



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**

GABRIEL REIS FERREIRA

Competência de seres humanos para transmitir *Leishmania infantum* para
Lutzomyia longipalpis e influência da infecção pelo HIV

TERESINA

2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**

Competência de seres humanos para transmitir *Leishmania infantum* para
Lutzomyia longipalpis e influência da infecção pelo HIV

Gabriel Reis Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa da Pós-graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências e Saúde. **Área de concentração:** Métodos de Diagnóstico e Análise das Condições de Saúde. **Linha de pesquisa:** Investigação para o Diagnóstico em Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Dorcas Lamounier Costa.

TERESINA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico

F383c Ferreira, Gabriel Reis.
Competência de seres humanos para transmitir *Leishmania infantum* para *Lutzomyia longipalpis* influência da infecção pelo HIV/ Gabriel Reis Ferreira. — 2016.
49 f.: il. col.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí.
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2016.

Orientadora: Prof.^a Dra. Dorcas Lamounier Costa.

1. Controle da leishmaniose.2. Leishmaniose visceral.3. Doenças infecciosas. 4. Xenodiagnóstico. I. Título.

CDD: 614.534

GABRIEL REIS FERREIRA

Competência de seres humanos para transmitir *Leishmania infantum* para
Lutzomyia longipalpis e influência da infecção pelo HIV

Dissertação apresentada ao Programa da Pós-graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências e Saúde. **Área de concentração:** Métodos de Diagnóstico e Análise das Condições de Saúde. **Linha de pesquisa:** Investigação para o Diagnóstico em Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.^a Dorcas Lamounier Costa

Orientadora – Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr.^a Maria Regiane Araújo Soares

1º Examinador - Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Regis Gomes

2º Examinador – Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-PI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS E SAÚDE

Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

Prof. Dr. Benedito Borges da Silva (coordenador)

Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

Prof. Dra. Nadir do Nascimento

Prof. Dr. Ayrton Conde Junior

Prof. Dra. Dorcas Lamounier Costa

Gabriel Reis Ferreira (representante discente)

AGRADECIMENTOS

Cada um vale aquilo que valoriza, esse trabalho e um pedaço da minha vida, devo aos que aqui agradeço,

À educadora, que brigou e bradou com muito entusiasmo, **Rubenita Ferreira**. Ao meu primeiro mestre e mais profundo poço de conhecimento que conheci, Frei **Antônio Curcio**. A todos os funcionários e amigos do Colégio Industrial São Francisco de Assis, onde tudo começou. Aos professores e amigos da graduação, pela amabilidade e deferência nos anos compartilhados. À Universidade Federal do Piauí, pelo ambiente e oportunidade. Ao Mestrado em Ciência e Saúde. Às amigas da coordenação **Edilene** e **Nathália**, ao Prof. **Benedito**, ao Prof. **Viriato**, demais bolsistas e membros do colegiado, com quem convivi nos anos de representante discente. Ao Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella e todos os funcionários, pela recepção e conhecimento compartilhado. Aos pacientes pela confiança e esperança.

Aos amigos de sala, especialmente a **Jose Carlos** (*in memoriam*), pelas caronas, pelas conversas, pelo trabalho, pelos conselhos, por além da amizade, obrigado meu amigo Zé.

Aos amigos e colegas do LabLeish, ao **Vladimir, Marcelo, Léo** e **Adeno**. Às meninas **Kátia, Débora, Rebeca**. Aos colegas de orientação **Sheila** e **Alberto**. Ao **Alexandre, Jaihlton, Dani**. As amigas **Ingrid Sene, Simone** e **Adriana**, pelo desvelo. Ao **Mauro, Mariana, Humberto** e **Antônio** no resgate dos dados. À **Teresinha**, que está sempre presente.

A **Lúcio** e **Kaka**, em nome de quem agradeço os amigos que me ajudaram em Teresina.

Aos velhos amigos/irmãos da esquina Emidio Gabriel, em Floriano.

Aos professores **Regis Gomes** e **Maria Regiane**, pela celeridade ao convite.

À minha orientadora, Profa. **Dorcas Lamounier**, pela delicadeza, inteligência e por me receber em todos os momentos com educação e afeto. Ao Prof. **Carlos Henrique**, pela ciência e paciência. Aos dois, que me empurraram com a atração gravitacional de suas ideias, dedico toda a ciência que aprendi nesse caminho.

Ao meu pai, **Emidio**, por deixar eu ser o que quiser. À minha mãe, **Lize**, por ser minha segurança na vida. Aos meus irmãos **Teté, Toim**, e **Emidim**, por me protegerem e estarem ao meu lado. Ao meu sobrinho, **Victor**, pela vitalidade.

À minha namorada, amiga, meu amor, **Hermana**, por cuidar muito de mim.

Quem tem vocês, não precisa de sorte.

*Ao meus pais,
meus irmãos,
meu sobrinho,
e Hermana, é claro!*

Não se faz ciência sem registrar o que se aprende.

Dante Alighieri

APRESENTAÇÃO

A pesquisa incluída nessa dissertação avalia a ocorrência de transmissão de *Leishmania infantum* de seres humanos para *Lutzomyia longipalpis* através do xenodiagnóstico. A transmissão foi analisada por microscopia direta, e reação de cadeia em polimerase convencional para *Leishmania*. Foi medida a carga parasitária dos participantes pela Reação de Cadeia em Polimerase em Tempo Real, e analisado a relação entre a infectividade e a carga parasitária.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose visceral (LV) se apresenta quase sempre com febre e hepatoesplenomegalia. Quando causada por *Leishmania infantum*, é uma zoonose transmitida por flebotomíneos. Embora os cães sejam considerados os principais reservatórios, os humanos são também fontes de infecção. As pessoas com LV com co-infecção pelo HIV são muito infecciosas e por isto conjecturou-se se estes indivíduos podem contribuir de forma mais significativa para a transmissão da doença. **Material e Métodos:** A transmissão foi medida através de xenodiagnóstico com o vetor *Lutzomyia longipalpis*. Os parasitos foram identificados nos insetos através de microscopia óptica e da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. A quantidade de *L. infantum* no sangue foi medida através da PCR quantitativa (qPCR). **Resultados:** Dos 61 participantes, 27 (44%) tiveram xenodiagnóstico positivo no exame microscópico ou na PCR. Entre os pacientes com LV e sem HIV, o exame foi positivo em 7 (35%). Entre os pacientes com LV e com HIV, 15 (75%) foram positivos. Entre os 19 indivíduos assintomáticos, o exame foi positivo em 4 (21%). Em 1 pessoa (4,3%) assintomática com HIV, o xenodiagnóstico foi positivo através da microscopia. **Conclusões:** O estudo demonstrou que indivíduos assintomáticos são capazes de transmitir o protozoário, que a infecção pelo HIV e a presença de sintomas de LV aumentam a competência do homem como reservatório para *L. infantum*, o que indica que estes indivíduos têm papel mais importante na transmissão da LV em áreas endêmicas. O xenodiagnóstico foi mais confiável que qPCR para medir a infectividade.

PALAVRAS CHAVE: Reservatório. Competência. Xenodiagnóstico. Leishmaniose visceral. *Leishmania infantum*. *Lutzomyia longipalpis*. HIV. AIDS.

ABSTRACT

Introduction: Visceral leishmaniasis (VL) is usually followed by fever and hepatosplenomegaly. The disease is transmitted by sand flies, and when caused by *Leishmania infantum*, it is a zoonosis. Although dogs are held as the main reservoirs in cities, humans are also sources of infection. People with VL/HIV co-infection are very infectious and for this reason, they could contribute more significantly to the transmission of the disease.

Material and methods: Transmission was assessed by xenodiagnosis with the vector *Lutzomyia longipalpis*. Parasites were identified in the insects by optic microscopy and conventional polymerase chain reaction (PCR). The amount of *L. infantum* in the blood was obtained by quantitative PCR (qPCR).

Results: Among the 61 participants, 27 (44%) infected sand flies as seen by microscopy or PCR. Among the VL patients not infected by the HIV, xenodiagnosis was positive in 7 (35%). Between the patients co-infected by VL/HIV, 15 (75%) were positive. Among the 19 asymptomatic patients, four (21%) infected sand flies. One (50%) asymptomatic patient with HIV had a positive xenodiagnosis.

Conclusions: The study demonstrated that asymptomatic patients are capable of transmitting the protozoa, and that HIV infection and presence of VL symptoms increase human competence as *L. infantum* reservoirs, showing that these individuals play an important role in the VL transmission in endemic areas. Xenodiagnosis was more reliable than qPCR to measure infectiousness.

KEY WORDS: reservoir competence, xenodiagnosis, visceral leishmaniasis, kala-azar, *Leishmania infantum*, *Lutzomyia longipalpis*, HIV, AIDS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
FIGURA 01	Criança com diagnóstico de LV apresentando esplenomegalia e emagrecimento..... 17
FIGURA 02	Adulto com diagnóstico de LV e infecção pelo HIV com grande esplenomegalia..... 17
FIGURA 03	Aplicação do xenodiagnóstico no antebraço de um indivíduo..... 20
FIGURA 04	Fluxograma representativo da formação dos grupos de participantes no estudo..... 24
FIGURA 05	Local da pesquisa: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella..... 26
FIGURA 06	Carga parasitária por grupos de estudo..... 36
FIGURA 07	Associação da infectividade em relação ao log da carga parasitária medido no sangue periférico dos participantes do estudo. A) por microscopia ótica. B) por PCR. C) por microscopia ótica ou PCR..... 37

LISTA DE TABELAS

		Pág.
TABELA 01	Distribuição dos participantes por gênero e idade nos grupos de estudo.....	31
TABELA 02	Resultado do xenodiagnóstico de acordo com sintomatologia para LV e de infecção pelo HIV.....	34
TABELA 03	Concordância dos resultados do xenodiagnóstico medidos por microscopia óptica e PCR.....	35
TABELA 04	Carga parasitária medida qPCR no sangue periférico nos indivíduos dos quatro grupos de estudo.....	36
TABELA 05	Carga parasitária esperada e percentual de insetos infectados estimados pela distribuição de Poisson de acordo com a presença de sintomatologia para LV e de infecção pelo HIV.....	38

