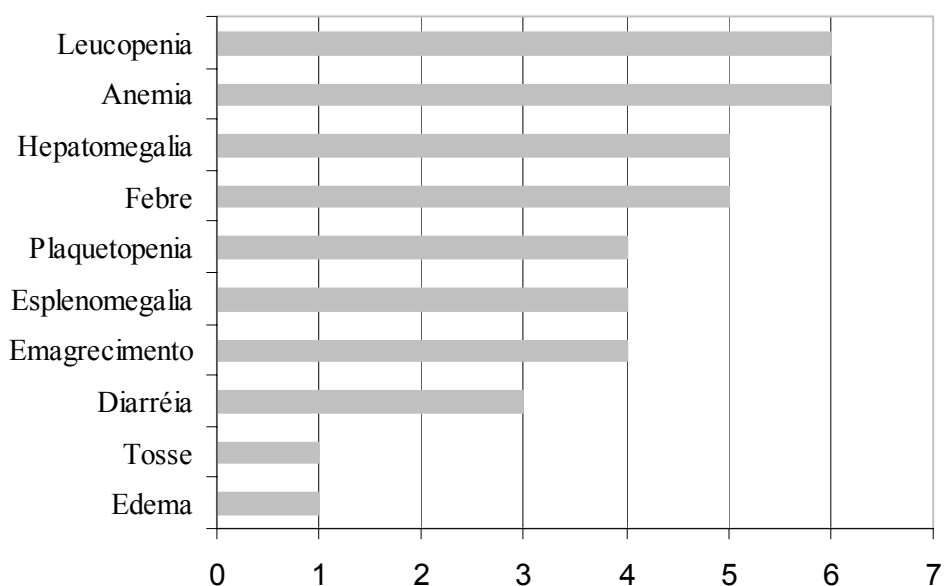


Gráfico 5 - Sinais e sintomas dos pacientes sintomáticos (n=7) identificados entre 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Os sete pacientes sintomáticos foram homens, com mediana de idade de 42 anos, naturais de municípios fora do DF, três provinham da Região Nordeste, dois da Região Sudeste e um paciente de cada uma das Regiões Norte e Sul. Um indivíduo relatou conhecimento sobre flebótomo e outro referiu convívio com cão doente. Das doenças associadas com reatividade cruzada, dois pacientes tiveram diagnóstico final de tuberculose pulmonar. Não houve casos em portadores das outras doenças investigadas. Os sete indivíduos foram submetidos a aspirado de medula óssea. Nenhum dos pacientes teve diagnóstico final de LV, avaliados por exame direto da amostra de medula óssea corada pelo método de Giemsa e pela cultura; nem pelo PCR para *Leishmania* spp., em sangue ou medula óssea. Uma das amostras de medula teve a avaliação na pesquisa direta prejudicada pela escassez de material nas lâminas examinadas. As amostras foram submetidas também a cultura para bactérias aeróbias, fungos e micobactérias. Um único paciente teve resultado positivo, com crescimento de uma micobactéria atípica. Dados adicionais destes pacientes encontram-se na descrição deste grupo, no Anexo 2.

Durante a avaliação clínica do resto dos pacientes, dois deles foram submetidos a aspirado de medula óssea para investigação de anemia sem cumprir os critérios da síndrome suspeita de LV. Estas amostras foram também submetidas à avaliação de rotina para diagnóstico de LV. Nenhuma das duas amostras mostrou resultado positivo na avaliação direta, cultura ou PCR para *Leishmania* spp.

5 Discussão

A leishmaniose, nas suas formas tegumentar e visceral, é uma das dez doenças tropicais consideradas como prioritárias pela OMS⁽¹¹⁰⁾. Considerada também como doença negligenciada^(110, 111), tem apresentado expansão progressiva desde as áreas rurais para a periferia das grandes cidades.

A LV é a forma mais letal das leishmanioses. Embora acometa indivíduos previamente saudáveis, a sua incidência é maior em pessoas com fatores que diminuem a competência imunitárias como crianças desnutridas. Alguns aspectos da LV em pacientes vivendo com HIV/aids apontam para o comportamento oportunista desta infecção, como a maior gravidade do acometimento clínico, sua apresentação mais frequente em indivíduos com contagens de linfócitos T CD4+ < 200 células/ μ L, a maior frequência de recaídas quando não é corrigida a imunodeficiência com o tratamento específico da infecção pelo HIV, a maior intensidade do parasitismo inclusive no sangue periférico e o novo mecanismo de transmissão entre UDI. A maioria dos autores reconhece o comportamento oportunista da LV, porém a OMS reconhece a doença como indicadora de imunodeficiência grave sem por isso considerá-la como condição definidora de aids.^(2, 10, 14, 16, 55, 112, 113) Considerando que em áreas endêmicas muitos indivíduos seriam acometidos pela LV, independentemente da sua condição de infectados ou não pelo HIV, torna-se difícil aceitar sem restrições a presença de LV como condição definidora de aids. Com a facilidade atual para o deslocamento de pessoas de uma área para outra, seja por motivos socioeconômicos, turísticos ou militares, a exposição cada vez maior de indivíduos não imunes ao ciclo zoonótico da *Leishmania* pode levar no futuro ao incremento do número de casos de co-infecção em áreas endêmicas, onde o fator amplificador dependente do hábito de UDI pode ter um impacto maior⁽¹¹⁾

O estudo teve por objetivo estimar a magnitude da infecção por *Leishmania* spp., em uma população de pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Hospital Universitário de Brasília, utilizando vários testes para a detecção da infecção.

5.1 Representatividade da amostra

O Hospital Universitário de Brasília é um centro de referência não só para pacientes com HIV, mas também com LV no DF, o que aumentaria a possibilidade de observar na população atendida no local os casos de co-infecção *Leishmania*/HIV e elevaria a frequência do evento de interesse cuja prevalência pretende-se estimar. A maneira como os pacientes

foram convidados a participar não foi aleatória, o que aumenta a chance de ter incorrido em um viés de seleção já que a amostra foi selecionada por conveniência, à medida que os pacientes se apresentavam para o atendimento de rotina no Ambulatório de DIP do HUB. No entanto, a amostra foi suficientemente grande e constituída por aproximadamente 50% do total de pacientes atendidos no serviço, o que diminui o impacto potencial desse viés. Por outro lado, o baixo grau de recusa a participar do estudo ajudou a constituir uma amostra mais robusta. Sete pacientes não aceitaram participar por diversos motivos. Quatro, por considerar que devido à sua naturalidade brasiliense e por não ter saído nunca por períodos prolongados da cidade não precisavam do teste diagnóstico para LV. Dois deles referiram “ter veias difíceis e medo de agulhas” e uma paciente recusou-se sem explicar motivos. Estudos prévios realizados com pacientes do mesmo universo mostraram características basais semelhantes^(114, 115), o que reflete que se trabalhou com uma população cujas características são relativamente estáveis já que outras duas amostras em períodos diferentes apresentaram características similares na mesma instituição. As características de idade e gênero da amostra estudada foram comparadas com os dados da casuística nacional levando em consideração os dados divulgados no último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde⁽¹¹⁶⁾. Observou-se que em relação ao gênero a amostra assemelha-se à casuística nacional, com 68,7% e 67,7% de homens, respectivamente. Quanto à idade, houve uma diferença, mostrando que na amostra havia cerca de 40% de indivíduos maiores que 40 anos, enquanto na casuística nacional 29% encontram-se nessa faixa etária.

Portanto, a amostra representa razoavelmente a população atendida no centro onde o estudo foi realizado, com possibilidade de produzir informação com validade interna adequada. O julgamento da validade externa dos resultados representa um desafio, pois depende da reprodução das inúmeras condições que afetam um fenômeno tão complexo como a co-infecção *Leishmania*/HIV e por este motivo qualquer extrapolação para outras populações ou centros de atendimento deverá ser realizada com a devida cautela.

