



RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANIELA MOURA PARENTE

**REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA PARA ESTIMATIVA
DA QUANTIDADE DE *LEISHMANIA INFANTUM* E INFECTIVIDADE DA SALIVA
DE PACIENTES COM CALAZAR E INFEÇÃO PELO HIV**

Teresina

2015

**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DANIELA MOURA PARENTE

**REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA PARA ESTIMATIVA
DA QUANTIDADE DE *LEISHMANIA INFANTUM* E INFECTIVIDADE DA SALIVA
DE PACIENTES COM CALAZAR E INFECÇÃO PELO HIV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) com vistas à apreciação pela banca como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

Teresina

2015

DANIELA MOURA PARENTE

**REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA PARA ESTIMATIVA
DA QUANTIDADE DE *LEISHMANIA INFANTUM* E INFECTIVIDADE DA SALIVA
DE PACIENTES COM CALAZAR E INFECÇÃO PELO HIV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) com vistas à apreciação pela banca como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Saúde.

A comissão julgadora em sessão pública realizada em 30 de janeiro de 2015 considera a candidata _____

Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa
Orientador

Prof. Dr. Viriato Campelo
1º Examinador

Prof. Dr. Paulo Roberto Ramalho
2º Examinador

Prof. Dr. Fabrício Tapety
3º Examinador

Dr. Vladimir Costa Silva
4º Examinador

Dedico esse trabalho àqueles que representam tudo o que sou e para quem sou, que com seu amor, atenção e carinho me fazem ir sempre além: minha mãe Ivanilde, minhas filhas Maria Catarina e Maria Júlia e minha querida avó Constância Maria.

“Morre lentamente, quem abandona um projeto antes de iniciá-lo, não pergunta sobre um assunto que desconhece ou não lhe responde quando lhe perguntam algo que não sabe. Evitemos a morte em doses suaves, recordando sempre que estar vivo exige um esforço muito maior que o simples facto de respirar. Somente a perseverança fará com que conquistemos um estágio esplêndido de felicidade.” (Pablo Neruda).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus caminhos e nunca me abandonar.

À minha mãe Ivanilde, exemplo de fé e bravura.

Às minhas filhas Maria Catarina e Maria Júlia (na barriga da mamãe), por me fazerem sentir a cada dia o que significa AMOR verdadeiro e me impulsionarem a ser melhor.

À minha avó Constância Maria, por sempre ter estado ao meu lado e nunca deixar de me mostrar o quanto me ama.

Aos meus irmãos Daniel e Dalila pela amizade e companheirismo.

Ao meu marido Elmano Férrer de Almeida Filho, pelo apoio e compreensão com as minhas ausências.

À Universidade Federal do Piauí, responsável por minha formação acadêmica.

À Coordenação do Doutorado RENORBIO, na pessoa da professora Dra. Acelina, pela oportunidade de enriquecimento profissional, pela compreensão e apoio.

Ao meu orientador Prof. Carlos Henrique Nery Costa, por ser um exemplo de profissional a ser seguido; pela dedicação, grandeza humana, incentivo, paciência e apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP), Danielle Zacarias, Jailton, Vladimir, Teresinha, Alexandre, pela amizade e pela valiosa colaboração para a realização deste trabalho.

À Daniela Bandeira, pela importante orientação na análise estatística deste estudo;

Aos meus colegas de doutorado, pelo prazer da convivência e oportunidade de construir novas amizades.

Aos pacientes que aceitaram participar da pesquisa contribuindo de maneira altruísta para a melhoria da saúde de todos.

À Profa. Dorcas Lamounier, pela educação e solicitude.

Agradeço em especial ao professor Dr. Paulo Ramalho, pela sua compreensão, educação e receptividade, que me apoiou nos momentos mais decisivos da minha tese.

A todos meus amigos, que entenderam minha ausência em muitos momentos. Obrigada pelo carinho de vocês.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

PARENTE, D. M. **Reação em cadeia de polimerase quantitativa para estimativa da quantidade de *Leishmania infantum* e infectividade da saliva de pacientes com calazar e infecção pelo HIV.** 2015. 107 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Teresina, 2015

A leishmaniose visceral (LV) é uma das doenças tropicais mais negligenciadas, mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas em todo mundo. O surgimento da pandemia de HIV/AIDS no último quarto de século modificou substancialmente o espectro clínico e epidemiológico da LV. Métodos para o diagnóstico não invasivo podem acelerar o diagnóstico e reduzir a letalidade. O objetivo deste estudo foi investigar a importância da reação em cadeia de polimerase quantitativa para estimativa da quantidade de *Leishmania infantum* e infectividade da saliva de pacientes com calazar e infecção pelo HIV e a correlação da transmissão do parasita com sua presença na saliva. Para tanto, realizou-se estudo transversal que avaliou 64 pacientes distribuídos entre (a) pacientes do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, com LV e com e sem infecção por HIV e (b) pessoas assintomáticas que fizeram o teste anti-HIV e que tiveram o teste anti-*L. infantum* reagente; e 154 pessoas que residiam com pacientes com infecção por *L. infantum*. Foram comparadas as proporções de pessoas com infecção por *L. infantum* entre os grupos domésticos de pessoas com *L. infantum*/HIV e sem HIV, utilizando para esta análise a *Real time* PCR na quantificação do parasita, PCR qualitativa na detecção da *Leishmania* e reação de Montenegro para identificar a transmissão do parasita dos pacientes para seus coabitantes. Os resultados demonstraram associação estatística significativa entre ter pelo menos um coabitante infectado e as variáveis sexo, CD4, carga viral, idade, qPCR saliva e qPCR sangue. Observou-se que a chance de um paciente com carga viral maior que 50 cópias virais/mm³ é 0,9734 vezes maior em relação aos pacientes com carga viral menor que 50 cópias virais/mm³, assim como de ter uma maior carga parasitária na saliva. Verificou-se a prevalência do sexo masculino entre os coinfectados e de pacientes com idades entre 21-45. Encontrou-se um coeficiente de Spearman de 0,64, com valor de $p < 0,001$ na correlação entre a qPCR da saliva com a qPCR do sangue. Os pacientes coinfectados com LV/HIV possuem mediana de 2793,6 parasitas/ml na saliva e mediana de 2302,4 parasitas/ml no sangue, enquanto os pacientes sem HIV e com LV sintomática apresentaram um valor mediano de 1821,2 parasitas/ml na saliva, com média de 10234,4 parasitas/ml e mediana e média de 320,4 parasitas/ml e 2649,6 parasitas/ml respectivamente no sangue, já os pacientes sem HIV e assintomáticos apresentaram valor mediano de 829,2 parasitas/ml na saliva e 43,2 parasitas/ml no sangue. Os pacientes com LV/HIV apresentaram elevada carga parasitária em relação àqueles que possuíam a LV sem HIV, evidenciando a importância da influência do HIV na dinâmica da coinfeção. Os resultados mostraram maior quantidade do parasita na saliva do que no sangue, bem como a utilidade da saliva como método de diagnóstico não invasivo e possível fonte de transmissão do parasita.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. HIV. Transmissão. *Real time* PCR. Saliva. Diagnóstico. Biotecnologia.

ABSTRACT

PARENTE, D. M. **Reação em cadeia de polimerase quantitativa para estimativa da quantidade de *Leishmania infantum* e infectividade da saliva de pacientes com calazar e infecção pelo HIV.** 2015. 107 f. Thesys (Doctorate in Biotechnology) – Graduate Program in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network, Teresina, 2015.

Visceral leishmaniasis (VL) is one of the most neglected tropical diseases, more than 12 million people are infected worldwide. The emergence of the HIV / AIDS in the last quarter century substantially changed the clinical and epidemiological characteristics of VL. Methods for noninvasive diagnosis can accelerate diagnosis and reduce mortality. Investigate the use of polymerase chain reaction quantitatively estimate the amount of *Leishmania infantum* and infectivity of patient saliva with calazar and HIV infection. Therefore, there was cross-sectional study that evaluated 64 patients distributed (1) IDTNP patients with VL and with and without HIV infection and also (2) asymptomatic people who made the HIV testing and have anti-U test. *infantum* reagent; and were also investigated 154 people living with patients infected by *L. infantum*. Proportions were compared to people with *L. infantum* infection among domestic groups of people with *L. infantum* / HIV and HIV without using for this analysis Real time PCR quantification of the parasite, qualitative PCR in the detection of *Leishmania* and reaction Montenegro to identify the transmission of the parasite to her patient cohabiting. The results show statistically significant association between having at least one infected cohabiting and gender, CD4, viral load, age, qPCR and qPCR saliva blood. It was observed that the chance of a patient with a viral load that 50 viral copies / mm³ is 0.9734 times higher compared to patients with lower viral load than 50 viral copies / mm³, as well as having a higher parasite load in saliva. There was a prevalence of males among coinfecting patients and aged 21-45. Found a Spearman correlation coefficient of 0.64, with p <0.001 for correlation between qPCR saliva with qPCR blood. Patients coinfecting with VL / HIV have median 2793.6 parasites / ml saliva and median 2302.4 parasites / ml in the blood, while patients without HIV and symptomatic VL had a median value of 1821.2 parasites / ml in saliva, averaging 10234.4 parasites / ml and median and average of 320.4 parasites / ml and 2649.6 parasites / ml respectively in the blood, as patients without HIV and asymptomatic presented median value of 829.2 parasites / and 43.2 ml saliva parasites / ml in the blood. Patients with VL / HIV showed high parasite load in comparison to those with the VL without HIV, highlighting the importance of the influence of the dynamics of HIV coinfection. The results showed a higher amount of the saliva of the parasite in the blood, and saliva useful as a noninvasive diagnostic method and a possible source of transmission of the parasite.

Keywords: Visceral leishmaniasis. HIV. Transmission. Real time PCR. Saliva.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
CD4	Linfócitos T CD4
cPCR	Reação em cadeia de polimerase convencional
DAT	Teste de aglutinação direta
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
hab.	Habitantes
HAV	Hepatite A
HBV	Hepatite B
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IDTNP	Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgG	imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
LC	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
OMS	Organização Mundial de Saúde
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
PCR	Polymerase Chain Reaction
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rRNA	RNA ribossômico
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL (LV): UMA VISÃO GERAL	15
2.1.1 Visão Geral	16
2.1.2 Vetores e Reservatórios	17
2.1.3 Aspectos Epidemiológicos	19
2.1.4 LV no Piauí	20
2.2 AIDS E LV: O PANORAMA DA COINFECÇÃO	21
2.3 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO HUMANA	24
2.3.1 Diagnóstico Clínico	24
2.3.2 Diagnóstico Laboratorial	25
2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	28
2.5 REAÇÃO DE MONTENEGRO	30
2.6 LEISHMANIOSE VISCERAL: NOVOS MEIOS DE DIAGNÓSTICO	31
2.7 SALIVA.....	32
3 REFERÊNCIAS	36
4 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE	47
4.1 ARTIGO 1: TRANSMISSÃO DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> ATRAVÉS DA SALIVA DE PACIENTES INFECTADOS.....	47
4.2 ARTIGO 1: REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA PARA ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	63
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
APÊNDICES	86
APÊNDICE A - DADOS ADICIONAIS DO ARTIGO 1	87
APÊNDICE B - DADOS ADICIONAIS DO ARTIGO 2	90
ANEXOS	Erro! Indicador não definido.
ANEXO A - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DOS ARTIGOS 1 E 2: JOURNAL OF INFECTION CONTROL (JCR 2013: 2,731)	Erro! Indicador não definido.
ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1	Erro! Indicador não definido.
ANEXO C - COMPROVANTE DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1	Erro! Indicador não definido.

ANEXO D - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2..... Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) está entre as seis doenças mais importantes causadas por protozoários no mundo, devido a sua incidência, alta mortalidade em indivíduos não tratados e crianças desnutridas e emergência em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (SANTOS, L., et al., 2009). Os dados da mortalidade relatados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) registraram 57.000 mortes no mundo devido à leishmaniose visceral em 1999 e 41.000 em 2000; entretanto, estes números são apenas estimativas, pois a notificação da doença só é obrigatória em 32 dos 88 países onde a LV é encontrada (WHO, 2000, 2001, 2011).

O surgimento da pandemia de HIV e da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) no último quarto de século modificou substancialmente o espectro clínico e epidemiológico da leishmaniose visceral (SANTOS, L., et al., 2009). Desde 1985, quando De la Loma et al. (1985) publicaram o primeiro caso de LV associada ao HIV, tem sido notado um aumento da notificação de novos casos e de novas áreas, já se tendo registrado a coinfeção com *Leishmania* sp. em 35 países de quatro continentes (GELANEW et al., 2011; COTA et al., 2013).

O aumento do número de casos pode ser atribuído à expansão da superposição da infecção por HIV e pelas leishmanias viscerotrópicas (CUNHA et al., 2013). No resto do mundo, esta superposição foi de infecção urbana por HIV com áreas rurais de leishmaniose, pois tem havido expansão suburbana, devido ao aumento populacional, para áreas onde estão presentes os flebotomíneos vetores. Contudo, na Europa e no Brasil, a doença assume um caráter diferente. Na Europa, a transmissão dos dois patógenos parece ser urbana mediada, pois ambos são transmitidos pela mesma via intravenosa de usuários de drogas. Já no Brasil, a transmissão é vetorial e não está restrita às áreas rurais, uma vez que a LV urbanizou-se (BRASIL, 2006).

Até o presente momento, a maior prevalência da coinfeção HIV/*Leishmania* tem sido na bacia do Mediterrâneo, pois mais dos 90% dos 2.000 casos notificados à OMS é procedente da Espanha, Itália, França e Portugal (GELANEW et al., 2011). Desde o início da epidemia de AIDS até a era da terapêutica antiretroviral altamente eficiente (HAART), de 25% a 70% de todos os casos de LV nestes países estavam associados com infecção pelo HIV e pode ser previsto que até 1,5-9% dos pacientes com AIDS sofrerão um episódio de LV, tanto como uma nova infecção como por reativação de uma infecção latente. A infecção pelo HIV pode aumentar o risco de desenvolvimento de leishmaniose em 100-2000 vezes

(SANTOS, L., et al., 2009; COTA; SOUSA; RABELLO, 2011).

A vasta maioria dos casos da América é do Brasil, onde a incidência de casos novos de HIV/AIDS chegou a 17,2/100 mil habitantes em 2005. Atualmente, ainda há mais casos da doença entre os homens do que entre as mulheres, mas essa diferença vem diminuindo ao longo dos anos. Esse aumento proporcional do número de casos de AIDS entre mulheres pode ser observado pela razão de sexos (número de casos em homens dividido pelo número de casos em mulheres). Em 1989, a razão de sexos era de cerca de 6 casos de AIDS no sexo masculino para cada 1 caso no sexo feminino. No ano de 2012, foram notificados 39.185 casos de AIDS no Brasil. Este valor vem mantendo-se estável nos últimos cinco anos. A taxa de detecção nacional foi de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes. A maior taxa de detecção foi observada na Região Sul, 30,9/100.000 habitantes, seguida pelas regiões Norte (21,0), Sudeste (20,1), Centro-Oeste (19,5) e Nordeste (14,8) (BRASIL, 2013).

O crescimento da epidemia ainda é pronunciado nas demais áreas do País. A epidemia vem atingindo, também, de maneira importante, os indivíduos com menor escolaridade e de cidades menores (CHEQUER et al., 2005). Até junho de 2003, quase 100 casos de coinfeção de HIV com espécies de *Leishmania* haviam sido notificados no País. A LV foi responsável por 37% destes casos. Ao contrário da Europa, a maior parte dos casos do Brasil não era de pacientes com usuários de drogas (DESJEUX; ALVAR, 2003).

Os primeiros seis casos de coinfeção do Piauí foram registrados em 1995; destes seis pacientes, cinco eram residentes em Teresina. As características clínicas eram similares aos dos pacientes sem HIV, mas havia mais recrudescências e os pacientes eram mais velhos. Em 2005, levantamento realizado de casos datados até 2003 revelou a presença de 48 casos (COSTA et al., 2009). Em 2012, Teresina possuía 31,6 casos de AIDS para cada 100.000 habitantes (BRASIL, 2013).

Embora a distribuição geográfica de infecção por *Leishmania* esteja limitada às áreas de distribuição de vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, a infecção pelo HIV modificou os padrões de transmissão zoonóticos e antroponóticos. O baixo nível de sucesso terapêutico, os altos níveis de parasitemia e a elevada proporção de recrudescências em pacientes com HIV, assim como as atípicas manifestações da doença, que complicam o diagnóstico e as dificuldades destes pacientes de acesso a recursos de saúde, significam que os pacientes coinfectados aumentam o número de reservatórios humanos em áreas de transmissão antroponótica e podem ajudar a criar novos focos de transmissão antroponótica em áreas onde a transmissão de LV tem sido tradicionalmente zoonótica (CUNHA et al., 2013).

Mais de 50% dos pacientes coinfectados exibem amastigotas no sangue periférico, que é raro em pacientes imunocompetentes (CUNHA et al., 2013). Desta forma, existe uma grande possibilidade de que a epidemiologia da LV esteja sendo modificada em áreas de transmissão vetorial a partir de pessoas com HIV, e pode ajudar a explicar a surpreendente entrada da LV em áreas centrais de cidades com boa infraestrutura urbana e ajudar a desenhar novas estratégias de controle desta surpreendente e desafiadora doença.

O verdadeiro impacto da coinfeção LV/HIV é subestimado na escala global devido a deficiências nos sistemas de vigilância sanitária. O fato de a leishmaniose não estar incluída como doença definidora de AIDS contribui para essa escassez de informação (SANTOS, L., et al., 2009; COTA; SOUSA; RABELLO, 2011).

O diagnóstico de LV em pacientes com HIV é difícil, uma vez que os pacientes apresentam sinais não específicos de LV e os sintomas podem ser parecidos com os de outras doenças oportunistas (LACHAUD et al., 2000; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013). A LV em pacientes com AIDS pode representar um enigma para clínicos pouco experientes, principalmente se a AIDS for diagnosticada primeiro ou se os seus sintomas também estiverem presentes (GELANEW et al., 2011).