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>).
	Demanda bioquímica de Oxigênio (<i>Biochemical Oxygen Demand</i>)
BOD	Grupamento de diferenciação 4 (<i>Cluster of differentiation</i>).
CD4 ⁺	Teste de Aglutinação Direta
DAT	Ácido desoxirribonucleico.
DNA	Equivalente amastigota por mL.
EA/mL	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>).
ELISA	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>).
HIV	Intervalo de confiança com 95% de probabilidade.
IC 95% Valor	Probabilidade de significância.
de <i>p</i> KAPPA	Coefficiente de concordância.
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública.
LASAN	Laboratório de Sanidade Animal.
IDTNP	Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella.
LV	Leishmaniose visceral.
NNNLabLeish	Novy-MacNeal-Nicole.
PCR	Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses.
qPCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
RIFI	Reação em cadeia da polimerase quantitativo (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
	Reação de imunofluorescência indireta.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Epidemiologia e Transmissão	16
2.2 Apresentação clínica	17
2.3 Diagnostico	18
2.4 Infectividade	188
2.5 Leishmaniose visceral e HIV	20
3. ORGANIZAÇÃO DA PESQUISA	22
3.1 Objetivo.....	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	233
4.1 Desenho do estudo.....	233
4.2 População alvo.....	233
4.3 População fonte	233
4.4 População do estudo	233
4.5 Critérios de inclusão	244
4.6 Critérios de exclusão.....	Erro! Indicador não definido.
4.7 Critérios clínico laboratoriais	2525
4.8 Caracterização dos indivíduos e definições	255
4.9 Exame direto para Leishmania	255
4.10 Cultura para Leishmania	25
4.11 Sorologia para Leishmania	266
4.12 Sorologia para HIV.....	266
4.13 Local da pesquisa.....	266

4.14 Trabalho de laboratório.....	277
4.14.1 Flebotomíneos.....	277
4.14.2 Xenodiagnóstico	277
4.14.3 Análise por microscopia	2828
4.14.4 Análise por PCR.....	2828
<i>4.14.4.1 Extração do DNA</i>	<i>2828</i>
<i>4.14.4.2. Primers.....</i>	<i>2828</i>
<i>4.14.4.3. PCR convencional.....</i>	<i>299</i>
4.15 Estimativa da carga parasitária no sangue periférico (kDNAemia)	299
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	3030
6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	3030
7. RESULTADOS.....	3030
7.1 Participantes:	3030
7.2 Xenodiagnóstico	31
7.2.1 Resultados por pessoas.....	322
7.2.2 Resultados por insetos.....	322
7.3 Carga parasitária	366
8. DISCUSSÃO:.....	4040
9. CONCLUSÕES.....	4343

Referências Bibliográficas

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar (kala-azar = febre negra) é uma doença infecciosa parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania sp.* Essa patologia tem ampla distribuição pelo mundo, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas, com incidência anual estimada em 500.000 casos e 50.000 mortes (SANGENIS et al., 2014). Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste, representando um importante problema de saúde pública com uma média de 3156 novos casos no por ano (BRASIL, 2006).

No Novo Mundo, no Mediterrâneo e em partes da Ásia e da África Ocidental, a LV é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, e por *Leishmania donovani* no Subcontinente Indiano e no Leste da África (ALVAR et al., 2012). A LV causada por *L. infantum* é uma zoonose e tem como principais reservatórios os canídeos domésticos e selvagens. Já a *L. donovani* é transmitida apenas entre pessoas, ou seja, uma antroponose. No Brasil, o principal vetor do calazar é o *Lutzomyia longipalpis*, que é um alimentador versátil e os humanos uma importante fonte de sangue para esta espécie de flebotomíneo em áreas periurbanas (MACEDO-SILVA et al., 2014). No ambiente silvestre, os reservatórios de *Leishmania* são principalmente as raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsupialis*). O cão (*Canis familiaris*) é aceito como o principal reservatório doméstico da infecção, mas o verdadeiro papel do homem na transmissão da doença ainda não está totalmente definido (COSTA et al., 2000) (COSTA et al., 2002) (COSTA et al., 2005). Pessoas com LV ativa são capazes de infectar *Lutzomyia longipalpis* (COSTA et al., 2000) e indivíduos co-infectados pelo HIV e *L. infantum* já infectaram *Phlebotomus perniciosus* (MOLINA et al., 1999). Logo, os seres humanos participam de uma parcela do ciclo de transmissão da LV.

A LV, antes limitada a áreas rurais e pequenas localidades urbanas (DEANE e DEANE, 1962), tem se expandido para cidades de médio e grande porte nas últimas décadas (COSTA, 2008), e tem se apresentado como importante problema de saúde pública, agravado pela sobreposição geográfica com a pandemia de AIDS. Desde o início da epidemia global de infecção pelo HIV um número crescente de casos de LV tem sido notificado. A co-infecção HIV-Leishmania aumenta o risco de progressão de infecção assintomática para a

doença (LV) e, inversamente, a LV acelera a progressão da imunodeficiência causada pelo HIV (ALVAR et al., 2008). No Brasil a proporção de indivíduos com LV coinfectados pelo HIV pode variar de 7,6% (COURA-VITAL et al., 2014) a até a 36% (DRUZIAN et al., 2015), o que aumenta a possibilidade de complicações e diminui a taxa de sobrevivência (BELO et al., 2014). Pacientes co-infectados pelo HIV e *Leishmania*, apesar do tratamento, podem desenvolver infecção crônica com contínua multiplicação e circulação de parasitos por vários anos (BOURGEOIS et al., 2010), sendo por isto bons reservatórios com potencial importância no ciclo de infectividade da LV.

A identificação dos indivíduos que são fontes potenciais de infecção é de grande importância para as medidas de controle epidemiológico, e pode sugerir abordagens na intervenção da cadeia de transmissão do calazar. Embora tenha sido mostrado que inibidores de protease utilizados no tratamento da infecção pelo HIV diminuem *in vitro* o crescimento de *Leishmania sp.* (VAN GRIENSVEN et al., 2013), é possível que os indivíduos infectados com o HIV se configurem em duradouras e importantes fontes de infecção por *L. infantum* mesmo enquanto estiverem em tratamento antirretroviral. Assim, este estudo foi desenvolvido para avaliar a competência de pessoas infectadas com *L. infantum* para transmitirem o protozoário para os vetores, e discutir seu impacto na transmissão do protozoário em áreas endêmicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia e Transmissão

A LV é mais prevalente em crianças, e gera maior taxa de mortalidade nos primeiros anos de vida. No entanto, em adultos a taxa de letalidade aumenta proporcionalmente a idade, principalmente após os 60 anos (ARAÚJO et al., 2016)(BELO et al., 2014). A doença se distribui de maneira semelhante entre os sexos durante a infância, mas tem maior prevalência em homens a partir da adolescência (DEANE; DEANE, 1962)(OLIVEIRA et al., 2006). Provavelmente, os hábitos de vida relacionados à maior permanência dos homens fora do domicílio, com maior superfície corporal exposta aumentam a vulnerabilidade à infecção (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990).

A transmissão natural da LV ocorre no momento do repasto sanguíneo das fêmeas infectadas com o parasito, as formas promastigotas infectam as células do sistema retículo endotelial, o que pode desencadear as formas clínicas da doença. A transmissão no novo mundo ocorre principalmente através de um ciclo zoonótico, com participação de um reservatório animal, entretanto, a importância da transmissão antroponótica é fato inegável (COSTA et al., 2000). Existe evidências de outras vias de transmissão, na Europa, CRUZ et al., (2002) encontrou em 52% das seringas descartadas por usuários de drogas, PCR positivo para *Leishmania*. Ainda, transmissão transfusional, principalmente por doadores de áreas endêmicas, tem sido reportado como um fator preocupante, especialmente em recém-nascidos e crianças (MANUSQUETO et al., 2014).

A expansão da LV urbana começou no início década de 80 no Brasil, com as primeiras epidemias nas cidades de Teresina, Natal e São Luís, todos localizados no Nordeste do país, e mais tarde se propagou para outros centros urbanos (WERNECK, 2010). Em Teresina, capital do estado do Piauí, o pico da primeira epidemia aconteceu em 1984, com 1.509 casos (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990). A incidência caiu após 1985, entretanto, ocorreu uma nova epidemia entre 1993 e 1995, somando mais de 1.200 casos. No mesmo período desse ano, houve mais casos de infecção em cães do que em seres humanos, no entanto, não há ligações entre a prevalência de casos caninos e a incidência de LV em humanos. Entre 1996 e 1998, a doença permaneceu endêmica no Município, com cerca de 20-40 casos anuais (HENRIQUE; COSTA; TAPETY, 2007)(WERNECK et al., 2007).

2.2 Apresentação clínica

A LV pode apresentar-se clinicamente desde infecções assintomáticas ou subclínicas até formas graves e letais. Na LV clássica a presença de febre é marcante, acompanhada de falta de apetite, perda ponderal, palidez cutânea e mucosa e aumento do volume abdominal decorrente da hepatomegalia e esplenomegalia (FIGURA 1). A desnutrição já foi descrita como fator agravante para a aquisição da LV (DYE; WILLIAMS, 1993), e crianças com baixo peso tem maior risco de letalidade e maior chance de adquirir complicações. Nos adultos, a desnutrição é mais prevalente naqueles co-infectados pelo HIV, provavelmente associado com infecções parasitárias intestinais (MENGESHA et al., 2014) (FIGURA 2). Nos idosos, as manifestações clínicas tem um espectro maior de variações, maior taxa de recidivas. O maior tempo de diagnóstico a partir do início dos sintomas estão associados com morte (DRIEMEIER et al., 2015). Entre os fatores associados com a morte as infecções bacterianas e distúrbios da coagulação são as mais citadas, mais recentemente a presença de infecção pelo HIV. Outras manifestações da LV que são menos frequentes incluem tosse, vômitos, cefaleia, diarreia. Os achados laboratoriais inespecíficos mais encontrados são anemia, leucopenia, plaquetopenia, hipergamaglobulinemia.



FIGURA 1. Criança com diagnóstico de LV apresentando hepatoesplenomegalia e emagrecimento.



FIGURA 2. Adulto com diagnóstico de LV e infecção pelo HIV com grande esplenomegalia.