5.2 Necessidade de um padrão-ouro para a definição da infecção assintomática

A principal limitação enfrentada deriva-se do fato de que não existe um padrão-ouro universalmente aceito para a definição da infecção assintomática nem subclínica, pois testes cutâneos, sorológicos e moleculares têm apresentado resultados variáveis em estudos prévios.

A intradermoreação de Montenegro (IDRM), inicialmente usada como diagnóstico para leishmaniose tegumentar, tem mostrado utilidade na mensuração da magnitude da

infecção por distintas espécies de *Leishmania* em diversas populações^(15, 117). Quando usada para detectar a infecção por espécies de *Leishmania* com tropismo visceral, mostrou, em áreas endêmicas do nordeste brasileiro, prevalências entre 18 e 62%⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. Nas áreas onde existe unicamente transmissão de LV, certamente a IDRM constitui uma ferramenta poderosa e exeqüível para detectar a infecção assintomática por *L.chagasi*, oferecendo como única dificuldade a incapacidade para distinguir os pacientes que já tiveram LV sintomática e curaram. No entanto, esta última limitação desaparece quando o objetivo é estimar a prevalência de infecção por *L. chagasi* em uma população, independentemente dos sintomas que ela causa ou tenha causado.

Os testes sorológicos e moleculares foram apresentados no capítulo da introdução demonstrando variabilidade importante (Tabela 1).

A dificuldade é maior nas regiões onde se observa a circulação simpátrica de várias espécies de *Leishmania*. Esta situação exigiria que o teste diagnóstico tivesse uma especificidade em nível de espécie do parasito, que repetidamente tem sido um problema no desenvolvimento de instrumentos de diagnóstico nas leishmanioses, devido à elevada homologia genotípica e fenotípica entre as diferentes espécies de *Leishmania*. Para os pacientes oriundos do Distrito Federal deve ser considerada a possibilidade de infecções tanto por *Leishmania (V.) braziliensis*⁽¹²¹⁾ quanto por *L.(L.) chagasi*, tanto pela exposição dos pacientes fora do DF a áreas endêmicas de LV quanto a possível exposição na área de transmissão recentemente descrita dentro do DF. A especificidade exigida dos testes sorológicos certamente enfrenta problemas para as reações com antígenos brutos, como o ELISA com antígeno bruto de *L. chagasi* e a imunofluorescência indireta. Acredita-se que a reação de ELISA com antígeno rK39 seja muito mais específica e possa detectar melhor a infecção predominantemente por *L.chagasi*. Por outro lado, o antígeno rK39 foi desenvolvido para detectar casos sintomáticos de LV e os pesquisadores que o desenvolveram propunham inclusive que o teste fosse utilizado como indicador de doença ativa. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que este antígeno não detecta unicamente os casos sintomáticos^(20, 122, 123) o que o tornaria um instrumento disponível para estudos de soroprevalência de LV. Contudo, a validação do antígeno rK39 como instrumento para detectar a infecção assintomática até o momento tem tropeçado com a dificuldade de encontrar o comparador ideal para definir a sua sensibilidade.

5.3 Avaliação da especificidade dos testes em pessoas vivendo com HIV/aids e sintomas de LV

O estudo foi planejado para avaliar unicamente a especificidade das provas, devido à baixa probabilidade de encontrar suficientes casos de co-infecção *Leishmania*/HIV no curto período de estudo que permitissem estimar a sensibilidade. A avaliação neste subgrupo de pacientes não enfrentou a dificuldade do uso de um padrão-ouro já que a combinação da pesquisa direta de amastigotas na medula óssea mais a cultura de promastigotas em meio específico constituem um padrão-ouro razoável para a comparação. No entanto, nenhum dos pacientes com a síndrome suspeita mostrou resultado positivo dos exames parasitológicos no período de estudo e o seu número foi pouco relevante para ser útil na estimativa da especificidade dos testes. Todos os pacientes tiveram confirmação de outros diagnósticos que explicaram a síndrome clínica observada e receberam tratamento específico para essas patologias. Nenhum dos três pacientes com pelo menos um teste reagente para leishmaniose foi submetido a tratamento específico e os três apresentaram doenças causadas por micobactérias. A observação prolongada da resposta ao tratamento dessas patologias permitirá a reavaliação da possibilidade de acometimento por LV. Também, a possibilidade de diagnosticar a infecção subclínica na vigência de uma doença com sintomas e sinais semelhantes aos da LV constitui um desafio para o manejo de indivíduos com HIV/aids, exigindo o uso de outros métodos de diagnóstico para detectar outras doenças e confiar predominantemente nos resultados dos exames parasitológicos.

5.4 Limitações inerentes ao tipo de estudo

A limitação mais importante em relação ao componente retrospectivo da pesquisa foi a heterogeneidade na qualidade dos registros nos prontuários e a sua organização interna que dificultou a obtenção dos dados de interesse. No entanto, salienta-se o fato de que todos os pacientes que aceitaram participar tinham prontuário disponível para análise e a completude dos dados recuperados foi adequada. A exploração das possíveis associações entre a positividade dos testes e as variáveis relevantes enfrentou a dificuldade inerente aos estudos transversais, onde a temporalidade dos fatos não pode ser estabelecida e ainda, a impossibilidade de ter disponível no mesmo momento em que era realizada a entrevista as avaliações de carga viral e contagem de linfócitos T CD4, por exemplo. Uma outra dificuldade foi o manejo dos resultados da carga viral do HIV (CV). A metade dos pacientes apresentou CV indetectável, o que impossibilitou trabalhar com os dados brutos ou

transformados em logaritmos, sendo possível unicamente a descrição da mediana e a análise de forma estratificada.

5.5 Padronização da PCR

A apropriação adequada de métodos desenvolvidos e validados em outros laboratórios pode representar um desafio principalmente quando se pretende utilizar o método para um objetivo como o do presente trabalho, onde a avaliação da magnitude do fenômeno de interesse depende do sucesso da aplicação de uma técnica inovadora. O Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical realizou pela primeira vez a PCR durante esta pesquisa e aproveitou-se a oportunidade para tentar reproduzir a experiência do Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR realizando a PCR gênero-específica em sangue periférico e em medula óssea. Os experimentos tiveram que ser adaptados às condições locais até conseguir reproduzir o desempenho esperado.

5.6 Estimativa da prevalência da co-infecção *Leishmania*/HIV

Para calcular a prevalência optamos inicialmente por valorizar a prevalência global obtida da positividade apresentada por qualquer um dos testes aplicados. Poucos estudos avaliaram esta prevalência em populações semelhantes. Nossa amostra teve a prevalência de infecção assintomática por *Leishmania* spp., de 16%. Esta proporção é elevada se tomamos em consideração que Brasília não era até recentemente, considerada área endêmica para LV. Porém, a cidade nasceu do nada, e para sua construção foi necessária mão de obra vinda de outras regiões do país. Boa parte dela chegou do nordeste, área endêmica do agravo em questão, o que poderia ter favorecido a migração de indivíduos assim como de cães domésticos infectados. A migração de cães doentes de outras áreas urbanas onde existe transmissão de LV já foi documentada no DF em 2005 em animais procedentes de Palmas e de cidades de Minas Gerais do entorno de Brasília. Até 2004, anualmente foram descritos casos não-autóctones de LV em Brasília. Em 2005 foram relatados os dois primeiros casos autóctones do DF, e em 2006, mais um caso encontra-se em tratamento. As autoridades locais de saúde já identificaram os vetores nas áreas com presença de casos de LV, e a epizootia encontra-se em estudo (Secretaria de Saúde do DF - Grupo de Controle de Endemias, comunicação oral). Portanto, algumas áreas do Distrito Federal constituem um risco real de transmissão para LV. Em Belo Horizonte e Montes Claros (MG), Orsini (2003), encontrou 10,7% de positividade com o teste mais sensível (ELISA com antígeno bruto), avaliando 381