Febre, anemia e hepatoesplenomegalia são comuns em outras infecções oportunistas e em efeitos colaterais de outras drogas anti-HIV. O retardo no diagnóstico pode aumentar a chance de morte, seja por sangramento ou por infecções adicionais, uma vez que a LV também é uma doença que predispõe a infecções bacterianas oportunistas. Assim, o reconhecimento da prevalência da associação de ambas as doenças é fundamental para se reduzir a letalidade das duas entidades mórbidas (BUALERT et al., 2012).

Contudo, outro aspecto normalmente não relevado é a transmissão inter-humana de LV. Pessoas com LV sintomática transmitem o parasita e podem representar fontes de infecção não negligenciáveis de *L. infantum*. A chegada do HIV/AIDS reforçou este aspecto, pois as pessoas que têm imunodeficiência suportam grande carga de parasitas e infectam facilmente os vetores; e podem representar um importante contingente de reservatórios de parasitas (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010; COTA; SOUSA; RABELLO, 2011).

Por se tratar de uma doença que, historicamente, tem acometido populações muito pobres, de regiões desfavorecidas e politicamente pouco expressivas, ainda permanecem muitas questões mal compreendidas relacionadas à mesma; entre elas estão as causas das diferentes apresentações clínicas, da fisiopatologia das complicações fatais, a importância dos reservatórios vertebrados não humanos na transmissão para seres humanos, a existência de ciclo silvestre de *L. infantum* e sua relação com o ciclo doméstico, a explicação para a

ocorrência de epidemias, a dinâmica da transmissão, a ausência de métodos diagnósticos de alta eficiência, de terapêutica de ação rápida e da ausência de vacinas (ALVAR et al., 2008; SANTOS, L., et al., 2009). Muitas respostas para estas questões podem advir do estudo da epidemiologia molecular dos parasitas.

A PCR em tempo real - reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) -, uma variante da PCR convencional - Polymerase Chain Reaction (PCR) -, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica (SILVA et al., 2010; ALONSO et al., 2010; SUDARSHAN et al., 2011; FERREIRA et al., 2013). A associação de PCR com técnicas de amostras não invasivas representa um grande potencial para contribuir com o diagnóstico de LV (FERREIRA et al., 2013).

Hodiernamente, apenas estudos que abordaram a infectividade para o vetor de pacientes com a coinfeção foram desenvolvidos, mas nenhum comparou as pessoas com *L. infantum* sem HIV. Ainda não foi verificado se as pessoas que convivem com indivíduos coinfectados com HIV/*L. infantum* estão em maior risco de adquirir infecção por *L. infantum* do que aquelas que convivem com pessoas com *L. infantum* sem HIV. Isto torna este estudo absolutamente inédito e habilitado a dar uma importante resposta epidemiológica com grandes implicações clínicas.

O panorama da coinfeção, com resultado terapêutico deficiente, o alto índice de recaída, o poliparasitismo de LV em pessoas infectadas pelo HIV, bem como as manifestações atípicas da doença e o acesso deficiente aos recursos de saúde tornam os indivíduos infectados pelo HIV propensos a ampliar o número de reservatórios humanos (PAREDES; LAGUNA; CLOTET, 1997; COSTA et al., 2000; CHAPPUIS et al., 2007).

A posse de tal rico e vasto material é de suma importância para o futuro, pois não se pode perder de vista que, de longe, a maior parte dos casos de infecção por *L. infantum* é originária do Brasil. Esta posse pode não só ter enorme potencial explicativo, como vir a identificar valiosos bioprodutos para o diagnóstico, para alvos terapêuticos e para o desenvolvimento de vacinas. Este potencial realça a importância da conservação dos isolados de *L. infantum* em território nacional, uma vez que corresponde a importantíssimo patrimônio genético que poderá resultar em soluções biotecnológicas de elevado valor médico, social e econômico.

Assim, o objetivo geral desta tese foi investigar a importância da reação em cadeia de polimerase quantitativa para estimativa da quantidade de *Leishmania infantum* e da

infectividade da saliva de pacientes com calazar e infecção pelo HIV, mediante os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar a PCR em tempo real como indicador de carga parasitária de *L. infantum* no sangue periférico e na saliva;
- b) investigar a possibilidade de transmissão de *L. infantum* através da saliva;
- c) estudar a saliva como importante amostra biológica para investigação diagnóstica em doenças infecciosas;
- d) avaliar a infecção com HIV como fator de risco para a transmissão de *L. infantum*;
- e) descrever as características demográficas dos pacientes infectados pela *L. infantum* e pelo HIV.

Para tanto, realizou-se estudo transversal que avaliou 64 pacientes entre (a) pacientes do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP) com LV e com e sem infecção por HIV e (b) pessoas assintomáticas que fizeram o teste anti-HIV e que tiveram o teste anti-*L. infantum* reagente. Também foram investigadas 154 pessoas que residiam com pacientes com infecção por *L. infantum*. Foram comparadas as proporções de pessoas com infecção por *L. infantum* entre os grupos domésticos de pessoas com *L. infantum*/HIV e sem HIV utilizando para essa análise a *Real time* PCR na quantificação do parasita, PCR qualitativa na detecção da *Leishmania* e reação de Montenegro para identificar a transmissão do parasita dos pacientes para seus coabitantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL (LV): UMA VISÃO GERAL

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas, mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas em todo mundo, 2 milhões de casos novos aparecem a cada ano e 350 milhões de pessoas são consideradas em situação de risco em relação à doença. Duas formas clínicas básicas são conhecidas: a leishmaniose tegumentar (LC), uma doença estigmatizante e desfigurante e a LV, ou calazar, que é fatal quando não tratada (SANTOS, L., et al., 2009).

A LV, ou calazar, é uma protozoonose de evolução lenta, grave, fatal quando não tratada e alcança letalidade entre 10% e 98% em casos tratados inadequadamente e não tratados, respectivamente (DESJEUX, 2004). Segundo Lainson e Shaw (1987), é causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. Conforme Roselino et al. (2008), na América, a *L. (L.) chagasi*, transmitida pelo vetor *Lutzomia longipalpis* pode ser considerada sinônimo de *Leishmania infantum*, embora alguns autores considerem espécies distintas.

A LV foi observada e descrita primeiro na Índia. Trata-se de uma doença endêmica e sujeita a ciclos epidêmicos, atingindo principalmente os jovens, sem, entretanto, poupar os demais grupos etários (DEANE, 1956; MAGILL, 1995; LUKES et al., 2007).

De acordo com Veronesi e Focaccia (2004), a LV classifica-se de acordo com seu espectro na infecção pela *L. infantum* em: infecção assintomática, infecções oligossintomáticas, formas agudas e calazar clássico. Clinicamente, a leishmaniose visceral apresenta-se como uma enfermidade generalizada, crônica, caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo, levando à caquexia e, até mesmo, ao óbito (BADARÓ, 1996; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

Em geral, é uma doença de evolução prolongada. O paciente apresenta um quadro de desnutrição protéico-calórica, aspecto edemaciado, alterações de pele, cabelos quebradiços e cílios alongados. Nos últimos anos, a letalidade da leishmaniose visceral vem aumentando gradativamente, passando de 3,6%, em 1994, para 6,7%, em 2003, com um incremento de 85%, e para 8,4% em 2004 (BRASIL, 2006). A LV é considerada como uma doença associada a pobreza, desnutrição, deslocamento, condições precárias de habitação,

analfabetismo, discriminação de gênero, debilidade do sistema imunológico e falta de recursos (WHO, 2009).

No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas cerca de 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos (GUIMARÃES, 1945; GONTIJO; MELO, 2004). Em alguns focos estudados existe a possibilidade de modificação na distribuição de casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (SILVA et al., 2000).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de doença clínica são apenas parcialmente compreendidos. Alguns estudos sugerem que a suscetibilidade à LV pode ser determinada geneticamente (JERONIMO et al., 2007); outros colocam a desnutrição como importante fator de risco às crianças (DYE; WILLIAMS, 1993); outros estudos ainda apontam os jovens do sexo masculino, a presença de animais na vizinhança (OLIVEIRA et al., 2010), pessoas que vivem em casas com um sistema inadequado de esgoto e coleta de resíduos (COSTA, et al, 2005) e de residência localizadas em favelas urbanas ou em áreas com vegetação como fatores de risco verde (WERNECK et al., 2002).

O agente etiológico da LV, sua biologia molecular e susceptibilidade antimicrobiana são estudados há bastante tempo, o que possibilitou uma série de avanços em taxonomia, genética, biologia molecular e comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor da *L. infantum* no Brasil. A resposta imune do hospedeiro e as suas implicações para o diagnóstico, tratamento e prevenção da LV também foram investigados. Muitos aspectos da ecoepidemiologia da doença foram descobertos nos últimos 20 anos, e estes têm sido utilizados para o desenvolvimento de novas medidas de controle (DANTAS TORRES; BRANDÃO FILHO, 2006).

2.1.1 Visão Geral

No Brasil, o agente etiológico da LV é a *L. chagasi*, espécie idêntica à *L. infantum* encontrada no Mediterrâneo e na Ásia, e apresenta duas formas: a amastigota, que é obrigatoriamente parasita intracelular em vertebrados, e a forma promastigota, que se desenvolve no tubo digestivo dos vetores invertebrados e em meios de culturas (FUNASA, 2004). Quando as fêmeas do flebótomo realizam o repasto sanguíneo, elas introduzem as formas promastigotas na pele do hospedeiro, onde o protozoário é fagocitado pelos macrófagos da pele, e dentro de 12-24h após a inoculação, as formas promastigotas se transformam em amastigota. Depois da mudança de forma, as amastigotas multiplicam-se e

rompem o macrófago, liberando-se para infectar novos macrófagos. Este estágio é crônico e pode continuar por meses a anos e até mesmo por toda a vida sem que o hospedeiro apresente sintomatologia evidente, dependendo de sua susceptibilidade e estado imunológico (SHARMA; SINGH, 2008).

Até recentemente, o grau de diversidade genética da *L. infantum* brasileira não foi completamente investigado. Dois estudos identificaram um baixo grau de variabilidade genética entre isolados de *L. infantum* de humanos de distintas regiões do País (ALONSO et al., 2010; SEGATTO et al., 2011; BATISTA et al., 2012).

O gênero *Leishmania* pertence ao reino Protista, filo Euglenozoa e à família Trypanosomatidae (SINGH; DEY; SIVAKUMAR, 2005). Estes protozoários se caracterizam pela presença de uma estrutura circular denominada de cinetoplasto, composto por milhares de moléculas de DNA circular formando uma rede concatenada. Cada cinetoplasto é composto por 25-250 maxicírculos de aproximadamente 30kb e de 5.000-10.000 minicírculos de cerca de 2kb cada. Juntos eles formam o genoma mitocondrial (SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

Penna (1934) encontrou a presença de *Leishmania* em fragmentos de fígado humano, colhidos *post-mortem*, por viscerotomias de indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste. Em seguida, Chagas e cols., entre 1936 e 1939, diagnosticaram o primeiro caso humano de LV *in vivo* no Brasil e demonstraram a doença em cães, sugerindo o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* como provável vetor; nomearam o parasito *Leishmania infantum* (CHAGAS; CHAGAS, 1938).

2.1.2 Vetores e Reservatórios

Segundo Guimarães (1945), a doença seria predominantemente rural e semelhante à LV Mediterrânea, por ser mais frequente em cães, que poderiam servir de fonte de infecção para os vetores devido ao seu intenso parasitismo dérmico. Pensava-se que a transmissão deveria ser feita por *Lu. longipalpis*, mas que possivelmente haveria também outras espécies vetoras (BICHAUD et al., 2011; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

O *habitat* natural da *Lu. longipalpis* são as matas, florestas secundárias e áreas de rochas alcárias. Entretanto, adaptam-se facilmente a viverem perto das habitações (DIAS et al., 2007; BICHAUD et al., 2011) nas zonas pobres, explorando o acúmulo de matéria orgânica produzida pelos animais domésticos e pelas más condições sanitárias, o que pode facilitar a transmissão da doença (COSTA; TAPETY; WERNNECK, 2007). A fêmea

deposita seus ovos nas tocas de alguns roedores, na casca de árvores velhas, em edifícios destruídos, nas rachaduras das paredes das casas, em abrigos de animais e no lixo doméstico. Em tais ambientes, as larvas podem encontrar matéria orgânica, calor e umidade que são necessários para o seu desenvolvimento (SHARMA; SHING, 2008).

O ciclo biológico da *Lutzomyia longipalpis* se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estágios), pupa e adulto. A principal forma de transmissão se faz a partir da picada dos flebótomos (*Lu. longipalpis*) ao sugarem o sangue dos hospedeiros vertebrados, ingerindo macrófagos parasitados com as formas amastigotas da *Leishmania*. Após 8 a 20 dias do repasto, as formas amastigotas dos hospedeiros vertebrados evoluem no tubo digestivo dos insetos, transformando-se em promastigotas procíclicos e finalmente em promastigotas metacíclicos aptos a infectar outros hospedeiros vertebrados. Recentemente, incriminou-se também a *Lu. cruzi* como vetor em foco no estado de Mato Grosso do Sul (SANTOS, S., et al., 1998; FREITAS et al., 2012).

Os hospedeiros silvestres da *L. infantum* até agora conhecidos são as raposas e os marsupiais. Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas no Brasil: *Lycalopex vetulus*, no Ceará (DEANE, 1956), e *Cerdocyus thous*, no Pará (LAINSON et al., 1990) e em Minas Gerais (SILVA, E. et al., 2000). A *L. infantum* foi isolada em marsupiais do gênero *Didelphis* na Bahia (SHERLOCK et al., 1984) e no Rio de Janeiro (CABRERA, 2003). A raposa-do-mato foi incriminada como o principal reservatório de infecção *L. infantum* no Brasil e na Venezuela. Em geral, as taxas de infecção comparadas ao cão doméstico são baixas, mas, por vezes, podem ser elevadas, como observado em raposas da América do Sul. No entanto, canídeos selvagens não vivem perto de ou em habitação humana e, portanto, eles têm uma importância secundária na epidemiologia da LV (LAINSON; SHAW, 1987; DEANE, 1956). No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, sendo um dos alvos nas estratégias de controle (COSTA et al., 2000; COSTA et al., 2002; DINIZ et al., 2008; AGUIAR-SOARES et al., 2014). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. Deane (1956), através de biópsias, verificou a grande riqueza do parasitismo da pele na maioria dos animais estudados (cães e raposas). Em outro estudo, foi comprovado que os gatos também podem ser reservatórios domésticos de *L. infantum*; recentemente, foram encontrados gatos capazes de transmitir a *L. infantum* a um vetor, o *Phlebotomus perniciosus* (GOUZELOU et al., 2013).

Embora os cães clinicamente afetados sejam mais propensos a infectar flebotomíneos, aqueles que são subclínicamente infectados e os soronegativos também podem transmitir a *Leishmania* e contribuir para a manutenção do parasita (GOUZELOU et al., 2013).

Além do cão doméstico e de canídeos silvestres, sugere-se que o homem pode ser fonte de infecção de *L. infantum* (COSTA et al., 2000; COSTA et al., 2002). A existência de infecção assintomática entre pessoas saudáveis em áreas endêmicas e as transmissões do parasita através de transfusão de sangue em humanos têm sido relatadas (RIERA et al., 2004; MATHUR; SAMANTARAY, 2004; SINGH; DEY, 2005, bem como através de transmissão congênita (MURRAY et al., 2005) e através de transplantes de órgãos (MORALES et al., 2003; BARSOUM, 2006). No homem, além do sangue periférico, a pele humana também foi investigada como fonte de infecção para o inseto transmissor (PRATA; PIVA, 1956).

2.1.3 Aspectos Epidemiológicos

A LV está largamente distribuída pelo mundo (ARORA et al., 2008; LEIFSO et al., 2007; SALOTRA et al., 2003). Atualmente, a LV afeta cerca de 88 países, países desenvolvidos e em desenvolvimento, e é endêmica em 62 países. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem em cinco países: Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (MAGILL, 1995; DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO 2004;). Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas estão atualmente infectadas. A OMS possui três programas de controle de leishmaniose, um dos programas é na região das Américas para reforçar o controle e a vigilância da LV, que inclui o mapeamento da doença em 14 países e o controle do avanço da doença no Brasil, na Argentina e no Paraguai (WHO, 2011).

Nas últimas duas décadas, a LV reapareceu mundialmente de forma preocupante, tendo sido apontada como doença reemergente, que atinge principalmente crianças e adultos jovens (EVANS et al., 1989; COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; ALVES; BEVILACQUA, 2004). No Brasil, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades e, além disso, a doença tem acometido pessoas jovens ou com comorbidades (MAGILL, 1995; BRASIL, 2006).

A LV se tornou um problema de saúde pública em muitos países, levando muitas pessoas a óbito. Segundo Magill (1995), a epidemia de LV no sul do Sudão, em meados dos anos 1980, foi responsável por 40 mil mortes e por um aumento de 400 mil pessoas expostas ao risco de infecção.

No Brasil, também em meados dos anos 1980, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV. A doença, antes restrita às áreas rurais do Nordeste, avançou para outras regiões indenes, alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos. Mais de 3 mil casos são relatados por ano em 19 dos 27 estados brasileiros e já foram registrados casos autóctones de LV (BRASIL, 2001; ALONSO et al., 2010). Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LV somaram 48.455, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, do Ceará, do Maranhão e do Piauí. Nos últimos 10 anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência é de dois casos para 100.000 habitantes (hab.) No Nordeste concentra-se 70-90% dos casos da doença encontrados em todo o País, com uma incidência de 25 casos a cada 100 mil hab. (ALONSO et al., 2010).

Nos últimos 10 anos, também, surtos da doença ocorreram no Rio de Janeiro (RJ), em Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, ocorreram epidemias nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO), demonstrando a faceta da periurbanização e urbanização da LV (REY et al, 2005; BRASIL, 2006; BATISTA et al., 2012).