2.3 Diagnóstico

As clássicas manifestações clínicas da leishmaniose visceral como febre, palidez, esplenomegalia estão presentes na maioria dos pacientes, mas são sinais muito inespecíficos, presentes em diversas outras doenças e por isto a confirmação laboratorial se faz necessária.(SAKKAS; GARTZONIKA; LEVIDIOTOU, 2016).As provas sorológicas mais usadas são a Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de aglutinação direta (DAT), e testes rápidos baseados em antígenos recombinantes presentes no cinetoplasto da *Leishmania*(ZIJLSTRA et al., 1998)(EL HARITH et al., 1988)(MAIA et al., 2012). A sorologia, contudo, deve ser interpretada com critérios, uma vez que a soroconversão pode não se associar à doença clínica. A intradermoreação de Montenegro não é reagente durante a doença ativa mas pode se positivar após a resolução da infecção e na Leishmaniose tegumentar, sendo por isto utilizada como marcador sorológico da infecção em estudos populacionais(BRASIL,2006).

Na LV ativa, a demonstração do parasito pode ser feita em material adquirido de punção aspirativa de medula óssea, linfonodos ou baço, através de exames diretos, inoculação em animais suscetíveis e culturas. Os exames diretos apresentam praticidade e rapidez no resultado, enquanto a inoculação em animais e as culturas apresentam maior facilidade de visualização do parasito e maior sensibilidade às custas de maior período de tempo, o que pode retardar a tomada de decisão clínica. As metodologias moleculares são métodos promissores, pois apresentam elevada sensibilidade, entretanto, a presença do DNA não configura a presença do parasito vivo ou a doença clínica, o que lhe confere baixa especificidade. Além disso, os resultados devem ser analisados com cautela, levando em consideração o tipo de amostra, o alvo do DNA utilizado, método de extração do DNA, além de demandar infraestrutura e pessoal especializado.

2.4 Infectividade

O ciclo de transmissão da LV, que anteriormente acontecia em ambiente silvestre e rural, passou a acometer centros urbanos (GONTIJO; MELO, 2004). Os reservatórios envolvidos na transmissão silvestre habitam locais menos frequentados pelo homem, como floresta amazônica e o sertão nordestino (COSTA, 2005). O ciclo de transmissão doméstica

geralmente ocorre entre o homem, o cão e o inseto vetor (DEANE e DEANE, 1962). Nos grandes centros urbanos o ambiente é praticamente incontrolável, a presença de favelas traz uma nova modalidade de proliferação de vetores, e a interferência do HIV modifica o mapa de expansão da LV. A luz disso, acende a discussão de quais são os novos possíveis reservatórios e quais grupos são mais acometidos.

Os estudos de transmissão de LV foram classicamente realizados através do xenodiagnóstico (DEANE e DEANE, 1962);(SHERLOCK, 1996). A competência vetorial é a habilidade intrínseca de uma espécie para transmitir biologicamente um agente causador de doença e, no caso das leishmanioses pode ser definida como a proporção de flebotomíneos que se infectam ao se alimentar em um hospedeiro (SMITH et al., 2012). Para fins de pesquisa este estudo considerou que apenas uma amastigota seria capaz de infectar um flebotomíneo(SEBLOVA et al., 2012a). O xenodiagnóstico é um procedimento sofisticado que utiliza um vetor, agindo como um meio de cultura biológica, para a detecção de uma infecção (FIGURA 3). No entanto, esse método possui muitas limitações, uma vez que a natureza de sua execução demanda muitas fontes de variação como o local da aplicação, quantidade de parasito nos tecidos acessíveis ao vetor (sangue, pele, líquido intersticial), *status* imunológico do hospedeiro(VERÇOSA et al., 2008)(SOARES et al., 2011), espécie do flebotomíneo(DOBSON et al., 2010), espécie do reservatório (COURTENAY et al., 2014).

Além disso, existem outras fontes potenciais de variação que incluem quantidade de insetos, tempo de jejum dos insetos (período de transição entre a fase imatura e a fase adulta), tempo de contato com os reservatórios, horário da aplicação, temperatura, umidade, pressão exercida pelo elástico acoplado a caixa de plástico, odor do reservatório, uso de produtos químicos no local da aplicação, espécie e virulência da cepa, idade dos insetos utilizados, experiência do operador. Tais variações são difíceis de serem controladas, se fazendo necessário o desenvolvimento de novas tecnologias, de fácil aplicação e acessíveis a estudos populacionais, a qPCR tem sido indicada como nova tecnologia para identificação de pessoas infectantes (MILLER et al., 2014).

Existe uma alta complexidade em se discutir quais perfis epidemiológicos estão em maior risco para adquirir infecção por *L. infantum*. Um estudo de coorte realizado em Teresina-PI mostrou que o grupo de menor risco são pessoas com alto níveis educacionais e que vivem em áreas onde recebem algum tipo de intervenção para o controle da doença (ALVES et al., 2016). A identificação dos reservatórios que contribuem para infecção dos vetores é essencial para compreensão da dinâmica de transmissão de doenças transmitidas por

vetores, desta forma, é possível desenvolver estratégias que visam a intervenção em populações com infectividade relevante (MILLER et al., 2014).



FIGURA 3. Aplicação do xenodiagnóstico no antebraço de um indivíduo.

2.5 Leishmaniose visceral e HIV

O primeiro caso de leishmaniose associada com a infecção pelo HIV foi relatada em 1985, enquanto o número de casos aumentaram rapidamente no sul da Europa antes do início da terapia antirretroviral (ALVAR et al., 1997). A pandemia de AIDS mudou a história natural da leishmaniose, uma vez que infecção pelo HIV aumenta o risco de desenvolvimento de VL por 100 a 2320 vezes em áreas endêmicas, reduz a probabilidade de uma resposta terapêutica, e aumenta a probabilidade de recidivas (ALVAR et al., 2008). O Brasil é o epicentro da epidemia de HIV/AIDS na América do Sul (SZWARCOWALD et al., 2000), e a expansão do HIV coincidiu com urbanização do calazar. Teresina apresenta o maior número de casos documentados da coinfeção HIV/LV no Brasil (LEITE DE SOUSA-GOMES et al., 2011) (LIMA et al., 2013). Um estudo realizado por SOUZA-GOMES (2011), constatou que a maioria dos casos de pacientes coinfectados LV-HIV eram adultos (média de 34 anos) do

sexo masculino (78,1%), e que a maior parte dos casos está distribuída no Nordeste e Sudeste do país. Isso é esperado, já que as duas doenças acometem mais homens adultos. A tríade clássica da LV é também a manifestação mais comum na co-infecção *Leishmania*/HIV: esplenomegalia, anemia e pancitopenia são observadas em 75% dos casos relatados. Febre (80 a 87%), astenia e emagrecimento (70 a 90%), anemia (49 a 100%), esplenomegalia (54 a 90%), hepatomegalia (34 a 85%), leucopenia (56 a 95%) e plaquetopenia (52 a 93%)(BRASIL, 2008).No entanto, o diagnóstico do calazar em pacientes com HIV é problemático devido à baixa sensibilidade dos testes laboratoriais complementares(CAVALCANTI et al., 2012)(CUNNINGHAM et al., 2012). Ambos, HIV e *Leishmania*, induzem um déficit nas respostas humoral e celular, o que limita o valor diagnóstico dos testes sorológicos para pacientes co-infectados. O exame parasitológico apresenta alta especificidade na cultura, mas como leva mais tempo, pode implicar na menor probabilidade de sobrevida.

Mais que a alta taxa de mortalidade, grande número de recidivas e dificuldades no diagnóstico, a infecção por *Leishmania* e a infecção pelo HIV são consideradas de grande importância para a Saúde Pública devido a sua magnitude e expansão geográfica. Uma vez admitido que existe uma transmissão antroponótica de *L. infantum*, as pessoas infectadas pelo HIV devem ser direcionadas como potenciais reservatórios da infecção. Devemos admitir que as medidas de controle devem ser reavaliadas e concentrar os esforços nos grupos mais vulneráveis. A maior possibilidade de deslocamento de pessoas em relação aos reservatórios animais é um fator que deve ser levado em consideração, uma pessoa com capacidade de transmitir o protozoário que se desloque para uma área não endêmica, mas que tem a presença vetor, é um grande risco na distribuição da LV, além de trazer desafios e dificuldades no diagnóstico, assim como já foi descrito com Malária (NILLES; ARGUIN, 2012).

3. ORGANIZAÇÃO DA PESQUISA

2.1 Objetivo

Avaliar a ocorrência de transmissão de *Leishmania infantum* de seres humanos para *Lutzomyia longipalpis*.

2.2 Objetivos específicos

1. Aplicar o xenodiagnóstico em seres humanos com evidencia de infecção por *L. infantum* com e sem infecção pelo HIV.
2. Verificar a presença de *Leishmania* no vetor (*Lu. longipalpis*) por microscopia.
3. Detectar DNA de *Leishmania* no vetor por reação de cadeia em polimerase convencional (PCR).
4. Medir a carga parasitaria dos participantes atrás da reação de cadeia em polimerase em tempo real (qPCR).
5. Verificar associação entre a infectividade dos insetos e a carga parasitaria.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo transversal

4.2 População alvo

População em aera de risco para LV causada por *L. infantum*.

4.3 População fonte

Pessoas que procuraram o Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí Dr. Costa Alvarenga (LACEN-PI), que funciona como centro de triagem confidencial para teste anti-HIV, e pacientes atendidos no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP) em Teresina Piauí com leishmaniose visceral.

4.4 População do estudo

Os participantes desse estudo foram recrutados a partir de:

1) Hospital de referência em doenças infecciosas (IDTNP): Os pacientes que recebiam diagnostico de LV eram convidados a realizar a sorologia anti-HIV, e aqueles que apresentavam sorologia reagente para HIV eram convidados a realizar a testagem sorológica anti-*Leishmania*. 2) Centro de testagem anônima para HIV. Os indivíduos que recebiam resultado reagente da testagem anti-HIV voluntária eram convidados a realizar sorologia anti-*Leishmania*. (FIGURA 4). A pesquisa direta e a cultura de *Leishmania* em material da medula óssea foram realizadas como rotina diagnóstica em pacientes sintomáticos. Pessoas apresentando sorologia anti-*Leishmania* reagente, mas que não apresentavam manifestação clínica sugestiva de LV foram acompanhados clinicamente.