pacientes em centros de referência para HIV⁽¹²³⁾. Esta área é conhecida como área endêmica desde 1990⁽¹²⁴⁾. Nas cidades de Córdoba e Sevilha no sul da Espanha, foram descritos casos de infecção assintomática entre 90 indivíduos soropositivos para HIV. Este pesquisador estimou a maior prevalência utilizando o teste de ELISA-PCR (31%), enquanto testes sorológicos tiveram taxas de positividade entre 2,2% (ELISA) e 3,3% (*Western blot*)⁽¹²⁵⁾. É de notar que as taxas de positividade por meio do uso de técnicas sorológicas diferem nas duas áreas. No Brasil, a frequência de testes sorológicos positivos é maior à encontrada na Europa. Este fato já foi avaliado também em pacientes co-infectados e com doença clínica em São Paulo⁽⁸³⁾. Aparentemente a *L.(L.) chagasi* induz maior reação de anticorpos comparada à *L.(L.) infantum*, nos pacientes soropositivos. Assim, a sorologia seria uma ferramenta útil nos pacientes com LV no Novo Mundo, de forma diferente de outros continentes onde circulam outras espécies. Um estudo que deverá ser realizado é a comparação da magnitude da reação de anticorpos entre as duas espécies de *Leishmania* supramencionadas nos pacientes vivendo com HIV/aids.

A elevada proporção de pacientes com pelo menos um teste reagente poderia dever-se a reações cruzadas, as que foram investigadas de forma limitada com os dados obtidos durante a entrevista e no prontuário, que não associações significativas. No entanto, cabe ressaltar os três pacientes sintomáticos que apresentaram doença ativa por micobactérias no momento da avaliação sorológica e os três dos cinco pacientes com testes reagentes para doença de Chagas apresentaram pelo menos um teste para leishmaniose positivo. Digno de nota é o fato de que o ELISA rK39 não apresentou reações cruzadas com a doença de Chagas.

5.7 Concordância entre os testes sorológicos

O estudo avaliou a concordância entre os testes sorológicos utilizados. A comparação com a detecção de DNA não foi realizada, acreditando que não seria pertinente este procedimento por considerar que os testes destinam-se a avaliar fenômenos diferentes que não têm que ser necessariamente concordantes.

Os testes sorológicos mostraram uma baixíssima concordância quando comparadas a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com os dois testes de ELISA. Deve-se considerar que a RIFI mede anticorpos contra antígenos de superfície da *Leishmania*, e tem baixo poder na detecção de casos subclínicos, pelo que não é usada de forma rotineira na avaliação desta condição^(17, 21). Nenhum dos pacientes reagentes à RIFI teve um exame de ELISA positivo. O tipo de anticorpos detectados pela RIFI e pelo ELISA também poderia

explicar esta diferença na concordância. Por outro lado, a concordância entre os testes de ELISA foi positiva, embora baixa. O antígeno rK39 também mostrou menor taxa de positividade quando comparado ao ELISA com antígeno bruto no estudo realizado em Minas Gerais⁽¹²³⁾. Ainda está em discussão se o rK39 seria o exame que marca a atividade da doença, mas indivíduos em áreas endêmicas com o teste positivo parecem desmentir o a suposta capacidade de discriminar os indivíduos com doença ativa^(88, 126, 127).

5.8 Fatores potencialmente associados com a positividade da sorologia para *Leishmania*

Foi difícil associar as características dos pacientes com teste de RIFI positivo. Dois deles têm também sorologia para doença de Chagas, o que pode significar uma reação cruzada com esta outra parasitose. Nenhum destes dois pacientes teve xenodiagnóstico para doença de Chagas positivo no acompanhamento. Considerando a limitação da escassez de resultados positivos com a RIFI, a reatividade a este teste parece ser distinta dos outros testes sorológicos. Os pacientes reagentes na RIFI mostraram melhor competência imune do que os reagentes aos outros testes, medido pelo nível de CD4 e CV. Nos outros testes, houve predominância de testes positivos em pessoas com CV detectável e menores valores de CD4.

O teste de ELISA com antígeno bruto já foi utilizado para medir a magnitude da infecção por *Leishmania*^(17, 19, 120). Neste estudo foi o teste com a maior positividade (12,3%). A positividade encontrada não difere muito dos estudos realizados em outras áreas como Belo horizonte (17%)⁽¹²³⁾. Em população geral não infectada pelo HIV a positividade chega até 19,7%, como no caso de crianças de áreas endêmicas no estado de Maranhão⁽¹¹⁹⁾. Quando analisados os pacientes com ELISA positivo, não foi possível identificar alguma associação estatística significativa. Ressalta-se unicamente o caso de um paciente ter ao mesmo tempo doença de Chagas com xenodiagnóstico positivo e sorologia positiva ao ELISA. Embora os valores médios de CD4 nos pacientes com o teste positivo tenham sido maiores, estes não mostraram diferenças. O mesmo aconteceu com a CV. Parece contraditório encontrar dois pacientes em estágio aids, porém sem uso de TARV. Isso aconteceu devido que no momento do diagnóstico os pacientes que também eram sintomáticos não tinham contagens de CD4 e CV, pelo que foram encaminhados para tratamento posteriormente à coleta de amostras. A ausência de uso de TARV e a de diagnóstico de aids apresentaram-se relacionadas com o teste de ELISA positivo. Isto não significa que pacientes sem TARV são mais propensos a ter LV subclínica, mas que estes pacientes têm maior probabilidade de reagir nessa prova, devido à sua imunidade relativamente preservada. Deve ser considerado que esses pacientes não

iniciaram a TARV porque ainda possuem imunidade adequada, sendo desnecessária a intervenção terapêutica naquele momento.

Como acontece com o teste de ELISA com antígeno bruto, o ELISA-rK39 também é utilizado não só no diagnóstico de LV, mas como ferramenta na aferição da prevalência de infecção por *Leishmania*. A análise dos resultados do ELISA-rk39 não mostrou associações significantes, exceto com o uso de TARV. Não foi identificada uma explicação plausível para esta associação.

A associação entre a positividade nos testes de ELISA e a concomitância de uma intercorrência infecciosa merece comentário particular devido à possibilidade de reações cruzadas com outras doenças, que dificulta na prática a tomada de decisão sobre o tratamento específico.

5.9 Interpretação da positividade global baseada na combinação dos três métodos sorológicos

O número total de pacientes com testes sorológicos positivos poderiam ser considerados na abordagem menos conservadora como realmente infectados. Utilizando essa abordagem, notou-se que os pacientes com resultados positivos pela PCR já estavam incluídos por terem tido pelo menos algum resultado positivo na sorologia. Esta análise permitiu a identificação mais consistente dos fatores potencialmente associados com um resultado positivo. As características gerais não apresentaram associações significativas, exceto a idade que foi menor nos indivíduos infectados, mas a diferença observada entre os grupos foi unicamente de seis anos. Não houve associação entre infecção por *Leishmania* spp. e UDI. Este fato difere do observado na Europa e sugere que a transmissão da infecção parasitária por essa via não acontece com frequência nos pacientes HIV positivos na amostra estudada. No entanto, esta falta de associação deve ser interpretada com cautela, já que os dados obtidos através da entrevista podem subestimar a frequência real de UDI. A falta de associação da positividade com o contato com área endêmica pode ter sofrido o impacto do viés de memória e o impacto não mensurável da possível identificação inadequada da exposição por meio de UDI. Outro fator que pode afetar essa análise é o possível erro na classificação de municípios autóctones que não tenham sido identificados como áreas com transmissão e realmente possuam este risco no contexto de sub-registro ou falta de investigação de casos. Como nos casos das avaliações dos testes de ELISA, os pacientes sem TARV e com CV detectável apresentaram maior possibilidade de estarem infectados por *Leishmania* spp. Parece que o fato de ter vírus em níveis detectáveis não impede que exista uma resposta de anticorpos

detectável, e ao mesmo tempo, mecanismos de defesa ainda não afetados pelo HIV, impedem que a doença progrida para as formas sintomáticas. Já os pacientes em estágio aids, mesmo que com melhores parâmetros imunológicos, a julgar pela maior contagem de linfócitos T CD4+ e menor CV, estariam desprovidos da capacidade de produzir anticorpos que permitissem a detecção da infecção. Por outro lado a falta de reatividade de pacientes com melhores indicadores imunológicos pode refletir uma melhor regulação da resposta imune que se torna competente para controlar a infecção por *Leishmania* lançando mão dos mecanismos da imunidade celular, diminuindo paralelamente a produção de anticorpos.