No Brasil, modificações ambientais associadas aos movimentos migratórios e ao processo de urbanização podem explicar, em parte, porque a LV, uma doença anteriormente restrita à zona rural, passou a ocorrer de forma endêmica e epidêmica nos grandes centros do Nordeste (MENDES et al., 2002). O desmatamento, a construção de barragens, os novos sistemas de irrigação também contribuem para a expansão e o aumento substancial do número de casos de leishmanioses (WHO, 2011).

2.1.4 LV no Piauí

No Piauí, a epidemia de LV iniciou em 1980, com 16 casos registrados, atingindo o ápice no ano de 1985, com 339 casos. Em Teresina, a epidemia começou no ano de 1981, com registro de 55 casos derivados principalmente de bairros novos e favelas (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990). A incidência de LV declinou depois de 1985 na cidade de Teresina, mas uma nova epidemia ainda maior ocorreu entre 1993 e 1995 (WERNECK et al., 2002).

Segundo Nascimento et al. (2005), as condições sócio-econômicas, ambientais e hábitos de vida são fatores significativos na epidemiologia da LV em áreas endêmicas. Tais condições podem contribuir para a perpetuação da doença em áreas rurais e periurbanas,

acometendo a população com baixo nível sócio-econômico e que vivem em condições precárias de moradia.

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível, de um reservatório e de um hospedeiro susceptível. A possibilidade de que o homem, principalmente crianças desnutridas, venha a ser fonte de infecção pode conduzir a um aumento na complexidade da transmissão da LV (GONTIJO; MELO 2004). A má nutrição é complexa, envolvendo a deficiência de proteínas e vários nutrientes, e pode estar relacionada a uma queda de imunidade e ao aumento do risco de várias infecções (ANSTEAD et al., 2001).

Com a expansão da área de abrangência da doença e o aumento significativo do número de casos, a LV passou a ser considerada pela OMS uma das prioridades dentre as doenças tropicais (MAGILL, 1995).

2.2 AIDS E LV: O PANORAMA DA COINFECÇÃO

Um aspecto preocupante da LV é a sua emergência como infecção oportunista em pacientes com AIDS, particularmente nos países da Europa Mediterrânea, onde têm aparecido muitos casos de LV em áreas endêmicas, o que tem acontecido também em outros países da África, na Índia e no Brasil (MAGILL, 1995; LACHAUD et al., 2000; SANTOS, L., et al., 2009).

Dastry et al. (1990) encontraram casos atípicos de LV em pacientes com AIDS com a presença de amastigotas na mucosa do duodeno e do estômago. Esse fato é uma característica do comportamento oportunista da LV. A *L. donovani* pode ser disseminada ou permanecer localizada sem lesão na pele.

O diagnóstico de LV em pacientes com HIV é difícil, uma vez que os pacientes apresentam sinais não específicos de LV e os sintomas podem ser parecidos com os de outras doenças oportunistas (LACHAUD et al., 2000; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

A AIDS se desenvolve em indivíduos cujo sistema imunológico não consegue controlar a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), levando a redução na contagem de linfócitos T CD4 (CD4). Infecções oportunistas que não são comumente observadas na população saudável, como a tuberculose, infecções por fungos e pneumonia por *Pneumocystis carinii* são comuns em pacientes com AIDS (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1993).

Desde que a AIDS foi descrita pela primeira vez, há mais de 25 anos, avanços científicos têm expandido significativamente a compreensão do sistema imunológico. Após a libertação inicial de viremia durante a infecção primária, os indivíduos infectados pelo HIV montam uma resposta imune forte que geralmente reduz os níveis de viremia plasmática, atrasando em média de 10 anos o desenvolvimento da doença clinicamente aparente (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010).

Desde o início da década de 1980 até junho de 2009, foram notificados ao Ministério da Saúde 544.846 casos de AIDS no Brasil. Desse total, 323.069 (59%) encontram-se na região Sudeste, embora se observe a disseminação da doença por outras áreas, inclusive áreas rurais (BRASIL, 2011).

Novos aspectos imunopatológicos da LV têm sido associados com o vírus da imunodeficiência humana adquirida e vários casos de coinfeção têm sido relatados em países da África e da Europa (OLIVEIRA et al., 2010). O desenvolvimento da pandemia HIV/AIDS tem modificado a dinâmica e a abrangência da LV nesses últimos 20 anos nos aspectos clínicos e epidemiológicos (ALVAR et al., 2008; SANTOS, L. et al., 2009). Infecção por HIV aumenta o risco de desenvolvimento de LV em 100 a 2.320 vezes, em áreas endêmicas. Por outro lado, a LV promove a progressão clínica da doença de HIV e o desenvolvimento de condições associadas à AIDS (ALVAR et al., 2008; SANTOS, L. et al., 2009).

Vários casos de pacientes coinfectados têm sido descritos em áreas endêmicas de *L. infantum*. Nos pacientes com HIV, a associação com a LV tem acelerado a progressão da doença e suas manifestações de maneira mais agressiva (SINHA; PANDEY; BHATTACHARYA, 2005). Grande parte dos pacientes com a coinfeção LV/HIV apresentam sintomas clássicos da LV. Alguns apresentam disseminação atípica da doença, disseminação parasitária na pele, curso crônico e recidivante da doença, resposta deficitária aos medicamentos e carência de anticorpos anti-Leishmania; esses sinais e sintomas atípicos são mais comuns em pacientes HIV/positivos (MOLINA et al., 2003; GELANEW et al., 2011; SOUZA et al., 2012; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

Globalmente, a maioria dos casos de leishmaniose acontece na população HIV-negativo, onde é considerada principalmente uma doença da infância, no entanto, a associação de infecção por Leishmania e HIV resultou numa alteração significativa na idade da população em risco, levando a um maior número de casos em pessoas com idade entre 31-50 anos (DESJEUX; ALVAR, 2003; CRUZ et al., 2006; BUALERT et al., 2012).

A coinfeção LV/HIV está emergindo como um novo padrão de doença e tornando-se cada vez mais frequente. Desde meados da década de 1980, quando o primeiro caso de

coinfecção Leishmania/HIV foi relatado, a incidência de coinfecção tem aumentado e, no final dos anos 1990, tinha sido relatada em 35 países (WHO, 2001; ALVAR et al., 2008). Do ponto de vista epidemiológico global, duas tendências paralelas são alarmantes: a ruralização da pandemia do HIV e a urbanização e propagação da LV (DESJEUX; ALVAR, 2003; RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003).

Mais de 2.000 casos de coinfecção HIV/LV em 34 países foram notificados à OMS até 2001 - a maioria na Espanha, na Itália, na França e em Portugal. Desses casos, a maioria em adultos jovens e usuários de drogas endovenosas (BRASIL, 2004; SINHA; PANDEY; BHATTACHARYA, 2005). Em países do Mediterrâneo, até 70% ou mais dos casos de LV em adultos estão associados à infecção pelo HIV; destes, 50% a 90% são usuários de drogas intravenosas. Nos países mediterrânicos, 27.000 novas infecções de HIV foram diagnosticadas em 2012, correspondendo a taxas de 6,6 por 100.000 pessoas (WHO, 2013).

A maioria dos casos de coinfecção na América do Sul se concentra no Brasil, área endêmica para LV, onde a incidência de casos de HIV aumentou de 0,8 casos/100.000 hab., em 1986, para 10,5 casos/100.000 hab., em 1997 (RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003; SOUZA et al., 2012). Os casos de coinfecção surgiram inicialmente no Nordeste, sendo que a maior parte das pessoas coinfetadas eram adultos com idade média de 37,3 anos, enquanto a LV normalmente ocorre em crianças (NASCIMENTO et al., 2011). No Brasil, 2% dos casos de LV relatados no período 2001-2005 foram coinfetados com HIV, mas é importante notar que, ao contrário do que é observado no sul da Europa, a LV representa apenas 37% de todas as formas clínicas da doença entre casos de coinfetados, já a leishmaniose mucocutânea pode ser vista em pelo menos 43% dos pacientes HIV/positivos (ALVAR et al., 2008).

Como descrito por Nuno et al. (2007), na coinfecção LV/HIV, a dúvida entre uma infecção primária e uma reativação é constante, uma vez que, desde o início, pode se tratar de uma infecção primária por Leishmania favorecida pela imunossupressão da infecção pelo vírus ou, de igual modo, de uma infecção latente por Leishmania que é reativada pela depleção imunológica (CUNHA et al., 2013). A LV promove a progressão clínica e o desenvolvimento de condições definidoras de AIDS, aumentando a mortalidade dos doentes infectados por HIV. O vírus pode revogar as respostas imunes celulares eficazes durante a infecção natural e pode estar associado com a reativação da LV em indivíduos previamente assintomáticos através da redução da atividade leishmanicida de macrófagos (ALVAR et al., 2008). A coinfecção com o HIV reduz *in vitro* respostas de citocinas Th1 e celulares para Leishmania e aumenta respostas de citocinas Th2 (DONAGHY et al., 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; SANTOS, L. et al., 2009).

Infecção por HIV pode aumentar o risco de desenvolvimento de LV em 10-100 vezes em áreas endêmicas. É possível que o parasita na forma amastigota possa induzir à replicação de vírus HIV-1 em macrófagos e facilitar a interação com célula hospedeira (GUERIN, 2002). A LV acelera a progressão da infecção pelo HIV para AIDS e diminui as taxas de sobrevivência destes pacientes. A interação entre essas duas doenças tem consequências terríveis, com a mortalidade cinco vezes maior em pacientes coinfetados (PINTADO; LOPES-VELEZ, 2001; ALVAR et al., 2008).

O diagnóstico é muito difícil, pois apenas 40-50 por cento dos casos de coinfetados com LV/HIV têm sorologia para leishmania positiva. Esta porcentagem é inversamente proporcional à depleção de células T CD4. Há uma redução de 50 vezes menos de anticorpos anti-Leishmania em pacientes HIV-positivos em relação aos pacientes HIV negativo. Portanto, pode haver diversos testes sorológicos com falsos negativos (MARY et al., 1992; MEDRANO et al., 1998). Isso favorece o diagnóstico parasitológico através da medula óssea ou aspirados de baço. Segundo Desjeux (2004) e Cruz et al. (2006), a contagem de linfócitos T CD4 é inferior a 200 células/mm³ em 62-92% dos pacientes coinfetados e inferior a 50 células/mm³ em 42% deles.

O panorama da coinfeção, com resultado terapêutico deficiente, alto índice de recaída, poliparasitismo de LV em pessoas infectadas pelo HIV, bem como as manifestações atípicas da doença e o acesso deficiente aos recursos de saúde tornam os indivíduos infectados pelo HIV propensos a ampliar o número de reservatórios humanos (COTA et al., 2013).

2.3 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO HUMANA

2.3.1 Diagnóstico Clínico

Muitas entidades clínicas podem ser confundidas com a LV, como, por exemplo, doença de Chagas, malária, esquistossomose, febre tifóide, tuberculose, leucemia e lúpus eritematoso, o que dificulta o diagnóstico clínico. Pacientes com LV apresentam febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, leucopenia, anemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia. Sangramento é incomum no início, porém, podem ocorrer manifestações hemorrágicas - epistaxes, petéquias, sangramento gengival (VERONESI; FOCACCIA, 2004).

Os sintomas característicos da LV facilitam o diagnóstico clínico; entretanto, a detecção de indivíduos assintomáticos ou com a doença subclínica através do exame clínico é

inviável, sendo então necessário o uso de testes de diagnóstico laboratorial.

O Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) recomenda que a LV deve ser investigada em todos os pacientes infectados pelo HIV com o fígado ou baço aumentados, com presença ou não de febre e alteração de contagem de células do sangue. Além disso, recomenda que seja sugerido aos pacientes com leishmaniose o teste para HIV.

2.3.2 Diagnóstico Laboratorial

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da LV. Nos casos humanos, o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos; entretanto, um diagnóstico conclusivo requer a confirmação através de exames parasitológicos, sorológicos ou moleculares.

2.3.2.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é feito pela demonstração do parasito em material de biópsia ou em aspirado da medula óssea, do baço, do fígado ou de linfonodos. O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaços ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meio de cultura ou inoculação em animais de laboratório. A especificidade destes métodos é próxima de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição do parasito não é homogênea no mesmo tecido (SILVA et al., 2000; ABEIJON et al., 2012). A sensibilidade da medula óssea pode chegar a 95% quando examinada por pelo menos uma hora (SILVA; STEWART; COSTA, 2005), mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço (SUNDAR; RAI, 2002). Apesar da vantagem da simplicidade metodológica, esse método é insuficientemente sensível quando examinado por um curto intervalo de tempo, utiliza técnica invasiva, pode ser dolorido e perigoso quando não é feito de forma adequada (ISLAM et al., 2002; SILVA; STEWART; COSTA, 2005; ABEIJON et al., 2012).

2.3.2.2 Diagnóstico sorológico

A LV é caracterizada por uma forte estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta

em hipergamaglobulinemia, o que facilita o diagnóstico através de testes sorológicos, evitando os exames parasitológicos, que são invasivos (GONTIJO; MELO, 2004; MAGILL, 2005).

Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico de LV humana. Os testes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática, nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes. Os testes têm limitações, pois podem permanecer positivos durante longo tempo, mesmo após o tratamento. Como há infecções subclínicas, um teste positivo necessariamente não indica doença ativa.

Atualmente, são usados os testes de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) que utilizam antígenos brutos e são limitados em termos de especificidade e de reprodutibilidade (SUNDAR; RAI, 2002; AZAZY et al., 2003).

A RIFI é amplamente utilizada no diagnóstico de LV desde 1964 e é o exame atualmente disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), apresentando sensibilidade de 82% a 95% e especificidade de 78% a 92% (ASSIS et al, 2008).

Frente à complexidade do diagnóstico da LV, métodos laboratoriais de fácil realização e interpretação e que forneçam resultado rápido são cada vez mais necessários. Testes de imunocromatografia de fluxo lateral para o diagnóstico da LV usando-se o antígeno rK39, uma seqüência de 39 aminoácidos clonados da região quinase de *L. infantum*, donovani-específico, têm sido avaliados em vários países, com sensibilidade e especificidade variáveis (ASSIS et al., 2008; BURNS et al., 1993).

2.3.2.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A LV é caracterizada pela produção de anticorpos anti-*Leishmania*, podendo facilmente ser detectada pelo ELISA (MOHAMMED et al., 1985). O ELISA é altamente sensível em indivíduos sintomáticos (BADARÓ et al., 1986). A sorologia é um importante meio de diagnóstico, uma vez que os sintomas clínicos são frequentemente não específicos e o exame parasitológico requer a coleta de amostra invasiva da medula óssea ou biópsia esplênica para realização do exame (AZAZY et al., 2003). Inúmeros testes sorológicos têm sido desenvolvidos e estão disponíveis para o diagnóstico de LV; no entanto, eles têm limitações importantes, em especial no diagnóstico de LV ativa (ROMERO et al., 2009; ABEIJON et al., 2012).

De acordo com Reed et al. (1990), o ELISA é uma valiosa ferramenta no diagnóstico

sorológico de LV. Mesmo com grosseiras preparações de antígeno, esse teste pode ser suficientemente específico e sensível (VAIRA et al., 1999) e pode ser avaliado tanto através de visualização direta como pelo uso de espectrofotômetro.

O ELISA tem como uma das vantagens sobre os outros testes sorológicos a relativa facilidade de adaptação para ser usado com antígenos purificados (REED et al., 1990) e oferece uma potencial vantagem na sensibilidade e na especificidade em relação aos outros testes sorológicos de diagnóstico de LV (EVANS et al., 1989).

Segundo Badaró (1996), a sensibilidade do teste ELISA é muito alta, até mesmo quando outras espécies de *Leishmania* são utilizadas como fonte de antígeno; contudo, para uma alta especificidade, é essencial uma cuidadosa seleção do parasito. o ELISA pode ser utilizado para distinguir a LV da doença de Chagas, e a sua especificidade depende significativamente do número de parasitas utilizados para a preparação do antígeno.

Em pesquisa realizada por Salotra et al. (2003), o teste ELISA detectou anticorpos específicos para *Leishmania* em 96% dos casos e teve elevada especificidade, embora indivíduos sem a doença, oriundos de áreas endêmicas de LV, possam possuir anticorpos anti-leishmania, o que complica a especificidade deste teste (FALQUETO et al., 2009; ABEIJON et al., 2012).

Uma importante limitação dos testes sorológicos é a baixa sensibilidade em pacientes imunodeprimidos (SALOTRA et al., 2008; ABEIJON et al., 2012). Outra desvantagem dos ensaios sorológicos é a existência de reação cruzada com outras doenças, incluindo leishmaniose cutânea, tripanossomíase, malária, tuberculose, amebíase e leptospirose, doenças coendêmicas em várias partes do mundo (ISLAM et al., 2002). Além disso, os níveis de anticorpos apresentam-se elevados tanto na LV assintomática como na LV ativa, podendo estar presentes por vários anos após o paciente ter sido curado (ABEIJON et al., 2012).

2.3.2.4 Exames inespecíficos

Os pacientes com LV geralmente apresentam leucopenia, neutropenia e trombocitopenia. Eventualmente, pode ser encontrado aumento das aminotransferases, bilirrubinas e fosfatase alcalina.

Em alguns pacientes com a infecção por *L. infantum*, observa-se aumento das taxas de ureia e de creatina, e em quase todos os pacientes constata-se prova de atividade inflamatória com elevação da velocidade de hemossedimentação e Proteína C reativa.

2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Em áreas infectadas com *Leishmania*, normalmente o principal parâmetro para registrar a intensidade da infecção parasitária é a contagem da densidade de *Leishmania* no intestino do flebótomo. Além dessa análise, é interessante também a quantificação de parasitas no organismo do indivíduo infectado. Testes de amplificação de ácidos nucleicos têm sido utilizados com esse objetivo (ABEIJON et al., 2012).

Diagnósticos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram desenvolvidos (BERRAHAL et al., 1996; LEONTIDES et al., 2002; SCHONIAN et al., 2003; REITHINGER E DUJARDIM, 2007). Dentre esses métodos, apresentam-se a PCR qualitativa e, mais recentemente, o uso da PCR em tempo real (qPCR).