4.5 Critérios de inclusão

Foram considerados elegíveis para o estudo: 1) pacientes atendidos no IDTNP que tinham diagnóstico clínico de LV com pelo menos um teste laboratorial positivo para LV; 2) pacientes atendidos do Centro de Testagem e Aconselhamento.

4.6 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo participantes com impossibilidade clínica de colher o volume de sangue necessário.

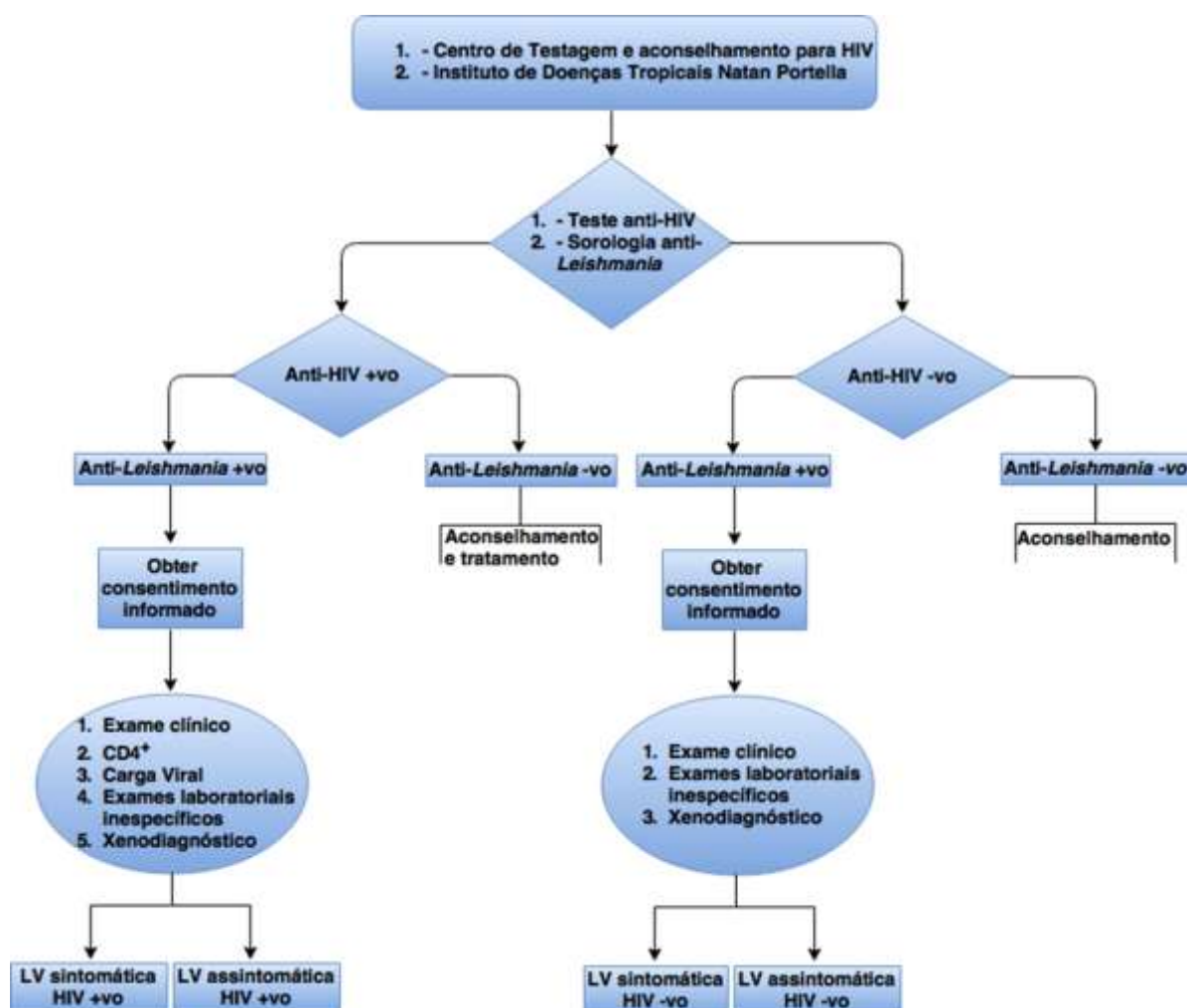


FIGURA 4. Algoritmo do estudo.

4.7 Critérios clínico laboratoriais

O estudo clínico de cada paciente foi completado no momento de sua inclusão através da avaliação feita pelo médico assistente. Amostras de sangue foram coletadas para os exames laboratoriais de rotina seguindo o protocolo de atendimento ao paciente com LV executado IDNTP, que incluem: hemograma, plaquetas, velocidade de hemossedimentação, aminotransferases, bilirrubinas, creatinina, albumina, globulina, exame sumário de urina, radiografia simples do tórax e culturas. Uma alíquota de sangue periférico foi separada em duplicata e congelada a -20°C para posterior análise da carga parasitária.

4.8 Caracterização dos indivíduos e definições

Considerou-se infecção sintomática por *Leishmania* a presença de febre, palidez, emagrecimento, esplenomegalia ou hepatomegalia em indivíduo com evidência laboratorial de LV. Considerou-se evidência laboratorial de LV sorologia reagente ou demonstração do parasito em exame direto ou cultura. Considerou-se infecção assintomática a reatividade sorológica anti-*Leishmania* em indivíduo que não apresentava sinais ou sintomas de LV no momento da realização do teste, e sem diagnóstico prévio da doença. Considerou-se infectado pelo HIV todo indivíduo com idade acima de 18 meses com sorologia anti-HIV reagente e crianças com 18 meses ou menos com carga viral detectável.

4.9 Exame direto para *Leishmania*

O esfregaço obtido por punção aspirativa da medula óssea era corado com corante de Giemsa e examinado em microscópio ótico no aumento de 1000x. O exame era considerado negativo se nenhuma forma amastigota fosse encontrada após no mínimo 30 minutos, o que corresponde a aproximadamente 1800 campos observados (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005) e era considerado positivo quando pelo menos uma forma amastigota era identificada.

4.10 Cultura para *Leishmania*

O material obtido da medula óssea era semeado em meio de cultura bifásico de Novy-MacNeal-Nicole–NNN. A leitura do sobrenadante do meio de cultura para a identificação de formas promastigotas era feita após 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias da semeadura. As culturas foram declaradas negativas se formas promastigotas não fossem identificadas após 28 dias.

4.11 Sorologia para *Leishmania*

A reação de imunofluorescência indireta para *Leishmania* (IFI-Leishmaniose Humana–Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) e o teste imunocromatográfico com antígeno rK39 - Kalazar Detect (InBios International, Seattle, WA, USA) foram realizados segundo as recomendações do fabricante.

4.12 Sorologia para HIV

A triagem sorológica para o HIV foi realizada por dois testes com princípios metodológicos ou antígenos diferentes, com confirmação sorológica pelo teste de imunofluorescência indireta para HIV-1 ou pelo teste de Western blot, de acordo com as recomendações nacionais do momento.

4.13 Local da Pesquisa

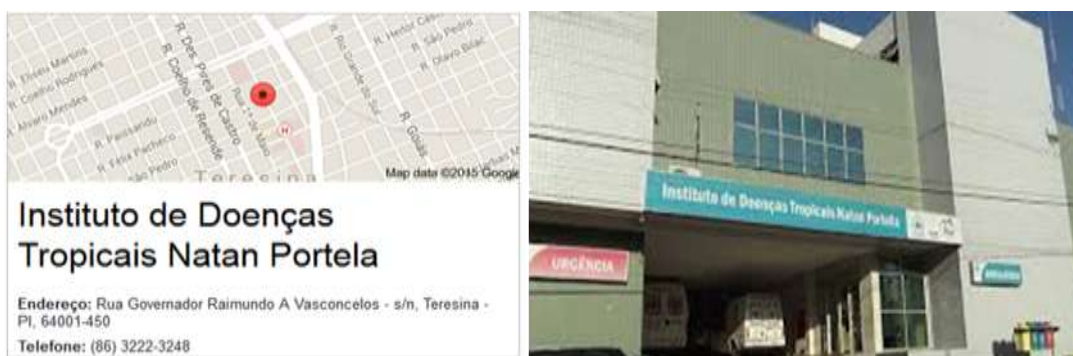


FIGURA 5. Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella.

O estudo foi realizado no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP) em Teresina PI, um hospital de referência em doenças infecciosas e parasitárias para o Piauí e para estados vizinhos, atuando como centro sentinela. Dispõe de serviço de pronto-atendimento geral e

ambulatório especializado em infectologia, urgência, emergência além de Unidade de Terapia Intensiva. O instituto dispõe de boa logística para captação de pacientes, infraestrutura laboratorial e hospitalar para diagnóstico e tratamento dessas enfermidades. O laboratório de análises clínicas conta com serviços de hematologia, bioquímica, imunologia, microbiologia, micologia, parasitologia. O laboratório para diagnóstico e pesquisa em leishmanioses (LabLeish) está capacitado a realizar técnicas de entomologia (xenodiagnóstico), parasitologia (exame direto e cultura), sorologia e biologia molecular. Ainda, tanto o IDTNP como o LabLeish têm vínculos de parceria público e privadas no sentido do desenvolvimento do conhecimento para diagnóstico e pesquisa médico-laboratorial. O centro de triagem utilizado como banco sorológico foi o Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí Dr. Costa Alvarenga (LACEN-PI). Trata-se de um laboratório público, vinculado à Secretaria Estadual de Saúde, através da Superintendência de Vigilância em Saúde. Atende diversas demandas provenientes das Regionais de Saúde, Vigilância Epidemiológica, Vigilância Sanitária e Vigilância Ambiental, além de coordenar a Rede de Laboratórios Públicos e Privados que realizam análises de interesse em saúde pública.

4.14 Trabalho de laboratório

4.14.1 Flebotomíneos

O primeiro objetivo aplicar o xenodiagnóstico em seres humanos com evidência de infecção por *L. infatum* com e sem infecção pelo HIV.