Em resumo, a amostra apresentou uma prevalência de infecção assintomática por *Leishmania*, de 16%, medida por várias técnicas. Pacientes com doença de Chagas e doenças causadas por micobactérias podem ter apresentado reações cruzadas que deverão ser apropriadamente investigadas. Não foi detectada associação entre a infecção por *Leishmania* e ser usuário de drogas injetáveis; ter contato com casos humanos ou caninos de LV; e ter estado exposto a áreas consideradas endêmicas. A probabilidade de diagnóstico foi maior entre pacientes sem TARV e com níveis de CV detectáveis, assim como em pacientes com alguma intercorrência infecciosa no momento da avaliação.

Certamente, vários dos fatores que tiveram associação com a positividade estão relacionados como o TARV e o nível de CV. Considerando que se trata de uma exploração inicial e preliminar dos possíveis determinantes da positividade, não foi realizada a análise multivariada que poderia discriminar aquelas relações mais robustas. Os maiores determinantes da infecção por *Leishmania* podem não estar relacionados com as variáveis investigadas e cuja temporalidade é impossível definir pelo desenho da pesquisa.

Orsini (2003) descreveu em Belo Horizonte e Montes Claros, municípios com maior número de casos de LV em Minas Gerais, que a frequência de positividade entre pacientes com HIV/aids a vários exames para *Leishmania* variou entre 0,8 e 17%. Seus achados mostraram que 5% deles eram positivos pela técnica de RIFI, 17% pelo teste de ELISA com antígeno bruto, 0,8% pelo ELISA com antígeno rK39, e 7% pela PCR. Ela descreveu que existe associação entre ser classificado como aids e ter um teste positivo. Após acompanhamento entre 9-20 meses não houve casos de LV clínica, com negativização de todos os testes inicialmente positivos. Concluiu-se que a TARV pode ser efetiva para impedir o desenvolvimento de LV entre pacientes com HIV/aids.

Na Espanha, existem vários relatos de infecção subclínica por *Leishmania*. Em Sevilha, em 1996 relatou-se 5,6% de infecções subclínicas entre 107 pacientes com HIV/aids, usando o aspirado de medula óssea como padrão para diagnóstico⁽¹²⁾. Medrano et al.,

avaliando várias técnicas de diagnóstico de *Leishmania* em populações de distintas áreas e condições de soropositividade, encontrou entre pacientes com HIV/aids assintomáticos que 21,4% (3/14) pacientes eram positivos ao ELISA com antígeno rK39, dois ao Western blot e nenhum à RIFI⁽⁵⁹⁾. No sul da Espanha (Sevilha e Córdoba), Gállego et al. estudando uma população de 90 pessoas assintomáticas com HIV/aids descreveu positividade para *Leishmania* spp em 3,3% pelo método de ELISA com antígeno não descrito, 2,2% por meio de Western blot e 31,1% com ELISA-PCR. Os pesquisadores não fizeram comparações entre os grupos. Em estudo que avaliou um teste diagnóstico para a co-infecção *Leishmania*/HIV, Martín-Sánchez et al., analisaram amostras de sangue e medula óssea de uma população de soropositivos para o HIV sem suspeita de LV com a técnica de ELISA-PCR para *Leishmania*, e encontraram quinze de 33 amostras positivas⁽¹⁰⁷⁾.

Deniau et al., (2003) relataram os resultados de sensibilidade de vários testes realizados em soros de pacientes co-infectados. Eles referem sensibilidade de 67% para a RIFI, 89% para ELISA com antígeno bruto de *L.(L.)infantum* e 62% para ELISA com antígeno rK39. A especificidade para estes testes foi de 100, 90 e 90%, respectivamente O estudo foi realizado com casos confirmados de co-infecção provenientes da Espanha⁽¹²⁸⁾.

Nos países europeus da bacia mediterrânea, não é difícil considerar um teste sorológico ou uma intradermoreação de Montenegro positiva como caso de LV, em suas variadas formas, desde que não tenha havido exposição a outras áreas onde há transmissão de leishmaniose tegumentar. Porém, no Brasil coexistem a LTA e a LV, havendo possibilidade de um teste positivo ser provocado por qualquer uma das duas formas de leishmaniose. Na LTA a resposta celular contra antígenos de *Leishmania* spp., acontece pouco tempo depois da inoculação do parasito. Esta resposta, em forma de hipersensibilidade celular tardia é a que torna positivo o teste de Montenegro. Já a resposta de anticorpos não é tão importante quanto a observada nos casos de LV, exceto para alguns pacientes com as formas mucosa⁽¹²⁹⁾ ou cutânea disseminada⁽¹³⁰⁾. A resposta humoral na LTA acontece nos indivíduos que desenvolvem a doença clínica, e os anticorpos tendem a diminuir ou desaparecer após a cura clínica⁽¹³¹⁾. Anticorpos mensuráveis são pouco frequentes entre indivíduos assintomáticos avaliados em áreas de LTA^(132, 133). Estas características da resposta humoral na LTA fazem pensar que provavelmente a positividade observada com os métodos utilizados neste estudo corresponde a casos de LV assintomática e subclínica.

5.10 Utilidade da PCR gênero-específica para a região conservada do k-DNA

A PCR é considerada como um teste altamente eficiente para o diagnóstico de LV⁽⁹⁹⁾, com elevada sensibilidade em indivíduos com HIV/aids^(134, 135). Tem sido sugerida também como instrumento útil no acompanhamento dos casos tratados de LV^(47, 103, 136). O resultados do presente estudo, que utilizou a PCR para detectar LV assintomática entre pacientes com HIV/aids, permitem considerá-la como uma técnica de baixo rendimento para esta situação. A evolução natural da parasitemia ou pelo menos a circulação de DNA do parasito no sangue periférico ainda não foi definitivamente descrita. A variabilidade observada entre os diferentes estudos pode estar relacionada a um fenômeno de parasitemia intermitente cuja periodicidade não tem sido estabelecida e que pode ser diferente em indivíduos que alguma vez foram sintomáticos quando comparado com indivíduos que sempre foram assintomáticos. Além disso, a otimização e validação das técnicas de PCR devem ser cuidadosamente executadas para evitar testes com resultado falso-positivo decorrente de reações inespecíficas como as relatadas com alguns alvos de amplificação e DNA humano⁽¹³⁷⁾.