Mais de duas décadas após o desenvolvimento do primeiro ensaio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a *Leishmania* (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990), uma experiência considerável com esta técnica para o diagnóstico da leishmaniose visceral tem sido acumulada. O ensaio de PCR para *Leishmania* a fim de amplificar um número diferente de alvos de DNA usando sangue periférico como amostra clínica mostrou ser uma alternativa não invasiva altamente eficiente para o diagnóstico da infecção, com sensibilidades de 82% a 100% e especificidade de 100% (LACHAUD et al., 2000; XIAO-SU et al., 2002; ABBASI et al., 2013).

A primeira documentação de PCR em tempo real foi em 1993 por Higuchi; entretanto, esta tecnologia demorou a se tornar uma técnica predominante nos laboratórios, embora o primeiro conceito de PCR tenha surgido em 1971 por Ghobind Khorana e colaboradores; mas a ideia não foi colocada em prática. Em 1985, Kary Mullis e colaboradores publicaram o método de amplificação do DNA com êxito. Talvez a principal razão para isso, fosse a grande despesa dos instrumentos e a complexidade de se realizar em tempo real estudos q-PCR reprodutíveis; por esses motivos, só recentemente foi amplamente aceita como uma técnica valiosa (HIGUCHI et al., 1993; FERREIRA et al., 2013). Com o número cada vez maior de tempo real termocicladores PCR no mercado e com os preços decrescentes desses instrumentos, bem como os reagentes, muito mais pessoas agora têm acesso a essa tecnologia.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica rápida e potente para a amplificação *in vitro* do DNA e evoluiu como um dos métodos mais sensíveis e específicos na detecção de *Leishmania* (REITHINGER; DUJARDIM, 2007; ANTINORI et al., 2009; ABEIJON et al., 2012). A detecção dos *amplicons* é simultânea à amplificação, não sendo necessárias etapas posteriores, como gel de eletroforese, detecção radioativa, ELISA ou Blots.

Essa técnica tem sido usada para detecção de patógenos, análise de expressão gênica, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) e análises de aberrações cromossômicas (KUBISTA et al., 2006; FABER, PEEKEL, SCHALLIGE, 2008). Devido aos avanços recentes em métodos moleculares, a q-PCR é usada rotineiramente nos laboratórios como um eficiente método de quantificação de parasitas no tecido e sangue periférico do hospedeiro e para a caracterização de espécies de parasitas (MYSKOVA; VOTYPKA; VOLF, 2008). Várias sequências-alvo, tais como RNA ribossômico (rRNA) genes, o mini-exon RNA derivado do gene, os minicírculos cinetoplástico e sequências de DNA repetitivas do genoma nuclear têm sido utilizados em ensaios de PCR publicados (ALONSO et al., 2010; BATISTA et al., 2012).

A PCR tem sido utilizada como teste de diagnóstico para LV; apresenta-se como um método específico, rápido, sensível e menos invasivo que pode detectar uma variedade de parasitas em diferentes tipos de amostra, como no aspirado de linfonodos, de medula óssea e mesmo em leucócitos do sangue periférico (OSMAN et al., 1997; IKONOMOPOULOS et al., 2003; FERREIRA et al., 2013). Esta técnica foi descrita por Nicolas et al. (2002) em ratos de laboratório infectados por *Leishmania*, utilizando DNA de cinetoplasto como alvo para PCR; e está provado ser altamente sensível e útil para o diagnóstico da leishmaniose canina e para os estudos clínicos humanos (MARY et al. 2004; ABBASI et al., 2013).

Esse método de diagnóstico molecular é baseado na amplificação de fragmento de DNA de forma exponencial, com a capacidade de medir os produtos de PCR em que se acumulam ou, em “tempo real”, é possível medir a quantidade de produto de PCR num ponto em que a reação ainda está na escala exponencial; para isso, é necessário que o método detecte a acumulação do produto de PCR, do uso de oligonucleotídeos e sondas específicas, ou fluoróforos intercalantes na cadeia do DNA, que emitem fluorescência a cada hibridização e de um termociclador adaptado para gravar os resultados durante cada ciclo de PCR em tempo real (NUNES et al., 2007; KUBISTA et al., 2006; GINZINGER, 2002;). A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR; os valores da fluorescência ficam gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Estas características fazem da PCR quantitativa em tempo real a técnica mais precisa e reprodutível para a análise biotecnológica (KUBISTA et al., 2006).

Bretagne e cols., em 2001, foram os primeiros a desenvolver trabalhos com sondas Taqman® para *L. infantum*; e muitos pesquisadores têm usado a técnica para detecção e quantificação de *Leishmania* (FOULET et al., 2007; VAN DER MEIDE et al., 2008; TALMI-

FRANK et al., 2010). Com a qPCR, surgiu a possibilidade de quantificação do parasito no sangue periférico de humanos (ANTINORI et al., 2009; VERMA et al., 2010; SUDARSHAN et al., 2011); em biópsia de pele (VAN DER MEIDE et al., 2008; ANTINORI et al., 2009), na medula óssea (ANTINORI et al., 2009); e também pode ser usada em modelos animais (REIS et al., 2009; QUARESMA et al., 2009; SILVA, R. et al., 2010).

Segundo Reithinger e Dujardin (2007), a detecção precisa do parasita é de extrema importância no diagnóstico de infecções por *Leishmania* e no controle da doença. O uso de testes moleculares deve ser valorizado principalmente em pacientes imunossuprimidos, pois nesses a acurácia dos testes sorológicos é bastante limitada, além da ausência do poder de discriminar entre infecções ativas ou passadas e, conseqüentemente, a falta de valor no acompanhamento da resposta à terapêutica específica ao parasita (SPINELLO et al., 2007).

Apesar das inúmeras vantagens da utilização da qPCR, existe a necessidade de simplificação, padronização e otimização da técnica (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; ABEIJON et al., 2012). No momento, a padronização de PCR para detecção de *Leishmania* é largamente negligenciada, e a abundância de PCR *in-house* pode levar a inconsistências de diagnóstico (DEBORGGRAEVE et al., 2008).

2.5 REAÇÃO DE MONTENEGRO

Reação de Montenegro é um método que consiste em uma reação intradérmica tardia, baseado na introdução de extrato sólvavel do parasita morto no antebraço do paciente a fim de observar a formação de endureções, o que seria interpretado como reação positiva, indicando a exposição desse paciente aos agentes do gênero *Leishmania*. No caso da LV, a técnica é de pouca utilidade, já que, na ausência de imunodeficiência adquirida, o resultado é frequentemente negativo pela imunodepressão seletiva que a infecção induz no homem (BRASIL, 2011).

A intradermorreação idealizada por Montenegro representa o principal exame complementar para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em áreas endêmicas, sendo, portanto, de relevante importância para países como o Brasil (MONTENEGRO, 1926). Essa reação de hipersensibilidade tardia possui sensibilidade variando entre 86% e 100% e especificidade de aproximadamente 100%, o que a consagrou como uma das provas mais usadas na confirmação da doença ativa, no diagnóstico retrospectivo e em inquéritos epidemiológicos de LTA (FURTADO, 1980; GUEDES; CUCÉ; FURTADO, 1990).

Reações cruzadas podem ocorrer principalmente em indivíduos com doença de Chagas e indivíduos curados de leishmaniose visceral. Resultados com falsos negativos também têm sido descritos quando a infecção é precoce ou em casos em que a doença cutânea seja causada por *Leishmania amazonenses* (CUBA-CUBA et al., 1985; SILVEIRA et al., 1991).

2.6 LEISHMANIOSE VISCERAL: NOVOS MEIOS DE DIAGNÓSTICO

A presença de *L. donovani* na pele de doentes com calazar, apresentando lesões cutâneas, principalmente como sequelas da infecção visceral, tem sido largamente descrita em várias partes do mundo (PRATA; PIVA, 1956). O achado de amastigotas na pele de pacientes com calazar mostra que os parasitos podem não se localizar exclusivamente nas vísceras, mas também na pele sadia ou em áreas com lesões macroscópicas (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013). Chagas et al. (1936), no Pará, fizeram esfregaços de biópsia de pele normal em quatro casos e encontraram raros amastigotas em um deles.

A biópsia de uma pequena parte do intestino permitiu encontrar *L. donovani* em 18 casos, dentre os 46 casos de LV estudados. Este resultado pode explicar a diarreia que acomete os pacientes com a doença (BENHASSINE et al., 1986; BABA et al., 2006).

Vasconcelos et al. (1993) estudaram 18 pacientes do Nordeste, no estado do Ceará, com calazar e, durante o estudo, ficou evidenciado o parasitismo da pele: dois tinham nódulos ulcerativos na pele e 16 pacientes tinham a pele clinicamente normal.

No início do ano de 1930, investigações sobre a LV afirmavam que a *L. donovani* tinha sido encontrada nos fluidos corporais de pacientes com calazar, por exemplo, em urina, fezes, sêmen e secreção nasal e mucosa orofaríngea. Baseado nestes estudos, foi verificado o potencial de diagnóstico de secreções nasais, *swabs* da mucosa orofaríngea (MEBRAHTU et al., 1993; VÁSQUEZ, 2007; FERREIRA et al., 2013).

A mucosa bucal apresenta muita semelhança com a pele, mas tem algumas diferenças e, principalmente, algumas reações surpreendentemente contrastantes. Segundo estudo realizado por Ferreira et al. (2013), o uso de amostras de *swabs* orais e nasais apresentaram um elevado potencial no diagnóstico molecular de LV com resultados equivalentes ao uso de amostras invasivas.

A boca encerra um conjunto de estruturas banhadas pela saliva, contendo flora microbiana própria e estando em íntimo contato com o meio externo. Além dos traumas que sofre no desempenho de suas funções naturais, a boca abriga inúmeros fatores modificadores de sua higidez. No entanto, possui elevado potencial defensivo e mantém o equilíbrio

biológico, mesmo sob condições bastante desfavoráveis. A estrutura histológica da mucosa bucal, a flora, a saliva e o metabolismo de todo conjunto são alguns dos elementos responsáveis por sua alta capacidade de defesa (TOMMASI, 1998).

2.7 SALIVA

A saliva consiste em uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas. Além disso, a secreção salivar, especialmente a saliva mista, apresenta componentes não salivares derivados de exsudato gengival, leucócitos, células epiteliais da mucosa bucal, microrganismos e restos alimentares (PEDERSEN et al., 2002). Ela se apresenta como um líquido incolor, espesso, presente na boca dos seres humanos e de outros vertebrados; e é composta por água, muco, proteínas, sais minerais e amilase. Diariamente, é produzido na cavidade bucal de 1 (um) a 2 (dois) litros de saliva e sua produção aumenta toda vez que há a presença de alimento, o cheiro ou o simples desejo por uma comida (Sun et al., 2012).

A saliva é secretada principalmente por meio das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais; é composta por 98% de água; e contém outras substâncias, incluindo electrólitos, muco, compostos antibacterianos e várias enzimas (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007).

A saliva é importante na lubrificação e proteção dos tecidos moles, na deglutição e formação do bolo alimentar, na gustação, na fonação, na prevenção de cáries dentárias e ajuda a controlar a quantidade de água no corpo - quando há diminuição da quantidade de água, as glândulas salivares ficam desidratadas, deixando a boca seca, o que causa uma sensação de sede e estimula a necessidade de beber. Entretanto, a principal função da saliva é como primeira linha de defesa da cavidade oral através de sua atividade antifúngica, antiviral e antimicrobiana (BAEV et al., 2002; BATTINO et al., 2002).

A saliva é composta de componentes inorgânicos, tais como íons de sódio, potássio, cloreto, bicarbonato e de componentes orgânicos que se apresentam como uma mistura complexa de proteínas que exercem uma série de atividades de defesa no hospedeiro (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995; AMERONGEN; BOLCHER; VEERMAN, 2002).

Amerongen, Bolcher e Veerman (2002) estudaram a importância da saliva na proteção da cavidade oral e observaram que a saliva mantém a saúde oral em condições normais, o que está relacionado à produção de imunoglobulinas que são importantes no mecanismo de proteção específica, principalmente a imunoglobulina A (IgA), que é produzida por células B de todas as glândulas salivares e tem como ação antimicrobiana reação imune específica, cuja

concentração é 100 vezes maior do que a de imunoglobulina M (IgM) e 14 vezes maior do que a imunoglobulina G (IgG), e devem, portanto, servir como um bom alvo para o diagnóstico precoce.

Existe uma variedade considerável de doenças parasitárias causadas por protozoários que apresentam ocasionalmente manifestações bucais. Sabe-se que as seguintes podem envolver de algum modo a estruturas bucais: doença de Chagas, leishmaniose, tricomoníase e toxoplasmose (SHAFER; HINE; LEVY, 1998). Importantes biomarcadores podem ser analisados a partir da saliva, contribuindo para a detecção precoce de muitas doenças sistêmicas, mesmo aquelas que não possuem manifestações bucais, como câncer, diabetes e obesidade (RATHNAYAKE et al., 2013).

A LV é uma doença sistêmica e a infecção pode ocorrer numa vasta variedade de órgãos e tecidos. Considerando que a mucosa bucal sofre elevada proliferação celular e constante atividade esfoliativa, a análise da saliva seria uma maneira eficiente de se diagnosticar a doença (FERREIRA et al, 2013). Além disso, deve-se levar em consideração que os amastigotas presentes nos macrófagos podem chegar à mucosa oral através do sistema linfático e/ou da via hematológica.

A maioria dos laboratórios utiliza o sangue e seus constituintes para diagnóstico. Outros fluidos biológicos são utilizados na realização de diagnósticos e, dentre esses, a saliva apresenta inúmeras vantagens. A saliva total pode ser coletada de maneira não invasiva, por método de coleta simples e por pessoas sem treinamento especial. Esse tipo de amostra é de grande valor no diagnóstico de doenças em crianças e idosos, pois a coleta deste fluido está pouco relacionada com problemas em comparação com a coleta de sangue (KAUFMAN; LAMSTER, 2002; STRECKFUS; BIGLER, 2002; PHALANE et al., 2013). Mas é importante relatar que o uso da saliva como material de pesquisa pode representar problemas particulares devido à sua inerente variabilidade e instabilidade, uma vez que sua apresentação difere de acordo com idade, sexo e condições de saúde dos indivíduos (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007).

A saliva total é uma mistura de fluidos orais e de secreções das glândulas salivares, maiores e menores, e de vários constituintes não salivares, como o fluido gengival, expectorações dos brônquios e secreções nasais, sangue e soro proveniente de lesões orais, bactérias e toxinas bacterianas, vírus e fungos, células epiteliais descamadas, outros componentes celulares e restos alimentares (MANDEL; WOTMAN, 1987; FOX, 1989; SREEBNY, 2000; FDI WORKING GROUP 10 CORE 1992 apud KAUFMAN; LAMSTER, 2002).

Segundo Kaufman e Lamster (2002), a saliva pode ser coletada de maneira estimulada e não estimulada. A saliva estimulada é conseguida através de ação mastigatória (mastigação de parafilme) ou pelo estímulo gustatório (aplicação de ácido cítrico); entretanto, o uso de estímulos na coleta da saliva pode afetar sua composição, bem como o pH.

A literatura está repleta de artigos que relatam o uso da saliva, do fluído gengival e do transudato de mucosa no monitoramento de drogas e na detecção de doenças orais e sistêmicas (STRECKFUS; BIGLER, 2002; CHAKRAVARTI, A.; MATLANI, M.; JAIN, M., 2007), tais como doenças autoimunes, viroses, doenças bacterianas, doenças renais, lesões cancerígenas (KAUFMAN; LAMSTER, 2002; STRECKFUS; BIGLER, 2002). A análise da saliva, como a do sangue, possui duas proposições: primeiro, no diagnóstico de doenças e, segundo, no acompanhamento do progresso do tratamento dos indivíduos afetados.

A saliva não estimulada, por sua, é coletada sem estímulo gustativo exógeno, mastigatório ou estimulação mecânica. O fluxo salivar é mais afetado pelo grau de hidratação, mas também pelo estímulo olfativo, exposição à luz, posicionamento do corpo e pelos fatores sazonais e diurnos. Os dois melhores meios de coleta de saliva são o método de drenagem, em que a saliva escorre pelo lábio inferior, e o método de esguicho, em que o sujeito expectora a saliva em um tubo de ensaio (NAVAZESH, 1993; SUN et al., 2012).

Algumas doenças sistêmicas afetam as glândulas salivares, direta ou indiretamente, e podem influenciar a quantidade de saliva que é produzida, bem como sua composição. Essas mudanças características podem contribuir para o diagnóstico e a detecção precoce destas doenças. Fibrose cística, Síndrome de Sjögren, câncer e várias doenças infecciosas podem ser diagnosticadas com o uso dessa secreção, bem como na monitoração do uso de drogas e na dosagem de hormônios

A saliva é usada como alternativa útil ao soro no diagnóstico das hepatites virais. Hepatite A (HAV) hepatite B (HBV) são diagnosticadas com base na presença de anticorpos IgM na saliva (PARRY et al., 1989).

A saliva pode também ser utilizada para a determinação de imunização e detecção de infecção como o sarampo, a cachumba e a rubéola (FRIEDMAN, 1982; PERRY et al, 1993; BROWN et al, 1994.). A detecção de anticorpos em amostras de fluidos orais produz uma sensibilidade e especificidade de 97% e 100% para o sarampo, 94% e 94% para a cachumba, e 98% e 98% para a rubéola, respectivamente, em comparação com a detecção de anticorpos no soro para estes vírus (THIEME et al., 1994). Para os recém-nascidos, a resposta de IgA salivar foi encontrada para ser um melhor marcador de infecção pelo rotavírus do que a resposta de anticorpos no soro.