Os exemplares de *Lu. longipalpis* foram obtidos de colônia mantida no Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Piauí. Os insetos que deram origem a colônia foram capturados na cidade de Teresina (05° 05' 20" S 42° 48' 07" O), e mantidos segundo o método descrito por MODI e TESH (1983). Os insetos vindos do campo foram alimentados em hamsters, e mantidos em ambientes separados daqueles da geração F1 utilizada para o exame.

4.14.2 Xenodiagnóstico

Utilizou-se flebotomíneos fêmeas de primeira geração (F1), com até quatro dias após a eclosão da fase pupária, mantidos a 26°C e 92% de umidade, alimentadas somente com

solução açucarada até aproximadamente 12 horas antes do procedimento, quando eram deixadas sem nenhuma alimentação. Os insetos foram colocados em caixas de plástico, com um dos lados aberto e coberto por tecido de organza. Essas caixas foram aplicadas na face interna do antebraço dos participantes por um período médio de 45 minutos (FIGURA 3). Após a aplicação os insetos foram levados para uma incubadora tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand-Tecnal TE-391) e mantidos a 26°C, alimentados apenas com solução de açúcar. No quinto ou sexto dia após o repasto sanguíneo todos os insetos vivos foram dissecados e examinados ao microscópio óptico no aumento de 400x. Logo em seguida seus intestinos foram armazenados em tubos criogênicos e congelados à temperatura -20°C, para posterior realização da reação em cadeia de polimerase convencional.

4.14.3 Análise por microscopia

O segundo objetivo foi verificar a presença de *Leishmaniano* vetor através da microscopia. Foram considerados insetos infectados quando encontrado parasitos na forma promastigota à microscopia óptica no aumento de 400x. Após visualização os intestinos foram congelados a -20 para realização da PCR.

4.14.4 Análise por PCR

O terceiro objetivo foi detectar DNA de *Leishmania* no vetor através da reação de cadeia em polimerase convencional (PCR).

4.14.4.1 Extração do DNA

A extração de DNA do intestino dos insetos e do sangue periférico dos indivíduos seguiu as recomendações do fabricante QIAamp DNA Blood Mini kit 250 (Qiagen – Sample & Assay Technologies, Chatsworth, CA, USA). Concentração e pureza foram medidas em espectrofotômetro (NanoDrop ThermoScientific Inc., Wilmington, DE) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

4.14.4.2 Primers

Os primers usados para PCR convencional foram Lin R4 (5' - GGG GTA GTT GGT AAA TAG GG - 3') e Lin 19 (5' CAG AAC GCC ACC CCT CG - 3')(BREWSTER *et al.*, 1998), que são específicos para a região do minicírculo de *Leishmania*, e geram um fragmento de cerca de 720 pares de base para detectar kDNA de *L. infantum*

4.14.4.3 PCR convencional

As condições da PCR foram desnaturação a 94°C por 5 minutos e 94°C por 30 segundos, seguido de 52°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão, após ciclo de 35x, 72°C por 10 minutos para extensão final. A eletroforese ocorreu em gel 2% UltraPure™ Agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) corada com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA). Utilizou-se água ultrapura como controle negativo e DNA de *Leishmania* obtido de cultura puras como controle positivo, tanto para PCR convencional como para qPCR.

4.15 Estimativa da carga parasitária no sangue periférico (kDNAemia)

O quarto objetivo foi medir a carga parasitaria dos participantes atrás da reação de cadeia em polimerase em tempo real.

As amostras de sangue foram colhidas por punção de veia periférica em frascos estéreis contendo anticoagulantes (ácido etilenodiaminotetracético-EDTA e citrato de sódio de sódio 3,2%). A amplificação do DNA dos parasitos foi realizada em StepOne™ Real-Time PCR Systems (AppliedBiosystems, Foster City, CA). A quantificação de *L. infantum* foi realizada em placas de 48 poços (MicroAmp - AppliedBiosystems, Foster City, CA) em um volume final de 20,0 µL. Desse total, 0,5 µL eram de customTaqMan® Gene Expression Assays composto por primers e sonda otimizadas 20x (AppliedBiosystems, Foster City, CA), acrescidos de 10µLTaqMan® Gene Expression Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA). Um volume de 5,5 µL de água livre de RNase e 4,0 µL de DNA da amostra, padronizado uma quantidade de 10ng/µL de DNA para cada reação. A desnaturação foi realizada a 95° C por 10 minutos, e a amplificação e quantificação foram 40 ciclos de 15 segundos a 95° C e 1 minuto a 60° C. Amostras, curva padrão e controles negativos foram analisados em duplicatas. Considerou-se as reações com diferença máxima entre si de no máximo 20% e nenhum desvio de proporções. Para a detecção do parasito utilizou-se os oligonucleotídeos e sondas desenhadas a partir do gene da albumina (MARY *et al.*, 2004), e

das sequências do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) (ROLÃO et al., 2004), modificadas pelo mesmo autor. A quantidade de kDNA no sangue periférico (kDNAemia) corresponde à estimativa de amastigotas equivalentes a uma dada quantidade de kDNA de *L. infantum* medida no sangue periférico (AE/mL).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O quinto objetivo foi verificar associação entre a infectividade e a carga parasitária.

A análise estatística foi realizada pelo programa Stata/SE[®] 10.0 for Windows (College Station, Texas, USA). Foram calculados as médias e os intervalos de confiança 95% (IC 95%) das variáveis com distribuição normal e as medianas das demais distribuições. Utilizou-se teste de Wilcoxon para análise univariada da carga parasitária e da infectividade. A infectividade foi calculada através da proporção de insetos infectados. O teste de Spearman foi aplicado para verificar correlação entre a carga parasitária e a infectividade. Regressão logística foi aplicada para avaliar a interferência de idade, sexo, sintomas e co-infecção pelo HIV em relação a carga parasitária e a infectividade. O teste Kappa foi aplicado para verificar a concordância entre a microscopia e PCR, e o teste do Chi-square para verificar associação entre variáveis dicotômicas. A estimativa da probabilidade da transmissão para *Lu. longipalpis* foi inferida pelo modelo de distribuição de Poisson de acordo com MILLER et al (2014), considerando-se volume de sangue ingerido de 0,5 µL (READY, 1979). Modelagem matemática em função da carga parasitária foi realizada para inferir a quantidade estimada de parasitos em relação à infectividade observada no estudo.

6. Considerações éticas

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Piauí (protocolo 23111.011334/2010-93). Todos os pacientes ou seus responsáveis assinaram termo de consentimento livre e esclarecido referente à participação voluntária no estudo

7. Resultados

7.1 Participantes

Sessenta e uma pessoas participaram do estudo e foram divididas em quatro grupos: (a) Vinte pacientes com diagnóstico de LV e teste não reagente para HIV; (b) Vinte pacientes com diagnóstico de LV e teste reagente para HIV; (c) Dezenove pessoas assintomáticas com sorologia reagente para *Leishmania* e teste não reagente para HIV; (d) Dois indivíduos assintomáticos com sorologias reagentes para *Leishmania* e HIV. Entre todos, 35 (57%) eram do sexo masculino, e a idade variou de um a 65 anos, com mediana de 31 anos.

Não houve diferença de distribuição de idade e sexo entre os pacientes com LV e sem infecção pelo HIV. Todos os pacientes com LV e infecção pelo HIV eram adultos com predomínio do sexo masculino. A maioria dos indivíduos assintomáticos sem infecção pelo HIV eram mulheres acima de 16 anos ($p < 0.05$). Os dois indivíduos assintomáticos com infecção pelo HIV eram homens adultos (TABELA 1). A contagem de linfócitos CD4⁺ de estavam disponíveis em 16 dos 20 pacientes co-infectados, e variou de 11 a 268 células/mL com média de 117 células/mL, mediana de 120 células/mL.

TABELA 1. Distribuição dos participantes por gênero e idade nos grupos de estudo.

Grupo de estudo	LV	LV	LV	LV
	sintomática	assintomática	assintomática	assintomática
	HIV-	HIV+	HIV-	HIV+
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Gênero</i>				
Homens	12 (60)	17 (85)	4 (21)	2 (100)
Mulheres	8 (40)	3 (15)	15 (79)	0 (0)
<i>Idade (anos)</i>				
<4	6 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4≤18	2 (10)	0 (0)	1 (5)	0 (0)
>18	12 (60)	20 (100)	18 (95)	2 (100)

7.2 Xenodiagnóstico

7.2.1 Resultados por pessoas

Dos 61 indivíduos, 27 [44% Intervalo de confiança 95% (IC 95%) 31;57] tiveram xenodiagnóstico positivo no exame microscópico ou PCR, destes, 15 (25% IC 95% 14; 37) pela microscopia e 23 (38% IC 95% 26;51) pela PCR. Entre os pacientes com LV e sem infecção pelo HIV, o xenodiagnóstico foi positivo em 07 (35%, IC 95% 15;59), a microscopia em 5 (25% IC 95% 8; 49) e a PCR em 07 (35% IC 95% 15; 59).

Entre os pacientes com LV e infecção pelo HIV, 15 (75% IC 95% 50;91) foram positivos em ambos os métodos, 09 (45% IC 95% 23; 68] pela microscopia e 12 (60% IC 95% 36;80) pela PCR. Entre os 19 indivíduos assintomáticos, o xenodiagnóstico foi positivo em 04 (21%, IC 95% 6;45), apenas pela PCR. Dos dois assintomáticos com infecção pelo HIV, 01 (4,3% IC 95% 0; 21) teve o xenodiagnóstico positivo através da microscopia, em que apenas um inseto se infectou. Apesar de estar assintomático e do exame físico normal na primeira avaliação clínica, ele estava com anemia e, poucos dias depois da realização do teste, notou-se pequeno aumento do baço e o esfregaço da medula óssea mostrou a presença de parasitos, e foi então tratado com anfotericina B, com sucesso.