5.11 Perspectiva

Embora nosso estudo não teve como objetivo avaliar pacientes co-infectados por *Leishmania*/HIV com doença manifesta, a revisão da literatura existente sugere que as respostas sorológicas entre pacientes co-infectados por *L.(L.)chagasi* seriam melhores que as avaliadas nos casos de co-infecção por outras espécies de *Leishmania* viscerotrópicas^(45, 59, 83, 113, 138). A causa desta diferença deverá ser melhor investigada para estabelecer se o fenômeno encontra-se ligado a fatores intrínsecos dos testes utilizados ou reflete mecanismos fisiopatogênicos diferentes que poderiam depender tanto da competência imune do hospedeiro quanto da virulência do parasito. O período da vida no qual acontece a infecção primária por *Leishmania* talvez possa ter um papel crucial na capacidade de produção de anticorpos específicos no momento da reativação da doença causada pelo HIV. Gradoni et al., (1993) sugerem que existe maior concentração de anticorpos específicos contra a *Leishmania* entre pacientes com HIV expostos ao parasito antes da infecção viral, enquanto indivíduos expostos à *Leishmania* spp após a infecção pelo HIV mostram concentrações nulas ou moderadas de anticorpos específicos⁽¹³⁹⁾. A possibilidade de reconstituição imune e o comportamento dos testes sorológicos após o uso de TARV também permanecem como fenômenos que devem ser investigados.

O estudo permitiu a identificação de uma pequena coorte de pacientes com pelo menos um teste positivo que será acompanhada periodicamente no ambulatório de DIP do HUB tentando avançar sobre a possibilidade de padronizar um teste que permita sustentar o diagnóstico da infecção por *Leishmania* de forma mais robusta que a oferecida pelos testes sorológicos. A avaliação da capacidade de linfoproliferação *in vitro* após a exposição a antígenos de *Leishmania* surge como uma possibilidade para demonstrar o contato prévio com o parasito. Neste sentido, os pacientes não foram expostos ao antígeno de Montenegro para evitar a sensibilização⁽¹⁴⁰⁾ que impediria a interpretação adequada dos testes de linfoproliferação. Este teste seria compatível com o estado de imunossupressão, já que a proliferação de linfócitos apresenta-se positiva independente do nível de CD4⁽¹⁴¹⁾. Haverá certamente a oportunidade de detectar precocemente o aparecimento de sintomas e sinais sugestivos de LV ou LTA nesse grupo com testes positivos. Com os dados obtidos no presente trabalho, tentar-se-á implantar a sorologia para *Leishmania* spp. no ambulatório do HUB como um dos testes de rotina ao iniciar o acompanhamento de pacientes com diagnóstico de infecção pelo HIV. O teste de triagem poderia ser o ELISA com antígeno bruto, pelo seu maior rendimento.

6 Conclusões

1. A prevalência de infecção por *Leishmania* detectada por meio de testes sorológicos nos pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Hospital Universitário de Brasília foi de 16%.
2. A positividade de cada um dos métodos sorológicos foi: 2,4% para a RIFI, 12,3% para o ELISA com antígeno bruto de *L. chagasi*, 4,9% para o ELISA com antígeno rK39.
3. A PCR com alvo de amplificação de 120 pares de bases da região conservada do k-DNA de *Leishmania* spp., mostrou positividade de 1,8%.
4. A concordância entre os testes sorológicos foi ruim.
5. Não foi observada associação estatisticamente significativa entre apresentar pelo menos um teste positivo e: gênero, exposição prévia a área endêmica de leishmaniose, história de casos de LV no grupo familiar ou na vizinhança, e uso de drogas injetáveis.
6. Observou-se associação estatisticamente significativa entre ter pelo menos um teste positivo e: ser mais jovem (33 versus 39 anos; $p=0,005$); ter sorologia positiva para doença de Chagas ($p=0,029$); não ter evoluído para aids ($p=0,004$); não estar em uso de tratamento antiretroviral ($p<0,001$); e apresentar uma intercorrência infecciosa no momento da coleta do sangue para a avaliação sorológica ($p=0,01$).
7. A complexidade da técnica de PCR e sua baixa positividade nos casos assintomáticos ou oligossintomáticos de co-infecção *Leishmania*/HIV limitam o seu uso como teste de triagem para a detecção sensível dessa condição.

Referências Bibliográficas

1. Badaró R, Duarte M. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronessi R, Focaccia R, editors. *Veronessi: Tratado de Infectologia*. Segunda ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2002. p. 1254-127.
2. Pearson RD, Sousa AQ, Jeronimo SMB. *Leishmania* species: visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. New York: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005. p. 3145-3155.
3. Brasil. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Leishmaniose visceral grave. Normas e conductas*. Brasília; 2005.
4. Franco AM. 1st World Congress on Leishmaniasis-World Leish1. Istanbul, Turkey, May 5-9, 1997. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92(6):867-70.
5. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27(5):305-18.
6. Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol* 2004;113(1):81-8.
7. Brasil. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Editora MS; 2003.
8. Dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998;12(3):315-7.
9. Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodriguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002;359(9312):1124-5.
10. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002;2(8):494-501.
11. Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58(4):436-43.
12. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(2):298-319.
13. Molina R, Lohse JM, Pulido F, Laguna F, Lopez-Velez R, Alvar J. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60(1):51-3.

14. Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. *Indian J Med Res* 2005;121(4):407-14.
15. Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003;49(1):31-8.
16. Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)* 2001;80(1):54-73.
17. Gama ME, Costa JM, Gomes CM, Corbett CE. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(8):889-93.
18. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986;154(6):1003-11.
19. Adini I, Ephros M, Chen J, Jaffe CL. Asymptomatic visceral leishmaniasis, northern Israel. *Emerg Infect Dis* 2003;9(3):397-8.
20. Al-Nahhas S, Shabaan M, Hammoud L, Al-Taweel A, Al-Jorf S. Visceral leishmaniasis in the Syrian Arab Republic: early detection using rK39. *East Mediterr Health J* 2003;9(4):856-62.
21. Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(4):334-7.
22. Pineda JA, Gallardo JA, Macias J, Delgado J, Regordan C, Morillas F, 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(9):2419-22.
23. Delgado J, Pineda JA, Macias J, Regordan C, Gallardo JA, Leal M, et al. Low sensitivity of peripheral blood smear for diagnosis of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Microbiol* 1998;36(1):315-6.
24. Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(8):2185-97.
25. Hommel M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *J Infect* 1999;39(2):101-11.
26. Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 2000;30(3):608-9.
27. Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001;69(8):4709-18.
28. Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(3):285-91.

29. Peacock CS, Collins A, Shaw MA, Silveira F, Costa J, Coste CH, et al. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Genet Epidemiol* 2001;20(3):383-96.
30. Spellberg B, Edwards JE, Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001;32(1):76-102.
31. Roberts LJ, Handman E, Foote SJ. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *Bmj* 2000;321(7264):801-4.
32. Franke CR, Ziller M, Staubach C, Latif M. Impact of the El Nino/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):914-7.
33. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(5):951-8.
34. Del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, et al. Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French cohort of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2002;186(9):1366-70.
35. De La Rosa R, Pineda JA, Delgado J, Macias J, Morillas F, Mira JA, et al. Incidence of and risk factors for symptomatic visceral leishmaniasis among human immunodeficiency virus type 1-infected patients from Spain in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2002;40(3):762-7.
36. Piot P, Bartos M, Ghys PD, Walker N, Schwartlander B. The global impact of HIV/AIDS. *Nature* 2001;410(6831):968-73.
37. UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update: December 2005. Geneva; 2005.
38. Brasil. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. Brasília; 2005. Report No.: Ano II - nº 1.
39. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996;124(7):654-63.
40. Kovacs JA, Masur H. Prophylaxis against opportunistic infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 2000;342(19):1416-29.
41. Paredes R, Munoz J, Diaz I, Domingo P, Gurgui M, Clotet B. Leishmaniasis in HIV infection. *J Postgrad Med* 2003;49(1):39-49.
42. Sundar S. Diagnosis of kala-azar--an important stride. *J Assoc Physicians India* 2003;51:753-5.
43. Thakur CP, Narayan S, Ranjan A. Kala-Azar (visceral leishmaniasis) and HIV coinfection in Bihar, India: is this combination increasing? *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;32(5):572-3.
44. Lyons S, Veecken H, Long J. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Trop Med Int Health* 2003;8(8):733-9.