Estudos têm demonstrado que o diagnóstico de infecção com HIV baseado em anticorpo específico na saliva é equivalente ao soro em precisão e, portanto, aplicável tanto para uso clínico como na vigilância epidemiológica (MALAMUD, 1997). Os anticorpos para HIV na saliva de indivíduos infectados, detectado por ELISA e Western blot, podem ser correlacionados com os níveis de anticorpos no soro (HOLMSTRÖM et. al, 1990; FRERICHS et al, 1994). Em comparação com o soro, a sensibilidade e especificidade de anticorpo para HIV na saliva para a detecção de infecção estão entre 95% e 100% (TAMASHIRO; CONSTANTINO, 1994; TESS et al., 1996; EMMONS, 1997; MALAMUD, 1997). Outra possibilidade do uso da detecção de anticorpos IgA para o HIV na saliva é poder ser indicador de prognóstico para a progressão da infecção por HIV (MATSUDA et al., 1993).

3 REFERÊNCIAS

- ABBASI, I. et al. Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania donovani* DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 1-9, 2013.
- ABEIJON, C. et al. Identification and diagnostic utility of *Leishmania infantum* proteins found in urine samples from patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n.6, p. 935-943, 2012.
- AGGARWAL, P.; PRAKASH-WALI, J. Profile of kala-azar in North India. **Asia Pacific J Public Health**, v. 5, p. 90-93, 1991.
- AGUIAR-SOARES, R. D. O. et al. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4+ and CD8+) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 61, 2014.
- ALONSO, D. P. et al. Heterogeneity of *Leishmania infantum* chagasi kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). **Am J Trop Med Hyg**, Cidade?, v. 82, p. 819–821, 2010.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin Microbiol Ver**, v. 21, p. 334-359, 2008.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade de diagnóstico de leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, jan-fev 2004.
- AMERONGEN, A. V.; BOLCHER, J. G.; VEERMAN, E. C. Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. **Glycobiology**, Amsterdam, v. 5, n. 8, p. 733-40, Dec. 2002.
- ANSTEAD, G. M. et al. Malnutrition alters the innate immune responses and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 69, n. 8, p. 4709-4718, 2001.
- ANTINORI, S. et al. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? **Am J Trop Med Hyg.**, v. 81, p. 46–51. 2009.
- ARORA, S. K. et al. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. **Tr. Roy. Soc. Of Trop. Med. and Hyg**, v. 102, p. 41-45, 2008.
- ASSIS, T. S. M. et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol Serv Saúde**, n. 17, v. 2, p. 107-116, 2008.
- AZAZY, A. A. et al. Detection of antileishmanial IgG antibodies and *Leishmania*-specific antigens in sera from Yemeni patients with visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 7, p. 689-695, 2003.

- BABA, C. S. et al. Chronic diarrhea and malabsorption caused by *Leishmania donovani*. **Indain Journal of Gastroenterology**, v. 25, p. 309-310, Nov.-Dec. 2006.
- BADARÓ, R. A Prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis**, v. 154, n. 4, p. 639-649, Oct. 1996.
- BADARÓ, R. et al. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbente assay (ELISA) for antibodies in American Visceral Leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **Tr. Roy. Soc. Of Trop. Med. and Hyg**, v. 31, n. 1, p 72-78, Jan. 1986.
- BAEV, D. et al. Human salivary histatin 5 causes disordered volume regulation and cell cycle arrest in candida albicans. **Infect. Immun.**, New York, v. 70, n. 9, p. 4777-4784, 2002.
- BARSOUM, R. S. Parasitic infections in transplant recipients. **Nat Clin Pract Nephrol.**, v. 2, n. 9, p. 490-503. 2006.
- BATISTA, L. F. S. et al. An assement of the genetic diversity of *Leishmania infantum* isolates from infected dongs in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 5, p. 799-806, 2012.
- BATTINO, M. et al. The antioxidant capacity of saliva. **J. Clin. Periodontol.**, Newcastle, v. 29, n. 3, p. 1989-1994, Mar. 2002.
- BENHASSINE, M .et al. Apport de la biopsie duodenale dans le diagnostic du kala-azar. **Arch. Inst. Pasteur Algérie**, v. 55, p. 125-130, 1986.
- BERRAHAL, F. et al. Canine Leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 273-277, 1996.
- BICHAUD, L. et al. Epidemiologic relationship between Toscana virus infection and *Leishmania infantum* due to common exposure to *Phlebotomus perniciosus* sandfly vector. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. **Boletim epidemiológico**, v. 6. p. 1-11, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120p.
- BRASIL.Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico: HIV.AIDS**. Brasília, a. II, n. 1, 2013. 68p.
- BROWN, D. W. et al. Salivary diagnosis of measles: a study of notified cases in the United Kingdom, 1991-3. **BMJ**, v. 308, p. 1015-1017, 1994.
- BUALERT, L. et al. Cse report: Autochthonous Disseminated Dermal and Visceral Leishmaniasis in an AIDS patient, Southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 5, p. 821-824, 2012.
- BURNS, J. M. et al. Molecular characterization of a Kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Medicine, v. 90, p. 775-779, 1993.

CABRERA, M. A. A. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev Inst Trop**, São Paulo, v. 45: p. 79-83, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, Atlanta, v. 42, p. 1-19, 1993.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Med**, v. 50, p. 221-222, 1936.

CHAGAS, E.; CHAGAS, A. W. Notas sobre a epidemiologia da leishmaniose visceral em Mato Grosso. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 471-480, 1938.

CHAKRAVARTI, A.; MATLANI, M.; JAIN, M. Immunodiagnosis of dengue virus infection using saliva. **Curr Microbiol**, v. 55, n. 6, p. 461-464, 2007.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.**, v. 5, n. 11, p. 873-82. 2007.

CHEQUER, P. et al. AIDS research in Brazil. **AIDS**, v. 19, n. 4, p. 51-53, 2005.

COSTA, C. H. N. et al. Competence of human host as reservoir for *Leishmania chagasi*. **J Infect Dis.**, v. 182, n. 3, p. 997-00. 2000.

COSTA, C. H. N. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Amer J Trop Med Hyg.**, v. 66, n. 4, p. 334-337. 2002.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAUJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil: 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, n.5, p. 361-372, 1990.

COSTA, C. H. N.; TAPETY, C. M. M.; WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.40, n. 4, p. 415-419. 2007.

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

COTA, G. F.; SOUSA, M. R.; RABELLO, A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV Infected Patients: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, 2011.

CRUZ, I. et al. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **Indian J Med Res**, v.123, p.357-388, 2006.

CUBA-CUBA, C. A. et al. The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed-hypersensitivity in American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18, p.231-236, 1985.

- CUNHA, J. et al. Characterization of the biology and infectivity *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 6, n.122, 2013.
- DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO FILHO, S. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. trop.**, S. Paulo, v. 48, n.3, p.151-156, 2006.
- DASTRY, A. et al. AIDS-associated leishmaniasis: an unusual gastro-duodenal presentation. **Tr. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg**, v. 84, p. 239-240, 1990.
- DE LA LOMA, A. et al. Leishmaniasis or AIDS? **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 79, p. 421-422, 1985.
- DEANE, L. M. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. Rio de Janeiro; 1956.
- DEBORGGRAEVE, S. et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. **Trop Med Int Health**, v. 13, n. 11, p. 1378-1383, Nov. 2008.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immun Microbiol Infect Dis**, v.27, p. 305-318, 2004.
- DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 3-15, 2003.
- DIAS, E. S. et al. Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no estado de Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 40, n.1, p. 49-52. 2007.
- DINIZ, S. A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **J Infect Dev Ctries.**, v. 2, n. 1, p. 24–33. 2008.
- DONAGHY, L. et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, p. 236–240, 2006.
- DYE, C.; WILLIAMS, B. G. Malnutrition, age and risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proc Biol Sci**, v. 254, p. 33-9, Oct. 1993.
- EMMONS, W. Accuracy of oral specimen testing for human immunodeficiency virus. **Am J Med**, v. 102, p.15-20, 1997.
- EVANS, T. G. et al. Evaluation of antibody in american visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84: p.157-166, 1989.
- EZRA, N.; OCHOA, M. T.; CRAFT, N. Human immunodeficiency Virus and Leishmaniasis. **J Glob Infect Dis.**, v. 2, n. 3, p. 248–57. 2010.

FABER, W.; PEEKEL, I.; SCHALLIG, H. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. **J of Clin Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 73-78. 2008.

FALQUETO, A. et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 559-565, 2009.

FERREIRA, S. A. et al. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.

FOULET, F. et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens using real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome b gene. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 7, p. 2110–15. 2007.

FOX, P. C. Saliva composition and its importance in dental health. **Compend Suppl** , v.13, p. 457-460, 1989.

FREITAS, V. C. et al. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Its Natural Sandfly Vector *Lutzomyia longipalpis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 4, p. 606-612, 2012.

FRERICHS, R. R., et al. Saliva-based HIV-antibody test- ing in Thailand. **AIDS**, v. 8, p.885-894, 1994.

FRIEDMAN MG. Radioimmunoassay for the detection of virus-specific IgA antibodies in saliva. **J Immunol Meth**, v. 54, p. 203-211, 1982.

FURTADO T. Critérios para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 65, p.51-86, 1980.

GELANEW, T. et al. Case Report: Disseminated Cutaneous Leishmaniasis Resembling Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani* in Three Patients Co Infected with Visceral Leishmaniasis and Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome in Ethiopia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n.6, pp. 906–912, 2011.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOUZELOU, E. et al. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 342, 2013.

GUEDES, A. C. M.; CUCÉ, L. C.; FURTADO, T. Avaliação imunológica e histopatológica de reação de Montenegro. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 65, p. 34S-405, 1990.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishma- niasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**, v.2, p.494-501, 2002.

GUIMARÃES, F. N. Considerações sobre a leishmaniose visceral americana e classificação das leishmanioses. **In: 1º Reunião Anual dos Dermato-filógrafos brasileiros**, Rio de Janeiro, p. 89-93, 1945.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, n. 11, p. 1026-1030, 1993.

HOLMSTRÖM, P. et al. HIV anti- bodies in whole saliva detected by ELISA and Western blot assays. **J Med Virol**, v. 30, p. 245-248, 1990.

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

ISLAM, M, Z. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay using urine samples. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 789-794, july 2002.

KAUFMAN, K.; LAMSTER, I. B. The diagnostic applications of saliva: a review. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, New York, v. 13, n. 2, p. 197-212, Nov. 2002.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, n. 27, p. 95-125, 2006.

LACHAUD, L. et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, p 236-240, 2000.

LAINSON, R. et al. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the foz *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, p.135-7, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **In: Peters W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine.**, London, v. 1, p. 1-120, 1987.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular & Biochemical Parasitology**, n. 152, p. 35-46, 2007.

LEONTIDES, L.S. et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet. Parasitol.**, v.109, p.19-27, 2002.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 104, n. 22, p. 9375-80. 2007.

MAGILL, A. J. Epidemiology of the leishmaniasis. **In: Brabin L. dermatologic Clinics**, Washington, v.13, n.3, p. 505-523, 1995.

MALAMUD, D. Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: a technology whose time has come. **Am J Med**, v. 102, p.9-14, 1997.

MANDEL, I. D. The functions of saliva. **J. Dent. Res.**, New York, v. 66, p. 623-627, Feb. 1987.

MARY, C. et al. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potencial of the 14-kD and 16 kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 47, p. 764-771, 1992.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J Clin Microbiol.**, v. 42, p. 5249-5255, 2004.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J. C. The first probable case of platelet transfusion transmitted visceral leishmaniasis. **Transfus Med.**, v. 14, n. 4, p. 319-21. 2004.

MATSUDA, S. et al. Characteristics of IgA antibodies against HIV-1 in sera and saliva from HIV-seropositive individuals in different clinical stages. **Scand J Immunol**, v. 38, p. 428-434, 1993.

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.

MEBRAHTU; Y. et al. *Leishmania donovani* parasites in the nasa secretions, tonsillopharyngeal mucosa, and urine centrifugates of visceral leishmaniasis patients in Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, p.530,1993.

MEDRANO, F. J. et al. The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis inpatients coinfectd with human immunodeficiency virus type-1. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 59, n.1, p. 155-162, 1998.

MENDES, W. S. et al. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 35, n. 3, p. 227-31. 2002.

MOHAMMED, A. R. et al. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of Kala-azar. **Tr. Roy. Soc. Trop. Med e Hyg**, v. 79, p. 344-350, 1985.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Ann Trop Med Parasit.** v. 97, n. 1, p. 29-45. 2003.

MONTENEGRO J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Archives ofDermatology and Syphilis**, v. 13, p. 187-184, 1926.

MORALES, P. et al. Visceral leishmaniasis in lung transplantation. **Transplant Proc.**, v. 35, n. 5, p. 2001-03. 2003.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v. 366, n. 9496, p. 1561-77. 2005.

NASCIMENTO, M. D. S. B. et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1801-1807, Nov. – Dez. 2005.

- NASCIMENTO, E.T. et al. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 105, n.5, p. 298–300, 2011.
- NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Ann NY Acad Sci**, v. 20, p. 72-77, 1993
- NICOLAS, L. et al. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. **J. Clin. Microbiol**, v. 40, p.1666-1669, 2002.
- NUNES, C. M. et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
- OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 43, n. 2, p. 188-93. 2010.
- OSMAN, O. F. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2452-2457, 1997.
- PAREDES R, LAGUNA F, CLOTET B. Leishmaniasis in HIV-infected persons: a review. **J Int Assoc Physicians AIDS Care**, v. 3, p. 22-39, 1997.
- PARRY, J. V. et al. Diagnosis Hepatitis A and B by testing saliva. **J Med Virol**, v. 28, p. 255-260, 1989.
- PEDERSEN. M. et al. Oral findings in patients with primary Sjogren's Syndrome and Oral Lichen Planus – A preliminary study of the effects products. A of bovine colostrum – containing oral hygiene. **Clin. Oral Investig.**, Copenhagen, v. 1, n. 6, p. 11-20, Mar. 2002.
- PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 48, p. 949-950, 1934.
- PERRY, K. R. et al, Detection of measles, mumps, and rubella antibodies in saliva using antibody capture radioimmunoassay. **J Med Virol**, v. 40, p. 235-240, 1993.
- PHALANE, K. G. et al. Differential Expression of Host Biomarkers in Saliva and Serum Samples from Individuals with Suspected Pulmonary Tuberculosis. **Mediators Inflamm.**, v. 13, p. 1-10, 2013.
- PINTADO, V.; LÓPEZ-VELEZ, R. HIV-associated visceral leishmaniasis. **Clin Microbiol Infect**, v. 7, n. 6, p. 291-300, 2001.
- PRATA, A.; PIVA, N. Presença de leishmanias em pele aparentemente normal de pacientes com calazar. **O Hospital**, v. 49, n.4, 1956.
- QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Trop.**, v. 111, n. 3, p. 289-294. 2009.
- RABELLO, A., ORSINI, M., DIRSH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Ann Trop Med Hyg**, v. 97, n. 1, p. 17-28, 2003.

- REED, S. G, et al. An improved Serodiagnostic Procedure for Visceral Leishmaniasis. **Am. Soc. Trop. Med e Hyg**, 1990.
- REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol and Immunopathol.**, v. 128, p. 87–95. 2009.
- REITHINGER, R., DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J Clin Microbiol.**, v. 45, p. 21-25, 2007.
- REY, L. C.; MARTINS, C. V.; RIBEIRO, H. B.; LIMA, A. A. M. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. **J Pediatr.** v. 81, n. 1, p. 73-78. 2005.
- RIERA, C. et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 98, p. 102-110. 2004.
- RODGERS, M.R., POPPER, S.J., WIRTH, D.F.,. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Exp. Parasit.**, v. 71, p. 267-275, 1990.
- ROMERO, H.D. et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 27-33, 2009.
- ROSELINO, A. M. et al. (L.) chagasi in aids and visceral leishmaniasis (kala-azar) co-infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 251-254, 2008.
- SALOTRA, P. et al. Parasite detection in patients with post Kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular immunological methods. **J Clin Pathol**, v. 56, p. 840-843, 2003.
- SANTOS, L. O. et al. HIV Aspartyl Peptidase Inhibitors Interfere with Cellular Proliferation, Ultrastructure and Macrophage Infection of *Leishmania amazonenses*. **PLOS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.
- SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as vetor of American visceral leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol**, v. 12, p. 315-7, 1998.
- SCHIPPER, R. G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M. H. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. **Archives of Oral Biology.**, v. 52, n. 12, p. 1114-1135, 2007.
- SCHONIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 47, p. 349-358, 2003.
- SEGATTO, M. et al. Genetic diversity of Leishmania infantum field populations from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 39–47, 2011.
- SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. **Tratado de Patologia Bucal**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- SHAPIRO, T. A; ENGLUND , P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu Rev Microbiol.** v. 49, n. 1; p. 117-43. 1995.

- SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **J Vector Borne Dis.**, v. 45, n. 1, p. 255–72. 2008.
- SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 511, 1984.
- SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Vet Rec**, v. 147, p. 421-2, 2000.
- SILVA, M. R.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 72, n. 6, p. 811-814, 2005.
- SILVA, R. N. da et al. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. **Ann Trop Med Parasitol**. v. 104, n. 2, p. 137–43. 2010.
- SILVEIRA, F. T. et al. Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 735-738, 1991.
- SINGH, S.; DEY, A.; SIVAKUMAR, R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. **Exp Rev Mol Diagn.**, v. 5, p. 251-265. 2005.
- SINHA, K.; PANDEY, K.; BHATTACHARYA, S. K. Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. **Indian J Med Res**, v. 121, p. 407-414, 2005.
- SOUZA, G. et al. Slow clinical improvement after treatment initiation in *Leishmania*/HIV coinfecting patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.45, n. 2, p.147-150, 2012.
- SREEBNY, L. M. Saliva in health and disease: an appraisal update. **Int. Dent. J.**, New York, v. 50, n. 3, p. 140-161, June 2000.
- STRECKFUS, C. F.; BIGLER, L. R. Salivary glands and saliva. **Oral Diseases**, v. 8, p. 69-76, 2002.
- SUDARSHAN, M. et al. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. **J Antimicrob Chemot.**, v. 66, n. 8, p. 1751-55. 2011.
- SUN, S. et al., Analysis of age and gender associated N-glycoproteome in human whole saliva. **Clin Proteomics.**, v. 11, n. 1, p.25, 2014.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, p. 951-958, 2002.
- TALMI-FRANK, D. et al. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, n. 1, e581. 2010.
- TAMASHIRO, H.; CONSTANTINE, N. T. Serological diagnosis of HIV infection using oral fluid samples. **Bull World Health Organ**, v. 72, n. 1, p. 135-143, 1994.