7.2.3 Resultados por insetos

Dos 2.385 insetos expostos, 1.288 sobreviveram até a data da dissecação. Foram encontrados 128 flebotomíneos positivos para *Leishmania* analisados por microscopia ou PCR. No grupo de pacientes com LV e sem infecção pelo HIV, dos 778 permitidos a se alimentar, 372 (47,8% CI 95% 44;51) sobreviveram e foram dissecados, o xenodiagnóstico foi positivo em 42 (11,2% CI 95% 8;14) insetos, dos quais, 9 (2,4% CI 95% 1;4) na microscopia, e 40 (10,7% CI 95% 7;14) na PCR. No grupo de pacientes com LV e infecção pelo HIV, 767 insetos se alimentaram, destes, 398 (51,8% CI 95% 48;55) sobreviveram e foram dissecados, sendo observados 58 (14,5% CI 95% 11;18) positivos, com 37 (9,2% CI 95% 6;12) pela microscopia e 38 (9,5% CI 95% 6;13) pela PCR. Dos indivíduos assintomáticos e sem infecção pelo HIV, 760 insetos foram permitidos se alimentarem, 495 (65,1% CI 95% 61;68) sobreviveram e foram dissecados e foi observado 27 (5,4% CI 95% 3;8) insetos positivos, todos pela PCR. Por fim, nos indivíduos assintomáticos e sem infecção pelo HIV, 80 insetos se alimentaram, e 23 (28,8% CI 95% 19;39) sobreviveram e foram dissecados, sendo

encontrado um (4,3% CI 95% 0;21) inseto positivo diagnosticado pela microscopia (TABELA 2).

TABELA 2. Resultado do xenodiagnóstico de acordo com sintomatologia para LV e *status* de infecção pelo HIV.

Grupo de estudo de acordo com a sintomatologia e <i>status</i> de infecção pelo HIV	Nº de pessoas por grupo	Nº de <i>Lu. longipalpis</i> expostos em cada grupo de estudo	Média de <i>Lu. longipalpis</i> por pessoa	Nº de <i>Lu. longipalpis</i> dissecados (%) [CI]*	Nº de pessoas infectantes por microscopia ou PCR (%) [CI]	Nº de pessoas infectantes por microscopia (%) [CI]	Nº de pessoas infectantes por PCR (%) [CI]	Nº de <i>Lu. longipalpis</i> infectados por microscopia ou PCR (%) [CI]	Nº de <i>Lu. longipalpis</i> infectados por microscopia (%) [CI]	Nº de <i>Lu. longipalpis</i> infectados por PCR (%) [CI]
LV sintomática HIV-	20	778	39	372 (47,8) [44-51]	7 (35) [15-59]	5 (25) [8-49]	7 (35) [15-59]	42 (11,2) [8-14]	9 (2,4) [1-4]	40 (10,7) [7-14]
LV sintomática HIV+	20	767	38	398 (51,8) [48-55]	15 (75) [50-91]	9 (45) [23-68]	12 (60) [36-80]	58 (14,5) [11-18]	37 (9,2) [6-12]	38 (9,5) [6-13]
LV assintomática HIV-	19	760	40	495 (65,1) [61-68]	4 (21) [6-45]	Nenhum	4 (21) [6-45]	27 (5,4) [3-8]	Nenhum	27 (5,4) [3-8]
LV assintomática HIV+	2	80	40	23 (28,8) [19-39]	1 (50) [1-98]	1 (50) [1-98]	Nenhum	1 (4,3) [0-21]	1 (4,3) [0-21]	Nenhum
Total	61	2385	39	1288 (54) [51-56]	27 (44) (31-57)	15 (25) [14-37]	23 (38) [26-51]	128 (9,9) [8,3-11,7]	48 (3,7) [2,7-4,9]	105 (8,1) [6,7-9,7]

*Intervalo de confiança 95%.

Na análise univariada, os pacientes com LV e infecção pelo HIV infectaram significativamente mais flebotômíneos do que os pacientes com LV sem infecção pelo HIV ($p=0.05$), quando considerados os resultados de ambos os métodos. Entretanto, quando os resultados do xenodiagnóstico foram tomados separadamente para microscopia e para PCR, a proporção de insetos infectados não foi estatisticamente diferente ($p=0.1$ e 0.2 , respectivamente). A regressão logística multivariada da infectividade, verificada por ambos os métodos, controlando-se o gênero, idade e status de infecção por HIV, mostrou que a infectividade está aumentada na presença da infecção pelo HIV ($p = 0.03$). De forma similar a presença de sintomas está fortemente associada à infectividade para o vetor ($p= 0.004$). Contudo, quando considerada apenas o resultado pela PCR, a presença de infecção pelo HIV ou aquela de sintomas não entraram no modelo devido a colinearidade. Quando considerado apenas a microscopia, as duas variáveis estiveram associadas com infectividade ($p= 0.04$; $p = 0.01$, respectivamente).

O exame dos insetos por microscopia e por PCR para o xenodiagnóstico tiveram fraca concordância entre si, tanto quando os resultados foram analisados para as pessoas ($Kappa=0,32$; $p=003$) como para insetos ($Kappa=0,27$; $p=0.0001$). Houve associação significativa entre os resultados pela microscopia e PCR quando analisados para pessoas ($p=0.008$) e para insetos ($p=0.001$) (TABELA 3).

TABELA 3. Concordância dos resultados do xenodiagnóstico medidos por microscopia e PCR.

Microscopia	PCR		Total (%)	Kappa	Valor de p
	Negativo (%)	Positivo (%)			
Análise por indivíduo					
Negativo (%)	33 (86)	13(56)	46 (75)	0,32	0.03
Positivo (%)	5 (14)	10(44)	15 (15)		
Total (100%)	38(100)	23(100)	61 (100)		
Análise por inseto					
Negativo (%)	1,158 (98)	80 (78)	1,238 (96)	0,27	< 0.001
Positivo (%)	23 (2)	23 (22)	46 (4)		
Total (100%)	1,181 (100)	103 (100)	1,284 (100)		

7.3 Carga parasitária

A kDNAemia variou de nenhum a 11.143,9 EA/ml, com média de 746 EA/ml e mediana de 70,9 EA/ml. Os pacientes com LV e sem infecção pelo HIV, tiveram média de 268.2 EA/ml e mediana de 67,7 EA/ml. Os pacientes com LV e HIV apresentaram kDNAemia muito maior que os demais participantes, com média de 1.876,1 EA/ml e a mediana 682.2 EA/ml. Já nos indivíduos assintomáticos e sem infecção pelo HIV, a média foi de 41.5 EA/mL e a mediana de 3.8 EA/mL. O indivíduo assintomático para LV e com HIV apresentou 1,866.7 EA/mL, com média 933,3 EA/mL para os dois indivíduos do grupo (TABELA 4).

TABELA 4. Carga parasitária medida no sangue periférico nos diferentes grupos de estudo.

Grupo de estudo	Média*	Desvio padrão	Mediana*	Intervalo interquartil (25;75)
LV sintomática HIV-	268,2	465,9	68	10; 316,8
LV sintomática HIV+	1876,1	2858,3	682,2	340; 2125,7
LV assintomática HIV-	41,5	136,7	3,8	2,3; 11,6
LV assintomática HIV+	933,3	1319,9	933,3	0; 1866,6

*kDNA correspondente ao número de parasitos por mL (amastigotas equivalentes).

A kDNAemia foi menor nos pacientes sem infecção pelo HIV do que nos pacientes com HIV ($p=0,002$). Os pacientes sintomáticos apresentaram kDNAemia muito maior do que aqueles sem sintomas ($p=0.0005$) (FIGURA 6).

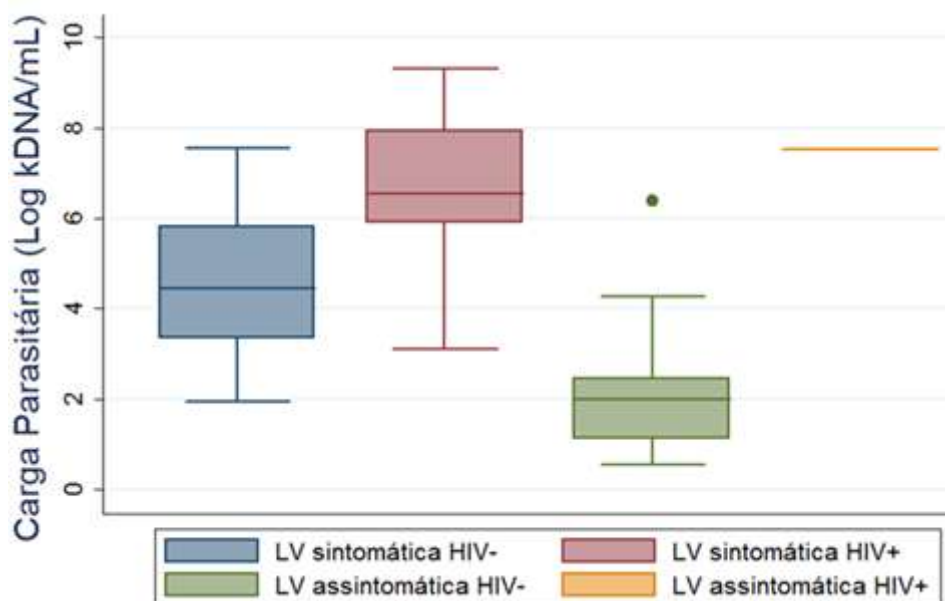


FIGURA 6. Distribuição da carga parasitária entre os grupos de pacientes com *L. infantum* e com infecção pelo HIV.