45. Pintado V, Lopez-Velez R. [Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19(7):353-7.
46. Mira JA, Corzo JE, Rivero A, Macias J, De Leon FL, Torre-Cisneros J, et al. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70(3):298-301.
47. Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2003;41(11):5080-4.
48. Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Canavate C, Laguna F, et al. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002;185(10):1533-7.
49. Fernandez-Guerrero ML, Robles P, Rivas P, Mojer F, Muniz G, de Gorgolas M. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop* 2004;90(1):11-6.
50. Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003;49(1):55-60.
51. Orsini M, Silva M, Luz ZM, Disch J, Fernandes O, Moreira D, et al. Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(3):259-62.
52. Pintado V, Lopez-Velez R. HIV-associated visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(6):291-300.
53. Rosenthal E, Marty P, Poizot-Martin I, Reynes J, Pratlong F, Lafeuillade A, et al. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89(2):159-62.
54. Rosenthal E, Marty P, del Giudice P, Pradier C, Ceppi C, Gastaut JA, et al. HIV and *Leishmania* coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of *Leishmania*. *Clin Infect Dis* 2000;31(4):1093-5.
55. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354(9185):1191-9.
56. Bittencourt A, Silva N, Straatmann A, Nunes VL, Follador I, Badaro R. Post-kala-azar dermal leishmaniasis associated with AIDS. *Braz J Infect Dis* 2002;6(6):313-6.
57. Rosenthal E, Marty P, le Fichoux Y, Cassuto JP. Clinical manifestations of visceral leishmaniasis associated with HIV infection: a retrospective study of 91 French cases. *Ann Trop Med Parasitol* 2000;94(1):37-42.
58. Russo R, Laguna F, Lopez-Velez R, Medrano FJ, Rosenthal E, Cacopardo B, et al. Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97 Suppl 1:99-105.

59. Medrano FJ, Canavate C, Leal M, Rey C, Lissen E, Alvar J. The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(1):155-62.
60. Reus S, Sanchez R, Portilla J, Boix V, Priego M, Merino E, et al. [Visceral leishmaniasis: a comparative study of patients with and without human immunodeficiency virus infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999;17(10):515-20.
61. Maia ANS, Alves W, Sousa M, Costa W, Oliveira GM, Bonfim R. Estudo descritivo do perfil epidemiológico dos casos de co-infecção *Leishmania chagasi*-HIV no Brasil no período de 2000 a 2004. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(Sup. I):360.
62. Savoia D, Allice T, Tovo PA. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26(1):92-4.
63. Villanueva JL, Alarcon A, Bernabeu-Wittel M, Cordero E, Prados D, Regordan C, et al. Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(10):798-801.
64. Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20(3):202-5.
65. Ribera E, Ocana I, de Otero J, Cortes E, Gasser I, Pahissa A. Prophylaxis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Med* 1996;100(5):496-501.
66. Laguna F. Treatment of leishmaniasis in HIV-positive patients. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97 Suppl 1:135-42.
67. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Bmj* 2003;326(7385):377-82.
68. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86(5):505-7.
69. Medrano FJ, Jimenez-Mejias E, Calderon E, Regordan C, Leal M. An easy and quick method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals. *Aids* 1993;7(10):1399.
70. Martinez P, de la Vega E, Laguna F, Soriano V, Puente S, Moreno V, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals using peripheral blood smears. *Aids* 1993;7(2):227-30.
71. Lopez-Velez R, Laguna F, Alvar J, Perez-Molina JA, Molina R, Martinez P, et al. Parasitic culture of buffy coat for diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1995;33(4):937-9.
72. Burns JM, Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific

antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(2):775-9.

73. Gallardo JA, Pineda JA, Macias J, Torronteras R, Lissen E. Specificity of a commercial indirect immunofluorescence technique in the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV-1. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90(4):383.

74. Berhe N, Hailu A, Wolday D, Negesse Y, Cenini P, Frommel D. Ethiopian visceral leishmaniasis patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89(2):205-7.

75. Montalban C, Calleja JL, Erice A, Laguna F, Clotet B, Podzamczar D, et al. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the Study of Leishmaniasis in AIDS. *J Infect* 1990;21(3):261-70.

76. da Matta VL, Hoshino-Shimizu S, Dietze R, Corbett CE. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. *J Clin Lab Anal* 2000;14(1):5-12.

77. Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63(3-4):153-7.

78. Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BM, Das ML, et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health* 2003;8(3):277-85.

79. Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70(1):72-7.

80. Hailu A, Berhe N. The performance of direct agglutination tests (DAT) in the diagnosis of visceral leishmaniasis among Ethiopian patients with HIV co-infection. *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96(1):25-30.

81. Santos-Gomes G, Gomes-Pereira S, Campino L, Araujo MD, Abranches P. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-Leishmania sp.-coinfecting patients. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):175-8.

82. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant Leishmania P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(4):387-91.

83. Goto H, Posada-Vergara M, Celeste B, Costa C, Souza R, Lindoso J. HIV-Leishmania infection in Brazil: Serological tests for diagnosis of leishmaniasis. In: *Third World Congress on Leishmaniasis*; 2005; Palermo, Italia; 2005. p. 145.

84. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998;351(9102):563-5.

85. Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68(3):321-4.
86. Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health* 2001;6(2):108-13.
87. Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J, Davidson R. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. *Trop Med Int Health* 2003;8(2):164-7.
88. Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67(4):344-8.
89. Jelinek T, Eichenlaub S, Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(9):669-70.
90. Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A, Arias J. Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 2001;8(4):355-7.
91. Sundar S, Pai K, Sahu M, Kumar V, Murray HW. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96(1):19-23.
92. Islam MZ, Itoh M, Shamsuzzaman SM, Mirza R, Matin F, Ahmed I, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay using urine samples. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(4):789-94.
93. Islam MZ, Itoh M, Mirza R, Ahmed I, Ekram AR, Sarder AH, et al. Direct agglutination test with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70(1):78-82.
94. Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2001;78(1):11-6.
95. El-Safi SH, Abdel-Haleem A, Hammad A, El-Basha I, Omer A, Kareem HG, et al. Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan. *East Mediterr Health J* 2003;9(4):844-55.
96. Sundar S. Indian kala-azar--better tools needed for diagnosis and treatment. *J Postgrad Med* 2003;49(1):29-30.
97. Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996;173(3):758-61.

98. Gari-Toussaint M, Lelievre A, Marty P, Le Fichoux Y. Contribution of serological tests to the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88(3):301-2.
99. Disch J, Maciel FC, de Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97(4):391-5.
100. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis* 2004;4(6):337-48.
101. Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 2001;39(1):357-61.
102. Pal S, Aggarwal G, Haldar A, Majumdar A, Majumdar HK, Duttagupta S. Diagnosis of symptomatic kala-azar by polymerase chain reaction using patient's blood. *Med Sci Monit* 2004;10(1):MT1-5.
103. Cruz I, Canavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96 Suppl 1:S185-9.
104. De Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh Karki BM, Decuypere S, et al. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005;99(1):25-31.
105. Rolao N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 2004;90(5):1150-4.
106. Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2004;92(3):279-83.
107. Martin-Sanchez J, Pineda JA, Andreu-Lopez M, Delgado J, Macias J, De La Rosa R, et al. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96(7):669-77.
108. Laguna F, Lopez-Velez R, Pulido F, Salas A, Torre-Cisneros J, Torres E, et al. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. Spanish HIV-*Leishmania* Study Group. *Aids* 1999;13(9):1063-9.
109. Ho M, Leeuwenburg J, Mbugua G, Wamachi A, Voller A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32(5):943-6.
110. OMS. Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, 2004. Geneva: OMS TDR; 2004.