- TESS, B. H. et al. Salivary testing for human immunodeficiency virus type 1 infection in children born to infected mothers in São Paulo, Brazil. The São Paulo collaborative study for vertical transmission of HIV-1. **Pediatr Infect Dis J**, v. 15, p. 787-790, 1996.
- THIEME, T. et al. Determination of measles, mumps, and rubella immunization status using oral fluid samples. **J Am Med Assoc**, v. 272, p. 219-221, 1994.
- THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Tratado de cariologia**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1995.
- TOMMASI, A. F. **Diagnóstico em Patologia Bucal**. 2. ed. São Paulo: Pancast, 1998.
- VAIRA, D. et al. New immunological assays for the diagnosis *Helicobacter pylori* infection. **BMJ**, v. 45, n. I, p. 123-127, 1999.
- VASCONCELOS, A. B. et al. Parasitisme Cutané par *Leishmania (Leishmania) chagasi* au cours de la Leishmaniose Viscérale Sud-Américaine. **Bull. Soc. Path. Ex**, v. 86, p.101-105, 1993.
- VÁZQUEZ, S. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary and secondary dengue 3 virus infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 256-262, 2007.
- VERMA, S. et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLOS One**, v. 5, n. 4, e 10107, 2010.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 2 v.
- WERNECK, G. L. et al. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of Visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 83, n.1, p. 13-18, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Report**. Geneva: WHO, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Report**. Geneva: WHO, 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: background information. A brief history of the disease. 2009. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 12 fev. 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Surveillance Report: HIV/AIDS Surveillance in Europe 2012**. European Centre for Disease Prevention and Control, 2013. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0018/235440/e96953.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- XIAO-SU, H. et al. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **J. Parasitol.**, v. 86, p. 822-826, 2002.

4 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE

4.1 ARTIGO 1: TRANSMISSÃO DE *LEISHMANIA INFANTUM* ATRAVÉS DA SALIVA DE PACIENTES INFECTADOS

Transmissão de *Leishmania infantum* através da saliva de pacientes infectados com HIV

Daniela Moura Parente¹

Doutoranda do programa RENORBIO/Universidade Federal do Piauí -UFPI

Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa de Leishmaniose – Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella

e-mail: daniela_parente@hotmail.com

Endereço para correspondência: Rua Angélica, nº 555, ap 601, Jockey, Teresina – Piauí – Brasil

Telefones: (86) 9482-5857; (86) 3234-3129

Danielle Alves Zacarias²

Mestre em Ciências da Saúde/Universidade Federal do Piauí -UFPI

Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa de Leishmaniose – Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella

e-mail: danizacariasbio@yahoo.com.br

Telefone: (86) 9977-2902

Carlos Henrique Nery Costa³

Doutor em Saúde Pública Tropical, Harvard University

Professor do Departamento de Medicina Comunitária da Universidade Federal do Piauí – UFPI

email: chncosta@gmail.com

Telefone: (86) 9589-8338

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma protozoose de evolução subaguda, grave, fatal quando não tratada. Objetivo: Investigar o potencial da saliva na transmissão de *L. infantum* entre humanos de uma área endêmica de LV e a influência da presença do vírus HIV na transmissão do parasita. Método: Estudo transversal com 64 pacientes distribuídos em três populações selecionadas, constituídas por (1) pacientes do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP) com LV e com e sem infecção por HIV e também (2) pessoas assintomáticas que fizeram o teste anti-HIV e tiveram o teste anti-*L. infantum* reagente; (3) Pessoas que residiam com pacientes com infecção por *L. infantum*. Resultados: Não houve associação estatística entre ter pelo menos um coabitante infectado e as variáveis sexo, CD4, Idade, qPCR saliva e qPCR sangue, mas houve associação estatística entre ter pelo menos um coabitante infectado e carga viral. Observou-se na análise multivariada que a frequência de um paciente com carga viral maior que 50 cópias virais/mm³ é 0,9734 vezes maior em relação aos pacientes com carga viral menor que 50 cópias virais/mm³. Conclusões: Os resultados mostraram uma correlação da transmissão do parasita com sua presença na saliva, bem como a influência do HIV nessa dinâmica, e são importantes na tentativa de entendimento de novas possibilidades de transmissão da *Leishmania* e sua relação com o HIV.

DESCRITORES: *Leishmania*, HIV, Transmissão, Saliva, qPCR, Montenegro

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma protozoonose de evolução lenta, grave, fatal quando não tratada e pode alcançar letalidade entre 10% e 98% em casos tratados inadequadamente e não tratados, respectivamente.¹ Na América a *L. (L.) chagasi* transmitida pelo vetor *Lutzomia longipalpis* pode ser considerada sinônimo de *Leishmania infantum*, embora alguns autores considerem espécies distintas.²

Um aspecto preocupante da LV é a sua emergência como infecção oportunista em pacientes com AIDS particularmente nos países da Europa Mediterrânea, onde têm aparecido muitos casos de LV em áreas endêmicas, o que tem acontecido também em outros países da África, na Índia e no Brasil.^{3,4}

O crescimento da epidemia ainda é pronunciado nas demais áreas do Brasil. A epidemia vem atingindo, também, de maneira importante, os indivíduos com menor escolaridade e de cidades menores.⁵ Até junho de 2003, quase 100 casos de coinfeção de HIV com espécies de *Leishmania* haviam sido notificados no País. A LV foi responsável por 37% destes casos.

O retardo no diagnóstico pode aumentar a chance de morte, seja por sangramento ou por infecções adicionais, uma vez que a LV também é uma doença que predispõe a infecções bacterianas oportunistas. Assim, ao se reconhecer a prevalência da associação de ambas as doenças é fundamental para se reduzir a letalidade das duas entidades mórbidas.

Contudo, outro aspecto normalmente não relevado é a transmissão inter-humana de LV. Pessoas com LV sintomática transmitem o parasita e podem representar fontes de infecção não negligenciáveis de *L. infantum*. A chegada do HIV/AIDS reforçou este aspecto, pois as pessoas que têm imunodeficiência possuem grande carga de parasitas e infectam facilmente os vetores e podendo representar um importante contingente de reservatórios de parasitas.⁶ Em áreas infectadas com *Leishmania*, normalmente o principal parâmetro para registrar a intensidade da infecção parasitária, é a contagem da densidade de *Leishmania* no intestino do flebótomo, além dessa análise é interessante também a quantificação de parasitas no organismo do indivíduo infectado. A intradermorreação idealizada por Montenegro representa o principal exame complementar para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em áreas endêmicas, sendo, portanto, de relevante importância para países como o Brasil.⁶

A LV é uma doença sistêmica e a infecção pode ocorrer numa vasta variedade de órgãos e tecidos. Considerando que a mucosa bucal sofre elevada proliferação celular e constante atividade esfoliativa, a análise da saliva seria uma maneira eficiente de se diagnosticar a doença.⁷ Além disso, deve-se levar em consideração que os amastigotas presentes nos macrófagos, podem chegar à mucosa oral através do sistema linfático e/ou da via hematológica.

Existe uma variedade considerável de doenças parasitárias causadas por protozoários que apresentam ocasionalmente manifestações bucais. Sabe-se que as seguintes podem envolver de algum modo a estruturas bucais: doença de Chagas, leishmaniose, tricomoníase e toxoplasmose. Importantes biomarcadores podem ser analisados a partir da saliva, contribuindo para a detecção precoce de muitas doenças sistêmicas.⁸

A maioria dos laboratórios utiliza o sangue e seus constituintes para diagnóstico. Outros fluidos biológicos são utilizados na realização de diagnósticos e, dentre esses, a saliva apresenta inúmeras vantagens. A saliva total pode ser coletada de maneira não invasiva, método de coleta simples e por pessoas sem treinamento especial. Esse tipo de amostra é de grande valor no diagnóstico de doenças em crianças e idosos, pois a coleta deste fluido está pouco relacionada com problemas em comparação com a coleta de sangue.¹⁰

O objetivo desse estudo é analisar o potencial da saliva na transmissão de *L.infantum* entre humanos de uma área endêmica de LV e a influência da presença do vírus HIV na transmissão do parasita.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

O estudo transversal foi realizado com 64 indivíduos residentes em Teresina- Piauí e Timon-Maranhão, Estados do Nordeste brasileiro, áreas endêmicas e de intensa transmissão da *Leishmania infantum*. Foram incluídos na pesquisa: (A) pessoas que fizeram teste anti-HIV no Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí (LACEN-PI) e tiverem o teste anti-*L. infantum* reagente. Esta população incluiu (1) os pacientes internados no Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portella de Teresina (IDTNP) com LV com e sem infecção por HIV e também (2) pessoas assintomáticas que fizeram o teste anti-HIV e tiverem o teste anti-*L. infantum* reagente; (B) Pessoas que residiam com pacientes com infecção por *L. infantum*.

Diagnóstico de infecção pelo HIV e de infecção por *L. infantum*

Infecção por HIV: Utilizou-se dois testes comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA) para HIV I e II, utilizados na rotina do LACEN-PI (Biorad, Teresina-PI), com o teste de imunofluorescência (TIF) (Biomanguinhos) ou Western-blot (WB) confirmatórios. Foram considerados infectados pelo HIV os pacientes com resultado reagente por ELISA, confirmado por TIF ou WB. **Infecção por *L. infantum* para triagem e para confirmação do diagnóstico:** o diagnóstico sorológico foi feito utilizando-se o TIF produzido por Biomanguinhos e padronizado para uso na rede de LACENs. **Diagnóstico de LV:** O diagnóstico de LV foi efetuado pela presença dos sinais clínicos característicos, como febre, anemia e esplenomegalia na presença de sorologia reagente ou da demonstração de parasitas por exame direto ou cultura. A presença de parasitas na ausência de sinais clínicos característicos foi considerada indicativo de doença. **Quantificação do RNA do HIV:** A quantificação foi feita apenas nos pacientes com infecção pelo HIV. O RNA do HIV foi medido através da tecnologia de *nucleic acid sequence based amplification* (NASBA) utilizado na rotina dos LACENs (BioMérieux, Teresina-PI). **Contagem de células CD4:** A contagem de células CD4 foi feita nos pacientes com HIV através da tecnologia de citometria de fluxo, utilizada na rotina dos LACENs (Beckton-Dickson, Teresina-PI).

Diagnóstico molecular: extração e quantificação do DNA

O diagnóstico foi feito através da PCR em tempo real (qPCR) do sangue periférico e da saliva e da PCR convencional da saliva. A extração de DNA foi realizada com 200 µL de sangue periférico/saliva de cada amostra através do kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, EUA). A concentração e pureza do DNA foram medidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para minimizar os erros na quantificação da parasitemia causada por diferenças na concentração de DNA total, todas as amostras foram normalizadas para a concentração mais baixa de DNA obtidos, que foi de 10 ng/µL.

A detecção e quantificação de *L. infantum* foi realizada através de reações de qPCR utilizando a tecnologia de sondas de hidrólise (Taqman®). Para a detecção no sangue periférico e na saliva utilizou-se os oligonucleotídeos e sondas desenhadas a partir das sequências do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) (ROLÃO et al., 2004). *kDNA Primer Forward* 5' – GGC GTT CTG CAA AAT CGG AAA A – 3', 72 pb, *Primer Reverse* 5' - CCG ATT TTT GGC ATT TTT GGT CGA T – 3', sonda de hidrólise FAM – TTT TGA ACG GGA TTT CTG – MGB-NFQ (numero de acesso do GenBank AF169140) e do gene da DNA polimerase (BRETAGNE et al., 2001) de *L. infantum*. As reações foram realizadas em placas de 48 poços (MicroAmp Applied Biosystems, ref. 4375816, Teresina-PI) e processadas no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Teresina-PI).

Reação de Montenegro

Foi administrado 0,1ml do antígeno de *Leishmania* a 3cm da *dobra cubital esquerda* no antebraço dos indivíduos estudados, sendo a induração mensurada após 48 horas. A leitura foi realizada pela técnica de Sokal JE e cols (1975), e o teste considerado positivo quando a induração foi maior ou igual a 5mm.

Aspectos éticos

Os pacientes que participaram do estudo foram orientados sobre todos os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa e foi obtido Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos participantes, bem como dos responsáveis dos pacientes menores de idade. O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da Resolução do Conselho Nacional de Saúde - CNS 466/12, que trata das Diretrizes e Normas de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (BRASIL, 2010).

Análise estatística

Na análise foi medida a proporção de infecção por *L. infantum* em todos os indivíduos com HIV e calculado o intervalo de confiança da proporção e feita a comparação com indivíduos sem HIV através dos testes de comparação de proporções. Para esta comparação foram utilizados os testes do qui-quadrado, exato de Fisher, Kruskal Wallis e Wilcoxon. Foram calculados o risco relativo e os intervalos de confiança.

A análise multivariada por regressão logística foi utilizada com possíveis modificadores de efeito e confundidores, entre elas a presença de parasitas no sangue periférico e na saliva das fontes de infecção. O teste de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnova para avaliar a distribuição de normalidade dos resultados da reação de Montenegro.

RESULTADOS

A procedência dos pacientes foi predominante do município de Teresina-PI (55 casos), sendo os outros casos de Timon-MA (09 casos). Desses, 27 (42,2%) eram pacientes coinfectados LV/HIV e 37 (57,8%) possuíam somente LV. A coinfeção mostrou predomínio no sexo masculino, onde 58,8% dos homens estavam infectados pelo vírus HIV.

Participaram do estudo 218 sujeitos, sendo 64 pacientes com LV, com ou sem infecção por HIV e 154 pessoas foram incluídas no estudo por residirem com esses pacientes. Nesses indivíduos foi realizada a Reação de Montenegro para determinar a presença de *L. infantum* e verificar a transmissão de LV.

Dos 64 pacientes com LV que participaram do estudo 34 (53,1%) eram do sexo masculino. A mediana de idade foi de 30 anos, e o paciente mais novo tinha 01 ano e o mais velho 65 anos.

Os dados demográficos (idade e sexo) foram analisados na busca de associação com a infectividade do parasita (Tabela 1 e 2). Não houve diferença em relação ao sexo, do total de 59 pacientes nos quais foram realizados testes moleculares, 30 pessoas eram do sexo masculino. Também não foi encontrada correlação entre a proporção de indivíduos infectados (Montenegro positivo) e a idade do paciente-fonte, essa variou de 21-45 anos na maioria dos pacientes (idade mediana de 36 anos). Contudo vale destacar que a maioria dos pacientes masculinos estavam contaminados pelo vírus HIV (72,7%), enquanto as mulheres em sua maioria (82,4%) não possuíam o vírus HIV (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição da população de estudo de acordo com a faixa etária e o gênero. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

Grupo de estudo	Número de indivíduos (%)	Idade média (IC 95%)* ¹	Masculino/feminino (%/%) ²
HIV positivo/LV presente	22 (37,3%)	42,0 (37,3; 46,4)	72,7%/27,3%
HIV negativo/LV sintomático	20 (33,9%)	27,8 (19,0; 37,8)	55,0%/45,0%
HIV negativo/LV assintomático	17 (28,8%)	31,9 (27,9; 37,0)	17,6%/82,4%
Total	59 (100%)	34,1 (30,5; 38,3)	50,8%/49,2%

*Intervalo de confiança de 95%.

¹Teste de Kruskal Wallis: p= 0,002

²Teste Qui quadrado: p=0,002

Os pacientes homens apresentaram uma frequência de 1,322 vezes maior de ter pelo menos um familiar com positividade na reação de Montenegro do que as mulheres (Tabela 2). Essa análise talvez se deva ao fato de que grande parte dos pacientes do sexo feminino (82,4%) serem assintomáticas para LV (Tabela 1).

Tabela 2. Regressão logística multivariada, associação entre o sexo de pacientes com LV/HIV e a proporção de pacientes com nenhum familiar com da Reação de Montenegro positiva e pelo menos um familiar com da Reação de Montenegro positiva. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

	MONTENEGRO		Total	Razão de Chance (IC _{95%})	Valor P
	Nenhum familiar	Pelo menos um familiar			
Sexo					
Masculino	8 (44,4%)	10 (55,6%)	18 (100%)	1,322 (0,173; 10,104)	0,788
Feminino	2 (33,3%)	4 (66,7%)	6 (100%)	1	
Total	10 (41,7%)	14 (58,3%)	24 (100%)		
^a Idade				0,962 (0,883; 1,048)	0,375

^aTratada como variável contínua.

Tabela 3: Número e proporção de coabitantes com a reatividade do teste de Montenegro de pacientes com leishmaniose visceral sintomática ou não, com e sem infecção pelo HIV. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

Grupo de estudo	Número de indivíduos do grupo	Número de coabitantes	No. e proporção de coabitantes com Montenegro reativo ¹
HIVpositivo/LVpresente	22	56	26 (46,4%)
HIVnegativo/LVsintomático	20	45	21 (46,7%)
HIVnegativo/LVassintomático	17	53	11 (20,8%)
Total	59	154	58 (37,7%)

¹ Teste Qui quadrado: p=0,9484

No estudo foram analisadas 154 pessoas que moravam na mesma residência dos pacientes infectados e realizada a Reação de Montenegro para determinar a presença de *L. infantum* nessas pessoas, desses em 59 coabitantes a reação foi positiva. Dos coabitantes infectados, 26 conviviam com pacientes coinfectados LV/HIV e 11 indivíduos residiam com pacientes sem a presença do vírus HIV e assintomáticos para LV (Tabela 3), sugerindo uma influência do HIV e da sintomatologia para LV na transmissão da *Leishmania*.