O modelo de regressão multivariada que incluiu idade, gênero, sintomas e status de infecção por HIV, mostrou que a presença de sintomas (odds ratio 37.4; $p = 0.003$) e infecção pelo HIV (odds ratio 6.5; $p=0.04$) são fatores de risco para elevada kDNAemia. Houve uma correlação fraca entre a quantidade de amastigotas equivalentes e a infectividade para *Lu. longipalpis*, seja quando o exame dos insetos foi feito por microscopia ($r=0.47$), como por PCR ($r=0.32$) ou por ambos ($r=0.44$), embora a associação tenha sido estatisticamente significativa ($p<0.001$) para todos (FIGURA 7)

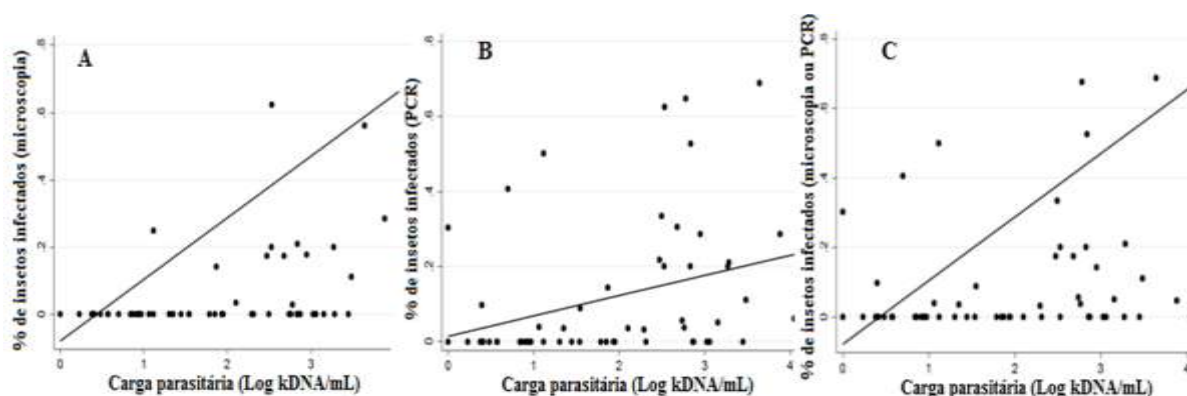


FIGURA 7: Associação da infectividade em relação ao log da carga parasitária medido no sangue periférico dos participantes do estudo. A) por microscopia ótica. B) por PCR. C) por microscopia ótica ou PCR

A modelagem matemática da kDNAemia com a infectividade mostrou que para média de 268 EA/mL no grupo de pacientes com LV e sem infecção pelo HIV, a estimativa esperada de insetos infectados foi de 13%, acima da percentagem observada, quando analisada pela microscopia. No grupo de pacientes sintomáticos e com infecção pelo HIV, para média de 1,879 EA/mL, esperava-se uma percentagem de 62% de insetos infectados, enquanto a percentagem medida na microscopia foi de 9.2%. No grupo de indivíduos assintomáticos e sem infecção pelo HIV, a kDNAemia foi de 41 EA/mL, e a estimativa de insetos infectados foi de 2%, entretanto, nenhum inseto se infectou quando analisado pela microscopia. No grupo de indivíduos assintomáticos e com HIV, a média de parasitos foi de 933 EA/mL e a estimativa de insetos infectados foi de 38%.

Para avaliar a relação da kDNAemia como marcador de infectividade foi considerado o mesmo modelo em função da carga parasitaria e a percentagem observada por ambos os métodos. Similarmente, foi encontrado que para uma infectividade de 2,4% (CI 1,1- 4,5), no grupo de pacientes sintomáticos e sem infecção pelo HIV, seria necessária uma média de 48 (22-92) EA/mL, enquanto o valor encontrado foi 268 EA/mL. No grupo de pacientes sintomáticos para LV co-infectados pelo HIV, para uma infectividade observada de 9.2% (6,6-12,5), esperava-se uma média de 193 (CI 136-267) EA/mL, enquanto a kDNAemia foi 1,876 EA/mL. Já no grupo de indivíduos assintomáticos sem infecção pelo HIV, não foi possível detectar insetos infectados pela microscopia. No grupo de indivíduos assintomáticos e co-infectados pelo HIV, a infectividade observada foi 4,3% (CI 0,001-21,9), e a carga parasitaria esperada seria de 87 (0-493) EA/mL, enquanto a kDNAemia observada foi de 933,3 EA/mL (TABELA 5).

TABELA 5. Carga parasitária esperada e percentual de insetos infectados calculados pela distribuição de Poisson* de acordo com a presença de sintomatologia para LV e *status* de infecção do HIV.

Grupos de estudo	Média da carga parasitária observada	Percentual esperado de insetos infectados*	Percentual de insetos infectados na microscopia (CI)***	Carga parasitária esperada* (CI)**
LV sintomática HIV-	268	13	2.4 (1.1–4.5)	48 (22-92)
LV sintomática HIV+	1876	62	9.2 (6.6–12.5)	193 (136-267)
LV assintomática HIV-	41	2	Nenhum	Nenhum
LV assintomática HIV+	933	38	4,3 [0–21.9]	87 (0-493)

*Calculo da carga parasitária utilizando a distribuição de Poisson $P = -\frac{\ln 1-x}{v}$, onde P é a carga parasitária esperada, v é o volume de sangue sugado pelo inseto, considerando para *Lu. longipalpis* 0,5 μ L (READY *et al* 1978), e x é a proporção de insetos infectados observados pela microscopia. O percentual esperado de insetos infectados foi calculado segundo MILLER *et al* (2014).

** Intervalo de confiança da carga parasitária esperada foi calculado utilizando os valores limites do percentual de insetos infectados na microscopia.

*** Intervalo de confiança 95%.

8. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que existem indivíduos assintomáticos, com e sem HIV, transmitindo *L. infantum* para flebótomos. Assim, como as pessoas com infecção assintomática por *Leishmania viscerotrópica* são muito mais numerosas do que pessoas com doença ativa (PAMPIGLIONE *et al.*, 1974)(WERNECK *et al.*, 2002) elas podem também ser significativa fonte de infecção de *L. infantum*, ao lado de reservatórios não-humanos, como os cães domésticos e outros animais silvestres (COSTA *et al.*, 2002) mesmo que somente uma pequena proporção destes indivíduos seja infeccioso, o que os levaria a desempenhar papel na dispersão espacial e a atravessar o período inter-epidêmico das regiões sub-tropicais (ROGERS, 1988).

Em um estudo realizado por MOLINA *et al* (1999), foi demonstrado que pessoas com LV e co-infectadas pelo HIV eram muito infecciosos para o vetor *Phlebotomus perniciosus*, bem mais do que o que foi verificado neste estudo para *Lu. longipalpis*. Como a competência vetorial das duas espécies é similar, a diferença pode ser atribuída ao menor número de células CD4+ dos pacientes daquela observação em comparação com os deste estudo. Adicionalmente à elevada infectividade destes pacientes, alia-se o fato de que uma proporção significativa, um pouco menos do que 40%, permanece cronicamente doente, com sucessivos relapses. (BOURGEOIS, *et al.*, 2008), sendo por isto bons reservatórios do protozoário. Como um dos dois pacientes assintomáticos e co-infectados aqui descrito era infeccioso assim como outros indivíduos assintomáticos sem HIV, os dados indicam, que alguns dos pacientes com LV e HIV representam uma substancial e duradoura fonte de parasitos em áreas endêmicas.

No Novo Mundo, aproximadamente a metade dos indivíduos que desenvolvem LV são crianças com menos de cinco anos de idade (OLIVEIRA *et al.*, 2006)(COURA-VITAL *et al.*, 2014) e o tempo decorrido entre a infecção e o diagnóstico pode chegar a vários meses. COSTA *et al* (2002), mostraram que crianças com idade abaixo de três anos são mais infecciosos do que os adultos. No presente estudo, entretanto, nenhuma criança com menos quatro anos foi infecciosa, talvez devido ao pequeno número estudado. Assim, no cenário atual de coinfeção entre HIV e *Leishmania*, as fontes de infecção humanas mais importantes entre os indivíduos com LV são os adultos coinfectados.

A infecção dos insetos alimentados em indivíduos assintomáticos e sem infecção pelo HIV foi evidenciada apenas pela PCR, mas não pelo encontro de parasitos viáveis. Entretanto, não se pode inferir que a presença de produtos de amplificação seja decorrente da presença de parasitos viáveis e transformados nas formas promastigotas metacíclicas (SEBLOVA et al., 2012b)(SEBLOVA *et al.*, 2014). É possível se argumentar que os insetos infectados carregassem apenas DNA circulante. Entretanto, isso não parece razoável, uma vez que os insetos foram dissecados tardiamente, após o quinto ou sexto dia do repasto sanguíneo, tempo suficiente para eliminação da matrix peritrófica onde o sangue fica englobado e retido no tubo digestivo dos insetos durante alguns dias (DOBSON et al., 2010)(PRUZINOVA *et al.*, 2015). De todo modo, não se pode inferir que estes insetos seriam infecciosos para hospedeiros suscetíveis, uma vez provavelmente portavam pequeno número de parasitos, que talvez jamais atingissem as peças bucais, o que diminui exponencialmente a probabilidade de transmissão. (SCHLEIN; JACOBSON, 1996).

A microscopia é o método mais seguro para avaliar a capacidade de transmissão, já que indica a presença de parasitos vivos, ao contrário do PCR. Além disto, os dois métodos tiveram baixa concordância, o que indica que, a PCR ainda não está habilitada para substituir o exame direto na identificação de insetos infectados por *Leishmania*. Claramente, são necessários mais estudos experimentais em condições bem controladas, destinados especificamente a investigar a correlação entre a microscopia e os testes moleculares para este fim.

Metodologias moleculares são essenciais no diagnóstico e seguimento de LV em pessoas com infecção pelo HIV (BOURGEOIS, *et al.*, 2008), pois a carga parasitaria correlaciona-se com o curso clínico da doença (BOSSOLASCO et al., 2003). Os dados desse estudo mostraram que os pacientes com LV e coinfeção pelo HIV tiveram kDNAemia muito mais elevada do que aqueles sem o vírus e que pessoas com LV ativa e sem a co-infecção pelo HIV tiveram carga parasitaria muito maior do que os assintomáticos. Estes dados estão de acordo com o que já foi publicado na Europa e na Índia. (MARY et al., 2006)(SUDARSHAN et al, 2014).

A qPCR do sangue apresenta-se como um dos candidatos à substituição do xenodiagnóstico como medida de infectividade, devido à variabilidade do método e às dificuldades práticas para o cultivo de flebotomíneos. Entretanto, uma importante pergunta é se a quantidade de DNA de *Leishmania* estimada na qPCR do sangue periférico, corresponde ao número de parasitos viáveis e acessíveis ao vetor. A fraca correlação entre a carga

parasitaria e a infectividade aqui encontrada sugere que a qPCR provavelmente não identifica apenas parasitos vivos, mas apenas a quantidade de DNA circulante originada de parasitos destruídos nos tecidos, conforme os achados de Silva et al (2016). Portanto, neste estudo, a qPCR não se mostrou um método confiável para medir a infectividade, ao contrário do que foi sugerido Miller et al (2014).