111. Marlet MV, Wuillaume F, Jacquet D, Quispe KW, Dujardin JC, Boelaert M. A neglected disease of humans: a new focus of visceral leishmaniasis in Bakool, Somalia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97(6):667-71.
112. Murray HW. Kala-azar as an AIDS-related opportunistic infection. *AIDS Patient Care STDS* 1999;13(8):459-65.
113. Holanda T, Facó M, Silva-Filho J, Leal V, Castro A, Silva F, et al. HIV/AIDS and visceral leishmaniasis (VL) co-infection in a highly endemic area for VL in Brazil. In: *Third World Congress on Leishmaniasis; 2005; Palermo, Italia; 2005*. p. 153.
114. Romero-Saavedra J. Causas de internação e óbito em portadores de HIV-Aids no Hospital Universitário de Brasília, antes e após a implantação da terapia antiretroviral altamente ativa. Brasília: Universidade de Brasília; 2004.
115. Kuckelhaus C. Estudo das neuropatias periféricas em pacientes com HIV/Aids acompanhados no Hospital Universitário de Brasília. Brasília: Universidade de Brasília; 2005.
116. Brasil. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. Brasília; 2005. Report No.: Ano II - nº 1.
117. Moral L, Rubio EM, Moya M. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96(2):129-32.
118. Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88(4):386-8.
119. Nascimento Mdo D, Souza EC, da Silva LM, Leal Pda C, Cantanhede Kde L, Bezerra GF, et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e a intradermoreação de Montenegro em a'rea endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica* 2005;21(6):1801-7.
120. Caldas AJ, Silva DR, Pereira CC, Nunes PM, Silva BP, Silva AA, et al. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis-MA, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34(5):445-51.
121. Sampaio RN, de Paula CD. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32(5):523-8.
122. Nascimento MDSB, Souza EC, da Silva LM, Leal Pda C, Cantanhede Kde L, Bezerra GF, et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e a intradermoreação de Montenegro em a'rea endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica* 2005;21(6):1801-7.
123. Orsini M. Estudo da casuística da Co-infecção *Leishmania/HIV* no Brasil e avaliação da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes atendidos em centros de referência para HIV/AIDS de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.

124. Genaro O, da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, et al. Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990;23(2):121.
125. Gállego M, Martín-Sánchez J, García-García J, Camacho A, Alcover M, Morillas-Marquez F, 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; Palermo, Italia; 2005. p. 141.
126. Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG, et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(5):717-20.
127. Singh S, Kumari V, Singh N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(3):568-72.
128. Deniau M, Canavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97 Suppl 1:115-33.
129. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 1985;135(6):4144-8.
130. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 1994;56(4):315-25.
131. Brito ME, Mendonca MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FG. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95(2):203-6.
132. Monroy-Ostria A, Sosa-Cabrera T, Rivas-Sanchez B, Ruiz-Tuyu R, Mendoza-Gonzalez AR, Favila-Castillo L. Seroepidemiological studies of cutaneous leishmaniasis in the Campeche state of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92(1):21-6.
133. Mosleh IM, Saliba EK, al-Khateeb MS, Bisharat Z, Oumeish OY, Bitar W. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Trop* 1995;59(2):163-72.
134. Costa JM, Durand R, Deniau M, Rivollet D, Izri M, Houin R, et al. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1831-3.
135. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):236-40.
136. Bourgeois N, Lachaud L, Rouanet I, Boulle N, Bastien P. Long-term follow-up of *Leishmania*/HIV infected patients using PCR detection of blood-circulating parasites. In: Third World Congress on Leishmaniasis; 2005; Palermo; 2005. p. 118.

137. Vergel C, Walker J, Saravia NG. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72(4):423-9.
138. Viana LG. Avaliação de métodos sorológicos na abordagem diagnóstica da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Belo Horizonte, MG: Fundação Oswaldo Cruz; 2005.
139. Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87(1):94-6.
140. Jose FF, da Silva IM, Araujo MI, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34(6):537-42.
141. Da-Cruz A, Rodrigues A, Mattos M, Oliveira-Neto M, Sabbaga-Amato V, Posada-Vergara M, et al. Immunopathological alterations in HIV-*Leishmaniasis* co-infection: T-cell activation as prognosis marker of disease progression. In: *Third World Congress on Leishmaniasis*; 2005; Palermo; 2005. p. 131.

**Anexo 1 – Termo de aprovação do
Comitê de Ética em Pesquisa
envolvendo seres humanos da
Faculdade de Medicina da
Universidade de Brasília**

Processo n.º
 Fls. n.º:
 Rubrica



Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina
 Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM/UnB
 Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-900 – Brasília, DF
 Telefone: (61) 307-2520

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: CEP-FM 050/2004

Título: “Avaliação da co-infecção por leishmania em portadores de HIV/AIDS no Hospital Universitário de Brasília. Estudo transversal com ênfase na leishmaniose visceral”

Pesquisador responsável: Gustavo Adolfo Sierra Romero

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, projeto de pesquisa, bibliografia pertinente, termo de consentimento.

Data de entrada: 16/06/2004

Proposição do(a) Relator(a):

- (x) **Aprovação**
 () Aprovação com pendências
 () Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 06/10/2004

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 06/10/2004

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS n.º 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em sua **Reunião 09/2004**, realizada em 06/10/2004, decidiu **APROVAR**, de acordo com o parecer do(a) Relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observação:

- 1 - Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves.
- 2 - O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília-DF, 07 de outubro de 2004.

Dr.ª Elaine Maria de Oliveira Alves
 Coordenadora do CEP-FM/UnB

Anexo 2 – Ficha de coleta de dados.

FICHA DE COLETA DE DADOS

Ficha N° <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Data de coleta de dados : ___/___/___	
Dados pessoais	
Paciente: _____	
Registro: _____	
Idade _____ anos	
Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/>	
Estado civil: _____	
Ocupação: _____	
Grau de Instrução completa: _____	
Local de nascimento: _____	UF: _____
Data de nascimento: ___/___/___	
Residência atual: _____	UF: _____
Tempo de residência: _____ anos	
Antecedentes.	
Residências passadas e tempo (descrever o município)	
Município	Anos
Conhece ao vetor da Leishmaniose? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
Convívio com cães doentes Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Quando _____	
Familiares com Leishmaniose visceral Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
Vizinhos com Leishmaniose visceral Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Quando _____	

Antecedentes patológicos

Comorbidades não infecciosas: _____

Doenças infecciosas:

- Doença de Chagas

- Toxoplasmose

- Tuberculose

- Hanseníase

- Malária

- Leishmaniose tegumentar

- Outras: _____

Data diagnóstico HIV: ____/____/____

Fatores de risco para adquirir HIV

- Parceiro de soropositivo para HIV

- Usuário de drogas EV

- Transfusão

- Sexo desprotegido

- Não identificado

- Outros: _____

Comportamento sexual

- Heterossexual

- Bissexual

- HSH

CD4: _____ Data: _____ Carga viral: _____ Data: _____

Uso de Antiretrovirais: Sim Não

Esquema	Tempo	Adesão

Uso de quimioprofilaxia(s)				
Droga		Tempo	Motivo	
Doenças oportunistas				
Doença		Data	Observações	
Uso de outros medicamentos				
Medicamento		Data	Observações	
Dados clínicos				
Sinais, sintomas e achados laboratoriais				
	Sim	Não	Data de início	Observações
Febre > 2 sem				
Hepatomegalia				Medida em cm:
Esplenomegalia				Medida em cm:
Tosse				
Diarréia				
Emagrecimento				
Icterícia				
Edema				
Palidez				
Outros				
Anemia				Valor:
Leucopenia				Valor:
Plaquetopenia				Valor:
Lesão de pele				Local: Número:

Resultado do Teste padrão-ouro

Data de coleta:	Resultado		Observações
Medula óssea: Baço: Outro: _____	Positivo	Negativo	
Exame direto			Semiquantitativo:
Cultura			Espécie isolada: -----

Resultado dos testes aplicados

	Imunofluorescência	ELISA	Teste rápido	PCR
Data				
Título				
Interpretação				
Conclusão diagnóstica				

Sorologia para Hepatite C

Positiva Negativa

Sorologia para Hepatite B

HBsAg Positivo Negativo

	CD4		Carga viral	
Primeiro		Data:		Data:
Ao começar ARV		Data:		Data:

**Anexo 3 – Características
individuais dos pacientes com a
síndrome suspeita de leishmaniose
visceral**

Tabela 23 - Características dos pacientes com a síndrome suspeita de leishmaniose visceral avaliados entre 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Paciente	Sexo	Idade	Comportamento sexual	Exposição área endêmica	UDI ⁰	Transfusão hemo-derivados	Reatividade cruzada ¹	CD4 ²	Aids	Sintomas de LV ³	TARV	Testes positivos	Intercorrência infecciosa
3	M	43	Heterossexual	Sim	Não	Sim	-	153	Sim	F,H,E,A,P	3TC+TFV+ LPV/r	-	Citomegalovirose disseminada
4	M	43	Heterossexual	Sim	Não	Não	-	56	Sim	H,A,L	D4T+3TC+ ATV	-	Diarréia crônica ⁴
11	M	51	Bissexual	Sim	Não	Não	TB	13	Sim	H,E,A,L	-	-	Tuberculose
133	M	33	Heterossexual	Sim	Sim	Não	-	118	Sim	F,H,E,L,P	3TC+D4T+ EFZ	ELISA, rK39	Pneumonia bacteriana ⁵
144	M	37	Bissexual	Sim	Não	Não	-	339	Não	F,A,L,P	-	-	Diarréia crônica
145	M	42	Heterossexual	Sim	Não	Não	-	40	Não	F,A,L	-	ELISA	Tuberculose disseminada ⁶
163	M	36	Heterossexual	Sim	Não	Não	TB	12	Sim	F,H,E,A,L	-	ELISA	Micobacteriose atípica

0 - UDI: Uso de drogas injetáveis atual ou pregressa

1 - Doenças associadas à reatividade cruzada aos testes sorológicos para *Leishmania spp.*

2 - Contagem de células T CD4+ atual

3 - F:Febre/ H:Hepatomegalia/ E:Esplenomegalia/ A:Anemia/ P:Plaquetopenia/ L:Leucopenia/

4 - No transcurso da doença, paciente desenvolveu encefalite herpética e foi a óbito por síndrome de sepse.

5 - Paciente com antecedente de LV; no momento da avaliação encontrava-se no último mês de tratamento por tuberculose pulmonar.

6 - Paciente foi a óbito com este diagnóstico.

Anexo 4 – Características individuais dos pacientes com testes positivos para a infecção por *Leishmania* spp.

Tabela 24 - Características dos pacientes com testes positivos para *Leishmania* spp entre 163 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, 2005.

Paciente	Sexo	Idade	Comportamento sexual	Exposição área endêmica	UDI ⁰	Transfusão hemo-derivados	Reatividade cruzada ¹	CD4 ²	Aids	Sintomas de LV ³	TARV	Testes positivos	Intercorrência infecciosa
5	F	30	Heterossexual	Sim	Não	Não	-	512	Não	-	-	ELISA, rK39 e PCR	Sinusite aguda
7	M	30	Bissexual	Não	Não	Não	-	10	Sim	-	3TC+D4T+EFZ	ELISA	-
29	M	35	Heterossexual	Sim	Não	Não	DC	455	Não	-	-	ELISA	-
37	F	37	Heterossexual	Não	Não	Não	-	479	Não	A	-	ELISA	-
48	F	25	Heterossexual	Não	Não	Não	-	482	Não	-	-	ELISA, rK39	-
49	M	41	Bissexual	Sim	Não	Não	TB	270	Sim	-	AZT+3TC+NFV	ELISA, rK39	Hepatite C
66	F	36	Heterossexual	Sim	Não	Não	DC	531	Sim	-	AZT+3TC+NFV	RIFI	-
67	M	35	Heterossexual	Sim	Não	Não	DC,TB	412	Sim	-	AZT+3TC+NFV	RIFI	-
71	M	44	Heterossexual	Não	Não	Sim	Mal	871	Sim	-	-	ELISA	-
78	M	58	Heterossexual	Sim	Não	Não	TB	334	Sim	A	-	ELISA, rK39	Tuberculose pulmonar

Continua tabela 24....

Paciente	Sexo	Idade	Comportamento sexual	Exposição área endêmica	UDI ⁰	Transfusão hemo-derivados	Reatividade cruzada ¹	CD4 ²	Aids	Sintomas de LV ³	TARV	Testes positivos	Intercorrência infecciosa
80	M	31	HSH	Sim	Não	Não	-	540	Não	-	AZT+3TC+EFZ	RIFI	Pneumonia bacteriana
86	M	27	Heterossexual	Sim	Não	Sim	-	316	Não	-	3TC+D4T+NVP	ELISA	-
92	M	50	Heterossexual	Não	Não	Não	-	574	Sim	-	3TC+ddI+IDV	RIFI	-
97	M	36	Heterossexual	Não	Não	Não	-	540	Não	-	-	rK39	-
103	F	27	Heterossexual	Não	Não	Não	TB	30	Sim	L	3TC+D4T+EFZ	ELISA	Tuberculose pulmonar
107	F	50	Heterossexual	Não	Não	Não	-	277	Não	F,H,E,T,L, P	-	rK39	-
133*	M	32	Heterossexual	Sim	Sim	Não	-	118	Sim	-	3TC+D4T+EFZ	rK39	Pneumonia bacteriana
140	M	25	Bissexual	Sim	Não	Não	-	433	Não	-	-	ELISA	-
141	F	33	Heterossexual	Sim	Não	Não	-	278	Não	-	-	ELISA	-
145	M	42	Heterossexual	Sim	Não	Não	Tb	40	Não	F,A,L	-	ELISA	Tuberculose disseminada ⁴
148	F	29	Heterossexual	Sim	Não	Não	-	350	Sim	-	AZT+3TC+EFZ	ELISA, PCR	Doença pélvica inflamatória

Continúa de tabela 24....

Paciente	Sexo	Idade	Comportamento sexual	Exposição área endêmica	UDI ⁰	Transfusão hemo-derivados	Reatividade cruzada ¹	CD4 ²	Aids	Sintomas de LV ³	TARV	Testes positivos	Intercorrência infecciosa
153	M	37	Heterossexual	Não	Não	Não	-	85	Sim	-	3TC+D4T+NVP	ELISA, rK39	-
155	M	33	HSH	Sim	Não	Não	-	-	Não	-	-	ELISA	-
157	M	22	HSH	Sim	Não	Não	-	-	Não	-	-	ELISA	-
160	M	33	Heterossexual	Sim	Não	Não	-	-	Não	-	-	ELISA, PCR	-
163	M	36	Heterossexual	Sim	Não	Não	-	-	Sim	F,H,E,A,L, P	-	ELISA	Micobacteriose atípica

0 - UDI: Uso de drogas injetáveis atual ou pregressa

1 - Doenças associadas à reatividade cruzada aos testes sorológicos para *Leishmania spp.* DC:Doença de Chagas/ TB: Tuberculose/ Mal:antecedente de malária

2 - Contagem de células T CD4+ atual

3 - F:Febre/ H:Hepatomegalia/ E:Esplenomegalia/ T:Tosse/ A:Anemia/ L:Leucopenia/ P:Plaquetopenia

4 - Paciente foi a óbito com este diagnóstico.

* - Paciente com antecedente de LV, em 1993 e 1994 (recaída).