Não existe diferença significativa entre o número de familiares infectados (Montenegro positivo) com relação ao sexo. Dos 60 familiares do sexo masculino 36,7% apresentaram Montenegro positivo e das 90 familiares do sexo feminino 37,8% apresentaram positividade no Montenegro.

Na amostra analisada, os pacientes do sexo masculino possuíam em média 42,6% dos familiares com reação de Montenegro positiva, no grupo das pacientes do sexo feminino em média 27,4% dos familiares apresentaram reação de Montenegro positiva. No entanto, aplicando o Teste U de Mann Whitney verificou-se que não existe diferença significativa entre a proporção de familiares com Montenegro positivo em relação sexo (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição de acordo com o sexo dos pacientes que apresentaram pelo menos um familiar com reação de Montenegro positiva. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

Sexo	N	Média	Desvio padrão	Valor p ^a
Masculino	30	0,4261	0,41035	0,164
Feminino	29	0,2736	0,33525	
Total	59	0,3511	0,37996	

A chance de um paciente LV/HIV ter pelo menos um coabitante infectado excede 1,463 a chance de um paciente sem HIV. Mas a presença de LV sintomática mostrou-se relevante na presença de coabitantes infectados (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição de familiares com reação de Montenegro positiva de acordo com a situação de LV/HIV sintomática e assintomática. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

Grupos de exposição	N	Média	Desvio padrão	p-valor ^a
HIVpositivo/LVpresente	21	0,4103	0,39195	0,038
HIVnegativo/LVsintomático	18	0,4769	0,41599	
HIVnegativo/LVassintomático	17	0,1480	0,19877	
Total	56	0,3521	0,37430	

^aTeste de Kruskal Wallis.

A Tabela 5 mostra que existe diferença significativa entre a proporção de familiares com reação de Montenegro positiva quando relacionado com os grupos de exposição. O grupo HIVnegativo/LVsintomático apresentou a maior proporção média de familiares infectados (47,69%), o HIVpositivo/LVpresente apresentou em média 41,03% dos familiares infectados, o grupo e o grupo HIVnegativo/LVassintomático apresentaram o menor percentual de familiares infectados (14,8%).

Pacientes coinfectados LV/HIV transmitiram o parasita para um maior número de coabitantes. Pra melhor compreender essa relação foi avaliado se a carga viral (nº de vírus/mm³ sangue) e a contagem de células CD4 poderiam influenciar na transmissão.

A relação da quantidade de carga viral e o potencial de transmissão apresentou associação (p valor = 0,046). Dessa maneira uma maior quantidade de vírus no sangue dos pacientes não foi importante na transmissão da *L. infantum* (Tabela 6, Tabela 8). A chance de um paciente com carga viral detectável não ter coabitante infectado excede em 8,33 vezes a de uma paciente com carga viral detectável.

Tabela 6: Reatividade do teste de Montenegro (M+) entre coabitantes de pacientes com leishmaniose visceral infectados pelo HIV, de acordo com a contagem de vírus HIV no sangue periférico. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

Carga viral de HIV ¹	No. com M+/Todos que fizeram Montenegro (%) ²	Pelo um coabitante com M+/Todos que fizeram Montenegro (%) ³
Indetectável ⁴	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)
Detectável ⁵	21/39 (53,8%)	10/39 (17,9%)
Total	24/51 (47,1%)	12/51 (23,5%)

¹ Cópias/mL³; ² Valor de p=0,7949; ³ Valor de p=0,8715; ⁴ Carga viral menor que 50 cópias; ⁵ Carga viral maior que 50 cópias

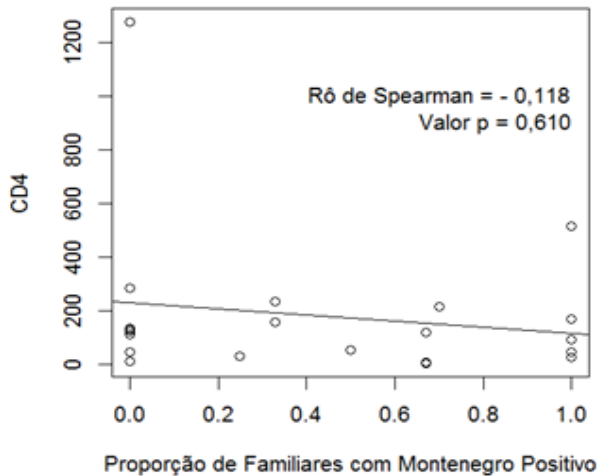
No estudo foi verificada uma correlação negativa da quantidade de células CD4 com a transmissão da doença (Figura 1, Tabela 7, Tabela 8), quanto menor a quantidade de células CD4, maior foi a quantidade de coabitantes com reação de Montenegro positiva (44,7%), demonstrando uma associação importante entre as duas variáveis.

Tabela 7: Reatividade do teste de Montenegro (M+) entre coabitantes de pacientes com leishmaniose visceral infectados pelo HIV, de acordo com a contagem de células CD4+ no sangue periférico. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

Contagem de células CD4 ¹	No. com M+/Todos que fizeram Montenegro (%) ²	Pelo um coabitante com M+/Todos que fizeram Montenegro (%) ³
< 200	17/38 (44,7%)	17/38 (44,7%)
≥ 200	42/120 (35,0%)	42/120 (35,0%)
Total	59/158 (37,3%)	59/158 (37,3%)

¹ Células/mm³; ² Valor de p= 0,9113; ³ Valor de p= 0,8070

Figura 1: Correlação entre a quantidade de células CD4 e a proporção de coabitantes com reação de Montenegro positiva.



Para os pacientes com HIV positivo a chance de um paciente com contagem de células CD4 menor que 200 ter “nenhum familiar Montenegro positivo” excede em 8,43 vezes a chance de um paciente com CD4 maior ou igual a 200 (Tabela 8).

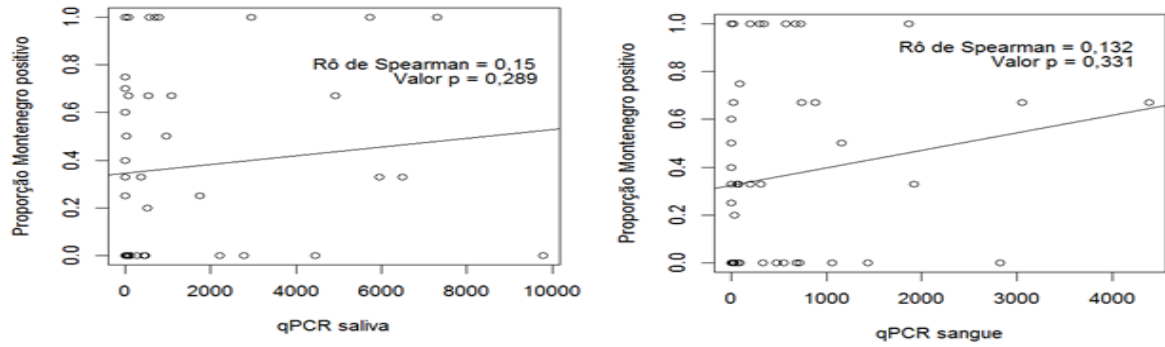
Tabela 8: Regressão logística multivariada, associação entre a quantidade de células CD4 e carga viral de pacientes com LV/HIV e a proporção de pacientes com nenhum familiar com da Reação de Montenegro positiva e pelo menos um familiar com da Reação de Montenegro positiva. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

	MONTENEGRO		Total	Razão de Chance (IC _{95%})	Valor P
	Nenhum familiar	Pelo menos um familiar			
Carga viral de HIV ¹					
Indetectável ²	5(71,4%)	2(28,6%)	7(100,0%)	1,190(0,112; 12,643)	0,885
Detectável ³	3(23,1%)	10(76,9%)	13(100,0%)	1	
Total	8(40,0%)	12(60,0%)	20(100,0%)		
Contagem de células CD4 ⁴					
< 200	6(40%)	9(60,0%)	15(100,0%)	8,437(1,035; 68,739)	0,046
≥ 200	4(44,4%)	5(55,6%)	9(100,0%)	1	
Total	10(41,7%)	14(58,3%)	24(100,0%)		

¹ Cópias/mL³; ² Carga viral menor que 50 cópias; ³ Carga viral maior que 50 cópias; ⁴ Cópias/mL³

A técnica quantitativa de qPCR foi realizada para verificar a quantidade de parasitas no sangue e na saliva dos pacientes. A quantidade de parasitas teve uma maior variação quando a saliva foi utilizada como amostra. Mas a quantidade de parasitas no sangue e na saliva não influenciaram na transmissão da *L. infantum*, o que pode ser observado através do coeficiente de correlação entre as variáveis, 0,132 quando o sangue foi utilizado como amostra para qPCR e 0,105 quando a saliva foi utilizada (Figura 2). Mas, através da técnica foi possível avaliar que em ambas as amostras existiam uma grande quantidade de parasitas nos pacientes e que a saliva pode ser comparada com o sangue no potencial de parasitemia.

Figura 2: Representação da quantidade de parasitas por mililitro (ml) de sangue e de saliva nos pacientes-fonte associada com a proporção de pessoas positivas na reação de Montenegro. Na qPCR de saliva e de sangue foi removido um paciente em cada técnica (outlier) com mais de 10000parasitas/ml



DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) está largamente distribuída pelo mundo.^{11,12,13} No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas, cerca de 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos.¹⁴

Embora a distribuição geográfica de infecção por *Leishmania* esteja limitada às áreas de distribuição de vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, a infecção pelo HIV modificou os padrões de transmissão zoonóticos e antroponóticos. Os pacientes coinfectados aumentam o número de reservatórios humanos em áreas de transmissão antroponótica e podem ajudar a criar novos focos de transmissão antroponótica em áreas onde a transmissão de LV tem sido tradicionalmente zoonótica.^{13,14} Desta forma, existe uma grande possibilidade de que a epidemiologia da LV esteja sendo modificada em áreas de transmissão vetorial a partir de pessoas com HIV. No estudo apesar da pequena quantidade de indivíduos, foi possível verificar uma maior transmissão da *Leishmania* a partir de pacientes coinfectados LV/HIV.

O diagnóstico de LV em pacientes com HIV é difícil, uma vez que os pacientes apresentam sinais não específicos de LV e os sintomas podem ser parecidos com os de outras doenças oportunistas.¹⁵ A LV em pacientes com AIDS pode representar um enigma para clínicos pouco experientes, principalmente se a AIDS é diagnosticada primeiro ou se os seus sintomas também estão presentes.

Globalmente, a maioria dos casos de leishmaniose acontecem em população HIV-negativo, onde é considerada principalmente uma doença da infância, no entanto, a associação de infecção por *Leishmania* e HIV resultou numa alteração significativa na idade da população em risco, levando a um maior número de casos em pessoas com idade entre 31-50 anos atualmente^{16,17}, os pacientes avaliados tinham idade entre 21-45 anos em sua maioria.

Neste estudo não foi pesquisada a presença de HIV nos coabitantes que foram contaminados pela *Leishmania*, mas sabe-se que a infecção pelo HIV pode aumentar o risco de desenvolvimento LV em 10-100 vezes em áreas endêmicas. No estudo foi verificado que pacientes com a coinfeção LV/HIV contaminam mais do que aqueles que possuem somente LV, esse fato enaltece a influência do HIV na dinâmica da contaminação pela *Leishmania*. É possível que o parasita na forma amastigota possa induzir a replicação de vírus HIV- 1 em macrófagos e facilitar a interação com célula hospedeira.¹⁸

A análise também sugere que pacientes com LV/HIV com contagem de células CD4 reduz a chance de transmissão da *Leishmania* para outras pessoas. Essa observação deve-se ao fato de que pacientes com um número maior de CD4 possuam uma menor perturbação na imunidade celular, conseguindo assim reduzir a quantidade de parasitas no seu organismo. Estudos em modelo animal relataram que as células CD4 são responsáveis pelo controle inicial da proliferação e disseminação do parasita.¹⁹ Assim uma baixa inicial dessas células pode permitir uma ampla disseminação do parasita em todo o sistema fagocitário mononuclear, aumentando o número de locais que possam abrigar leishmanias quiescentes.²⁰

No início do ano de 1930, investigações sobre a LV, afirmavam que a *L. donovani* tinha sido encontrada nos fluidos corporais de pacientes com calazar, por exemplo, na urina, fezes, sêmen e secreção nasal e mucosa orofaríngea. Baseado nestes estudos, o potencial de diagnóstico de secreções nasais, *swabs* da mucosa orofaríngea foi verificado.²¹

Ao contrário de *L. donovani*, que é antroponótica, a *L. infantum* é antropozonótica e é transmitida para o homem através da picada de um flebótomo contaminado a partir de um reservatório animal, principalmente cães, mas existe a possibilidade de que os portadores humanos saudáveis sejam reservatórios em potencial.²² Com essa hipótese, que no estudo foi pesquisada a possibilidade dos líquidos corporais humanos serem fontes de infecção entre

homens, principalmente a saliva, pela facilidade de contato e troca desse fluido entre as pessoas, principalmente as que vivem em uma relação de convivência mais íntima.

Existem suspeitas da transmissão da *L. Infantum* entre cães, sem a participação do *Lutzomia longipalpis*. No final do verão de 1999, cães de caça em um clube Foxhunting, em New York começaram a mostrar sinais e sintomas de Leishmaniose, mas naquele tempo, a leishmaniose autóctone não tinha sido relatada em cães, outros animais ou seres humanos em Nova York, o que levantou a suspeita da transmissão de cão para cão.²³ Outros estudos demonstraram a presença de leishmania em swabs orais de cães, o que pode implicar na transmissão do parasita entre esses animais através de lambidas e mordidas, mesmo sem a presença do flebótomo.²⁴ Dessa maneira podemos compreender que a transmissão entre humanos através de fluidos orais também seria possível, já que o parasita pode ser encontrado na saliva e em tecidos bucais.

Até bem pouco tempo a análise da saliva, como a do sangue, possuía duas proposições: primeiro, no diagnóstico de doenças e segundo, no acompanhamento do progresso do tratamento dos indivíduos afetados. Nos dias atuais devemos observar o potencial da saliva como fonte de infecção. Existe várias evidências de microrganismos e doenças infecciosas que são transmitidos pela saliva, como *Helicobacter pylori*, o vírus da hepatite B e C, herpes, mononucleose. E através da qPCR realizada foi possível detectar a presença do parasita na saliva dos pacientes em quantidades semelhantes com o encontrado no sangue.

Não foi encontrada associação significativa entre a quantidade *Leishmania* na saliva e no sangue com a positividade da reação de Montenegro. No entanto, a saliva parece desempenhar um importante papel na proteção de um indivíduo da infecção por HIV. A saliva de pessoas não infectadas pelo HIV contém inibidores endógenos não imunes de HIV, tais como mucinas, defensinas, trombospondin, e várias proteínas salivares, em especial, inibidor secretório de peptidases de leucócitos.²⁵ Há também evidências de que a hipotonia da saliva exerça um efeito inibidor significativo sobre a replicação do vírus HIV²⁶ e como a *Leishmania* e o vírus possuem mecanismos sinérgicos na infecção do homem, essas evidências na saliva também dificultariam a contaminação pelo parasita.

CONCLUSÕES

Este estudo analisou o potencial da saliva como fonte de transmissão de *L.infantum* para pessoas que moravam na mesma residência dos pacientes contaminados e examinou a influência da presença do vírus HIV nessa transmissão. Estudos dessa natureza consistem em um avanço do conhecimento da epidemiologia e da infectologia, devido à importância da investigação.

Os resultados indicaram uma correlação significativa da transmissão do parasita com sua presença na saliva, bem como a influência do HIV nessa dinâmica. A pesquisa foi importante na tentativa de entendimento de novas possibilidades de transmissão da *Leishmania* e sua relação com o HIV.

REFERÊNCIAS

1. Desjeux P, Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-18.
2. Roselino AM , Chociay MF, Costa R , Machado A, Figueiredo J. L. (L.) chagasi in aids and visceral leishmaniasis (kala-azar) co-infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2008; 50:251-54.
3. Magill A. J. Epidemiology of the leishmaniasis. In: Brabin L. *dermatologic Clinics* 1995; 13(3):505-23.
4. Nathalie B, Lachaud L 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. *Immune Defic Syndr* 2008; 48(1).
5. Chequer P, et al. AIDS research in Brazil. *AIDS* 2005; 19(4):51-53.
6. Weirather J L et al. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49:3892–3904
7. Ferreira S A et al. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2013; 7:4.
8. Reithinger R, Dujardin J C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:21.
9. Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilis* 1926; 13:184-87.
10. Arora S. K. et al. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Tr. Roy. Soc. Of Trop. Med. and Hyg* 2008; 102: 41-45.
11. Leifso K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2007; 152:35-46.
12. Salotra P. et al. Parasite detection in patients with post Kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular immunological methods. *J Clin Pathol* 2003; 56:840-43.
13. Gontijo C, Melo M. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7 (3):338-49.
14. Lachaud, L. et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 236-40.
15. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-18.
16. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania/HIV* co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 2006; 123:357-88.
17. Wolday, D., H. Akuffo, G. Fessahaye, A. Valantine, and S. Britton. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scand. J. Infect. Dis*. 1998; 30:29–34.
18. Berman J (2006) Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res* 123:289-94.

19. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, et al. (2002) Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125: 197-207.
20. Fichoux Y, Jean-Franc, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France . *J. of Clinical Microbiol* 1999; 37.
21. Mebrahtu Y. et al. *Leishmania donovani* parasites in the nasa secretions, tonsillo-pharyngeal mucosa, and urine centrifugates of visceral leishmaniasis patients in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:530.
22. Herwalt BL. Leishmaniasis. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's principles of internal medicine* 2006; 17th ed. New York: McGraw-Hill; 1095–107.
23. Zandra D, Francis J, et al. Canine Visceral Leishmaniasis, 2000–2003
24. Ferreira S, Almeida G, Silva S, Vogas P, et al. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7:1-8.
25. Campo J, Perea MA, del Romero J, Cano J, Hernando V, Bascones A. Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. *Oral Dis*. 2006;12:219–28.
26. Stahl-Hennig C, Steinman RM, Tenner-Racz K, Pope M, Stolte N, Mätz-Rensing K, et al. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science*. 1999;285:1261–5.