Ainda que a concentração de parasitos circulantes tenha sido muito maior nos pacientes com co-infecção pelo HIV, a competência em infectar sand flies entre estes pacientes não foi proporcionalmente maior do que a dos pacientes sintomáticos e sem a co-infecção pelo HIV. Além disso, a proporção de insetos infectados não foi predita pela quantidade de parasitos circulantes. Baseando-se nestas observações, é possível se considerar que a fonte de infecção para os vetores não seja apenas o sangue, mas também, e principalmente, a pele, como visto em um estudo anterior em cães (COURTENAY, *et al*, 2012) e em recente estudo em humanos (SILVA *et al.*, 2016) que demonstrou que a concentração de parasitos circulantes é irrisória perante o que é estimado pela qPCR. De acordo com esta ideia, estudos feitos em cães sugerem que o parasitismo das camadas superficiais da epiderme é suficiente para se atribuir à pele a fonte de parasitos para os vetores da LV (COURTENAY *et al.*, 2014)(SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2007).

Em conclusão, este estudo demonstrou que estar infectado pelo HIV e apresentar sintomas de LV aumenta significativamente a competência do indivíduo como reservatório para *L. infantum*, mas também foi possível demonstrar pessoas assintomáticas podem transmitir o parasito para o vetor. Como *Lu. longipalpis* prefere alimentar-se de pessoas que de cães (embora infectem menos os vetores) (DEANE; DEANE, 1962), é lícito concluir que os seres humanos são importantes reservatórios de *L. infantum*, particularmente aqueles infectados com o HIV. Finalmente, os dados demonstram que o xenodiagnóstico não pode ser substituído pela qPCR e que é necessária a padronização da técnica do xenodiagnóstico a fim de servir de alicerce para o desenvolvimento de tecnologias com correlação aceitável. Com isto, será possível se medir com mais precisão os papéis dos diferentes reservatórios vertebrados na transmissão da LV.

9. CONCLUSÕES

Objetivo 1: Aplicar o xenodiagnóstico em seres humanos com evidencia de infecção por *L. infatum* com e sem infecção pelo HIV.

Pessoas participam do ciclo de transmissão da LV, especialmente quando apresentam sintomas para LV e estão infectadas com o vírus HIV.

Objetivo 2: Verificar a infectividade do vetor *Lu. longipalpis* por microscopia.

A microscopia mostrou mais segura que a PCR para avaliar a infectividade, já que é possível demonstrar as formas infectantes no intestino do inseto.

Objetivo 3: Verificar a infectividade do vetor *Lu. longipalpis* por reação de cadeia em polimerase convencional.

Embora a PCR tenha demonstrado maior sensibilidade no xenodiagnóstico, esse método não seguro para avaliação da infectividade dos vetores, uma vez que a detecção de DNA sozinha pode não representar parasitos viáveis e infectantes.

Objetivo 4: Medir a carga parasitaria dos participantes através da reação de cadeia em polimerase em tempo real.

Estar infectado pelo HIV e apresentar sintomas de LV estão associados com maior carga parasitária.

Objetivo 5: Verificar associação entre a infectividade dos insetos e a carga parasitaria.

A fraca correlação entre a infectividade e carga parasitária medida na qPCR deve-se, possivelmente, porque esse método mede uma quantidade de kDNA equivalente a amastigotas, o que pode representar uma estimativa de kDNA parasitário total no organismo, mas não representa parasitos viáveis e acessíveis ao vetor. Além disso, a fonte de infecção parece não ser apenas o sangue, mas principalmente, macrófagos infectados provenientes da pele.

Referencias

- ALVAR, J. et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 2, p. 298–319, 1997.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- ALVES, E. B. et al. Risk Profiles for Leishmania infantum Infection in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1276–81, 1 jun. 2016.
- ARAÚJO, A. D. C. et al. Visceral leishmaniasis in petrolina, State of Pernambuco, Brazil, 2007-2013. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 1, p. 29, 2016.
- BELO, V. S. et al. Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde, **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde, **Leishmaniose visceral: Recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília, DF, 2008.
- BOSSOLASCO, S. et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5080–4, nov. 2003.
- BOURGEOIS, N. et al. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 48, n. 1, p. 13–9, maio 2008.
- BOURGEOIS, N. et al. “Active chronic visceral leishmaniasis” in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. **HIV Medicine**, v. 11, n. 10, p. 670–673, 2010.
- BREWSTER, S.; ASLETT, M.; BARKER, D. C. Kinetoplast DNA Minicircle Database. **Parasitology Today**, v. 14, n. 11, p. 437–438, nov. 1998.
- CAVALCANTI, A. T. DE A. E et al. Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 43–47, 2012.

- COSTA, C. H. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, p. 334–7, 2002.
- COSTA, C. H. et al. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 3, p. 997–1000, 2000.
- COSTA, C. H. N. et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 99, n. 3, p. 229–36, abr. 2005.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959–2963, dez. 2008.
- COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361–372, out. 1990.
- COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3–17, 2005.
- COURA-VITAL, W. et al. Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3374, 2014.
- COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2583, 9 jan. 2014.
- CRUZ, I. et al. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1124–1125, 2002.
- CUNNINGHAM, J. et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 10, p. 1312–9, 15 nov. 2012.
- DA SILVA, M. R. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 6, p. 811–4, jun. 2005.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198–212, 1962.
- DOBSON, D. E. et al. *Leishmania major* Survival in Selective Phlebotomus papatasi Sand Fly Vector Requires a Specific SCG-Encoded Lipophosphoglycan Galactosylation Pattern.

PLoS Pathogens, v. 6, n. 11, p. e1001185, 11 nov. 2010.

DRIEMEIER, M. et al. Late diagnosis: a factor associated with death from visceral leishmaniasis in elderly patients. **Pathogens and global health**, v. 109, n. 6, p. 283–9, set. 2015.

DRUZIAN, A. F. et al. Risk Factors for Death from Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. e0003982, 2015.

DYE, C.; WILLIAMS, B. G. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 254, n. 1339, p. 33–9, 22 out. 1993.

EL HARITH, A. et al. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 7, p. 1321–5, jul. 1988.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004.

HENRIQUE, C.; COSTA, N.; TAPETY, C. M. M. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano : estudo de intervenção randomizado fatorial Control of visceral leishmaniasis in urban areas : randomized factorial intervention trial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 415–419, 2007.

LEITE DE SOUSA-GOMES, M. et al. Coinfecção Leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519–526, dez. 2011.

LIMA, I. P. et al. Human immunodeficiency virus/Leishmania infantum in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 156–60, 2013.

MACEDO-SILVA, V. P. et al. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of medical entomology**, v. 51, n. 1, p. 237–44, 2014.

MAIA, Z. et al. **Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis** **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2012.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. v. 42, n. 11, p. 5249–5255, 2004.

MARY, C. et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: Quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient

- follow-up. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 858–863, 2006.
- MENGESHA, B. et al. Prevalence of malnutrition and associated risk factors among adult visceral leishmaniasis patients in Northwest Ethiopia: a cross sectional study. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 75, 2014.
- MILLER, E. et al. Quantifying the Contribution of Hosts with Different Parasite Concentrations to the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3288, 2014.
- MODI, G. B.; TESH, R. B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. **Journal of medical entomology**, v. 20, n. 5, p. 568–9, 5 out. 1983.
- MOLINA, R. et al. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 1, p. 51–53, 1999.
- NILLES, E. J.; ARGUIN, P. M. Imported malaria: an update. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 6, p. 972–980, jul. 2012.
- OLIVEIRA, A. L. L. DE et al. [Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 446–50, 2006.
- PAMPIGLIONE, S. et al. Studies on Mediterranean leishmaniasis. 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 6, p. 447–53, 1974.
- PRUZINOVA, K. et al. Comparison of Bloodmeal Digestion and the Peritrophic Matrix in Four Sand Fly Species Differing in Susceptibility to *Leishmania donovani*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128203, 1 jun. 2015.
- READY, P. D. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, v. 16, n. 5, p. 413–23, 23 nov. 1979.
- ROGERS, D. J. The dynamics of vector-transmitted diseases in human communities. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 321, n. 1207, p. 513–39, 31 out. 1988.
- ROLÃO, N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Parasitol**, v. 90, n. 5, p. 1150–1154, 2004.

- SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of vector borne diseases**, v. 53, n. 1, p. 8–16, 1 mar. 2016.
- SANGENIS, L. H. C. et al. Expansion of Visceral Leishmaniasis in the State of Rio De Janeiro, Brazil: Report of the First Autochthonous Case in the Municipality of Volta Redonda and the Difficulty of Diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 271–274, jun. 2014.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Veterinary dermatology**, v. 18, n. 4, p. 227–33, ago. 2007.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L. Why is man an unsuitable reservoir for the transmission of *Leishmania major*? **Experimental parasitology**, v. 82, n. 3, p. 298–305, abr. 1996.
- SEBLOVA, A. V et al. Development of *Leishmania* Parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera : Ceratopogonidae) and Implications for Screening Vector Competence Development of *Leishmania* Parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera : Ceratopogonidae) and Implications for S. v. 49, n. 5, p. 967–970, 2012a.
- SEBLOVA, V. et al. Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. **Journal of medical entomology**, v. 49, n. 5, p. 967–70, 1 set. 2012b.
- SEBLOVA, V. et al. Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 222, jan. 2014.
- SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671–83, 1996.
- SILVA, J. C. et al. Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 517–522, ago. 2016.
- SMITH, D. L. et al. Ross, macdonald, and a theory for the dynamics and control of mosquito-transmitted pathogens. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002588, 2012.
- SOARES, M. R. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 6–9, 2011.
- SUDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, mar. 2014.

- SZWARCWALD, C. L. et al. A disseminação da epidemia da AIDS no Brasil, no período de 1987-1996: uma análise espacial. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 7–19, 2000.
- VAN GRIENSVEN, J. et al. **HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-co-infected individuals** *The Lancet Infectious Diseases*, 2013.
- VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC veterinary research**, v. 4, n. 1, p. 45, 2008.
- WERNECK, G. L. et al. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta tropica**, v. 83, n. 1, p. 13–8, jul. 2002.
- WERNECK, G. L. et al. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiology and infection**, v. 135, n. 2, p. 195–201, 2007.
- WERNECK, G. L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 26, n. 4, p. 644–5, abr. 2010.
- ZIJLSTRA, E. E. et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 5, n. 5, p. 717–20, set. 1998.