4.2 ARTIGO 2: QUANTIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA INFANTUM* NO SANGUE E SALIVA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS, COM E SEM INFEÇÃO PELO HIV.

Quantificação de amastigotas de *Leishmania infantum* no sangue e saliva em pacientes com Leishmaniose visceral sintomáticos e assintomáticos, com e sem infecção pelo HIV.

Daniela Moura Parente¹

Doutoranda do programa RENORBIO/Universidade Federal do Piauí - UFPI

Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa de Leishmaniose - Instituto de Doenças Tropicais

Natan Portela

e-mail: daniela_parente@hotmail.com

Endereço: Rua Angélica, nº 555, ap. 601, Jockey, Teresina - Piauí

Telefones: (86) 9482-5857; (86) 3234-3129

Danielle Alves Zacarias²

Mestre em Ciências da Saúde/Universidade Federal do Piauí - UFPI

Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa de Leishmaniose - Instituto de Doenças Tropicais

Natan Portela

e-mail: danizacariasbio@yahoo.com.br

Telefone: (86) 9977-2902

Jailthon Carlos da Silva³

Mestrando em Ciências da Saúde - Universidade Federal do Piauí - UFPI

Pesquisador do Laboratório de Pesquisa de Leishmaniose - Instituto de Doenças Tropicais

Natan Portela

e-mail: jailthonsilva@yahoo.com.br

Telefone: (86) 8884-1432

Daniela Bandeira de Carvalho⁴

Especialista em Matemática/Universidade Federal do Piauí - UFPI

e-mail: bcdaniela@hotmail.com

Telefone: 55 (86) 8817-9927

Humberto Feitosa Pereira⁵

Especialista em Hematologia

e-mail: hpfeitosa@ig.com.br

Telefone: 55 (86) 9982-1334

Symonara Karina Medeiros Faustino⁶

Mestre em Farmacologia/Universidade Federal do Ceará

Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório Central do Piauí – LACEN

e-mail: symonara@hotmail.com

Telefone: 55 (86)9913-0082

Dorcas Lamounier Costa⁷

Doutora em Infectologia e Medicina Tropical/Universidade Federal de Minas Gerais

Professora da Universidade Federal do Piauí – UFPI

e-mail: dorcas.lc@gmail.com

Telefone: 55 (86) 9403-9765

Carlos Henrique Nery Costa⁸

Doutor em Saúde Pública Tropical/Harvard University

Professor da Universidade Federal do Piauí - UFPI

e-mail: chncosta@gmail.com

Telefone: 55 (86) 9589-8338

RESUMO

O objetivo deste artigo é avaliar os dados laboratoriais de pacientes com Leishmaniose visceral infectados e não infectados pelo vírus do HIV, através da *real-time* PCR, identificando a influência da coinfeção no agravamento da condição do paciente, bem como da quantidade de parasitas nas amostras de saliva e sangue. Realizou-se estudo transversal com 64 pacientes com calazar sintomáticos e assintomáticos, com e sem infecção pelo HIV. Os resultados demonstraram a prevalência do sexo masculino e de pacientes com idades entre 21-45. Os pacientes coinfectados com LV/HIV possuem mediana de 2793,6 parasitas/ml na saliva e mediana de 2302,4 parasitas/ml no sangue, enquanto os pacientes sem HIV e assintomáticos apresentaram valor mediano de 829,2 parasitas/ml na saliva e 43,2 parasitas/ml no sangue. Os resultados mostraram maior quantidade do parasita na saliva do que no sangue, a utilidade da saliva como método de diagnóstico não invasivo e possível fonte de transmissão do parasita.

DESCRITORES: *Leishmania*, HIV, Transmissão, Saliva, qPCR, Parasitemia

1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma protozoonose de evolução lenta, grave e fatal, quando não tratada e alcançar letalidade entre 10% e 98% em casos tratados inadequadamente e não tratados, respectivamente.[1] No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania infantum* (= *Leishmania chagasi*), transmitida pelo vetor *Lutzomia longipalpis*. [2] As leishmanioses constituem um grupo de doenças que permanecem como problema de saúde pública em pelo menos 88 países, destacando-se como uma das seis endemias consideradas prioritárias no mundo. [3] No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas, na maior parte das áreas endêmicas, cerca de 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. [4,5]

Vários casos de pacientes coinfetados têm sido descritos em áreas endêmicas de *L. infantum*. Nos pacientes com HIV, a associação com a LV tem acelerado a progressão da doença e suas manifestações de maneira mais agressiva. [6]

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da LV. Nos casos humanos, o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos; entretanto, um diagnóstico conclusivo requer a confirmação através de exames parasitológicos, sorológicos ou moleculares. Usualmente, o diagnóstico de infecções causadas por *Leishmania* são baseados na observação microscópica do parasita em amostras de pele ou mucosa, aspirados de baço e medula; [7] porém, este método apresenta uma grande variação em sua sensibilidade, além de serem necessárias técnicas invasivas para a coleta da amostra. Técnicas de cultivo *in vitro* do parasita são mais sensíveis, mas, em contrapartida, demandam maior dificuldade técnica e maior dispêndio de tempo. Os testes sorológicos, apesar de serem auxiliares no diagnóstico de LV, podem não ser ideais para elucidar a situação da doença atual do paciente, uma vez que os anticorpos podem permanecer detectáveis por anos, mesmo após um tratamento bem-sucedido, além de serem menos úteis

no diagnóstico de pacientes coinfectados com LV/HIV.

Os métodos moleculares de amplificação do DNA são uma grande evolução na detecção de *Leishmania* pela sua sensibilidade e especificidade. Nesse cenário, a reação em cadeia de polimerase (PCR) apresenta-se como um dos métodos mais utilizados, embora para sua realização seja necessário o uso de equipamentos específicos, extração prévia do DNA da amostra e técnicas para detecção do produto através da eletroforese com transiluminação por luz ultravioleta e o uso do carcinógeno brometo de etídio. [8] Outra técnica molecular que vem sendo bastante utilizada em alternativa à PCR convencional, é a PCR em tempo real, que vem acompanhada de padronização e otimização, o que permite resultados mais preciso e menos controversos, apesar de ser altamente dependente de equipamentos específicos, [9] e traz como vantagem em relação a PCR convencional resultados mais rápidos e a possibilidade de monitorar a carga parasitária do paciente. [10]

A possibilidade de a *leishmania* estar presente na corrente sanguínea e na saliva mais frequentemente do que anteriormente reconhecida trouxe a este estudo a hipótese de que os métodos baseados em amplificação para detectar DNA parasita presente no sangue ou na saliva podem ser um meio viável de diagnóstico. O objetivo do presente estudo foi descrever os dados laboratoriais de pacientes com Leishmaniose visceral infectados e não infectados pelo vírus HIV, através do uso da PCR em tempo real, destacando a influência da coinfeção no agravamento da condição do paciente, bem como da quantidade de parasitas nas amostras de saliva e sangue na transmissão da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

O estudo transversal foi realizado com 64 indivíduos residentes em Teresina, no estado do Piauí, e Timon, no Maranhão, estados do Nordeste, áreas endêmicas e de intensa transmissão da *Leishmania infantum*. Na pesquisa, foram incluídas pessoas que fizeram teste anti-HIV no Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí (LACEN-PI) e que tiveram o teste anti-*L. chagasi* reagente. Esta população incluiu (a) pacientes internados no Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portella de Teresina (IDTNP) com Leishmaniose visceral (LV) com e sem infecção por HIV e também (b) pessoas assintomáticas que fizeram o teste anti-HIV e tiveram o teste anti-*L. infantum* com resultado reagente. Do estudo, foram excluídas pessoas que não quiseram participar, índios e crianças menores de 01 ano ou que não se conseguiu fazer a coleta da quantidade de saliva suficiente.

Diagnóstico do estudo:

Infecção por HIV: utilizaram-se dois testes comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA) para HIV I e II, utilizados na rotina do LACEN-PI (Biorad), com o teste de imunofluorescência (TIF) (Biomanguinhos) ou Western-blot (WB) confirmatórios. Foram considerados infectados pelo HIV, os pacientes com resultado reagente por ELISA confirmado por TIF ou WB. **Infecção por *L. infantum* para triagem e para confirmação do diagnóstico:** o diagnóstico sorológico foi feito utilizando-se o TIF produzido por Biomanguinhos e padronizado para uso na rede de LACENs. **Diagnóstico de LV:** o diagnóstico de LV foi efetuado pela presença dos sinais clínicos característicos, como febre, anemia e esplenomegalia na presença de sorologia reagente ou da demonstração de parasitas por exame direto ou cultura. A presença de parasitas na ausência de sinais clínicos característicos foi considerada indicativo de doença. **Quantificação do RNA do HIV:** a quantificação foi feita apenas nos pacientes com infecção pelo HIV. O RNA do HIV foi medido através da tecnologia de *nucleic acid sequence based amplification* (NASBA) utilizado na rotina dos LACENs (BioMérieux). **Contagem de células CD4:** a contagem de células CD4 foi feita nos pacientes com HIV através da tecnologia de citometria de fluxo, utilizada na rotina dos LACENs (Beckton-Dickson).

Diagnóstico molecular: extração e quantificação do DNA

O diagnóstico foi feito através da *real time* PCR do sangue periférico e da saliva e da PCR convencional da saliva. A extração de DNA foi realizada com 200 µL de sangue

periférico/saliva de cada amostra através do kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, EUA). A concentração e a pureza do DNA foram medidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para minimizar os erros na quantificação da parasitemia causada por diferenças na concentração de DNA total, todas as amostras foram normalizadas para a concentração mais baixa de DNA obtida, que foi de 10 ng/μL.

A detecção e quantificação de *L. infantum* foi realizada através de reações de qPCR utilizando a tecnologia de sondas de hidrólise (Taqman®). Para a detecção no sangue periférico e na saliva, utilizou-se os oligonucleotídeos e sondas desenhadas a partir das sequências do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA)¹⁴ e do gene da DNA polimerase¹⁵ de *L. infantum*. kDNA Primer Forward 5' - GGC GTT CTG CAA AAT CGG AAA A - 3', 72 pb, Primer Reverse 5' - CCG ATT TTT GGC ATT TTT GGT CGA T - 3', sonda de hidrólise FAM - TTT TGA ACG GGA TTT CTG - MGB-NFQ (número de acesso do GenBank: AF169140). As reações foram realizadas em placas de 48 poços (MicroAmp Applied Biosystems, ref. 4375816) e processadas no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) no Laboratório de Leishmaniose do IDTNP, Teresina, Piauí.

Aspectos éticos

Os pacientes que participaram do estudo foram orientados sobre todos os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa e foi obtido Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos participantes, bem como dos responsáveis dos pacientes menores de idade. O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) n. 466/12, que trata das Diretrizes e Normas de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Análise estatística

Na análise, foi medida a proporção de infecção por *L. infantum* em todos os indivíduos com HIV e calculado o intervalo de confiança da proporção; e feita a comparação com indivíduos sem HIV através dos testes de comparação de proporções. Para esta comparação, foram utilizados os testes do Qui-quadrado, Exato de Fisher e U Mann de Whitney e foram calculados o risco relativo e os intervalos de confiança.

A análise multivariada por regressão logística foi utilizada com possíveis modificadores de efeito e confundidores; entre elas, a presença de parasitas no sangue periférico e na saliva e a positividade de PCR na saliva das fontes de infecção.

RESULTADOS

1- RESULTADOS

Dos 64 pacientes que participaram do estudo, 34 (53,1%) eram do sexo masculino. A mediana de idade foi de 36 anos; sendo que o paciente mais novo tinha 01 ano e o mais velho 65 anos, observando-se que a maioria dos pacientes tinha idade entre 21-45 anos.

A procedência dos pacientes foi predominante de Teresina (55 casos), sendo os outros casos de Timon (09 casos). Desses, 27 (42,2%) eram pacientes coinfetados com LV/HIV e 37 (57,8%) possuíam somente LV. A coinfeção mostrou predomínio no sexo masculino, com 73,1% dos homens infectados pelo vírus HIV (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição por faixa etária e gênero de indivíduos infectados com *Leishmania*, com e sem sintomas de leishmaniose visceral, com e sem infecção pelo HIV. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

Situação clínica	Faixa etária*			Total	Gênero**		
	Até 20 anos	21- 45 anos	Mais de 45 anos		Masculino	Feminino	Total
Com HIV/LiS ¹	01 (4,8%)	11 (60%)	9 (42,9%)	21 (100%)	19 (73,1%)	07 (26,9%)	26 (100%)
Sem HIV/LiS ¹	09 (45%)	08 (40%)	03 (15%)	20 (100%)	11 (55%)	11 (55%)	22 (100%)
Sem HIV/ LiA ²	- (0%)	14 (82,4%)	03(17,6%)	17 (100%)	03 (17,6%)	14 (82,4%)	17 (100%)

¹Infeção por *Leishmania infantum* sintomática (leishmaniose visceral). ²Infeção por *L. infantum* assintomática.

* Valor de p < 0,001

** Valor de p = 0,003

No estudo, foi observada uma maior prevalência de pacientes do sexo masculino, com os homens tendo três vezes mais chance de serem infectados pela *Leishmania infantum* e pelo HIV. No grupo dos pacientes sem HIV e sintomáticos para LV, 45% eram de crianças de ambos os sexos, já entre os pacientes assintomáticos 82,4% eram mulheres, na maioria grávidas, que fizeram o teste para HIV na rotina do pré-natal (Tabelas 1).

Realizou-se *real time* PCR (qPCR) de saliva e sangue para determinar a quantidade de parasitas de acordo com a idade e o sexo. No grupo do sexo masculino, encontrou-se a maior quantidade de parasitas na qPCR de sangue, e pode-se observar que não existe diferença significativa na quantidade de parasitas nos grupos utilizando a qPCR de saliva, mas que existe uma diferença altamente significativa na qPCR do sangue quando se comparam os

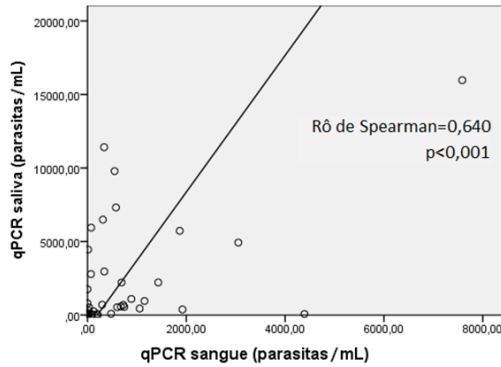
sexos. Nesse teste, a quantidade de parasita foi maior nos pacientes do sexo masculino. A média de parasitas no sangue dos pacientes homens foi de 2400 parasitas/ml, enquanto que nas mulheres foi encontrada uma média de 564 parasitas/ml.

Existe diferença significativa entre a diferença de parasitas detectados nos dois exames e a idade. Nos pacientes mais velhos, essa diferença é maior entre os dois exames. Nos pacientes com parasitemia menor que 50 parasitas/ml, percebe-se uma mediana de idade 28 anos idade, enquanto que nos pacientes mais velhos (mediana de 41 anos) esse valor foi acima de 50 parasitas/ml; o que implica dizer que quanto maior a idade, maior a quantidade de parasita nas amostras analisadas.

Dos 64 indivíduos participantes da pesquisa, foram realizadas reações de qPCR nas amostras de 55 deles, pois não se conseguiu obter saliva de 09 dos pacientes. Existe diferença altamente significativa entre a discrepância de parasitas detectados nos dois exames (qPCRs_{sal} e qPCRs_{sangue}) em relação ao sexo. A diferença entre o número de parasitas detectados nos dois exames é maior no grupo dos homens. Nas mulheres, a quantidade de parasita não diferiu em relação aos dois tipos de amostra utilizadas (saliva e sangue) utilizando a qPCR, mas nos homens essa diferença foi maior, mostrando que, dependendo do tipo de amostra, resultados diferentes serão encontrados.

Para observar a eficiência da técnica qPCR de saliva, comparou-se os resultados encontrados com a qPCR do sangue e encontrou-se uma forte correlação positiva nos dois testes (Figura 1); dessa maneira, pode-se entender que a saliva quando usada como amostra para detecção da *Leishmania* é eficaz, assim como o sangue, pois foi encontrado um coeficiente de Spearman de 0,64 com valor de $p < 0,001$.

Figura 1: Correlação linear entre a *real time* PCR de sangue (ordenada y) e a *real time* PCR de saliva (abscissa X) de pacientes com e sem sintomas de leishmaniose visceral, com e sem infecção pelo HIV. Outlier: um paciente com a pPCR de sangue com parasitemia = 11144 parasitas/ml. Índice de Correlação de Pearson = 0,555; Índice de Correlação de Spearman = 0,64

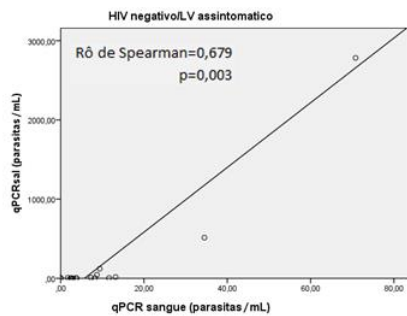


Um dos pontos principais da pesquisa foi determinar a influência da presença do vírus HIV na parasitemia da *L. infantum* e a quantidade de parasitas em no sangue e na saliva. Essa influência foi medida ao se quantificar a carga parasitária em pacientes com e sem HIV na saliva e nos sangue. Nos pacientes coinfectados LV/HIV possuem uma mediana de 2793,6 parasitas/ml na saliva, com média de 8083,20 parasitas/ml, no sangue a mediana foi de 2302,4 parasitas/ml e a média de 5754,4 parasitas/ml (Tabela 2), enquanto os pacientes sem HIV e com LV sintomática apresentaram um valor mediano de 1821,2 parasitas/ml na saliva, com média de 10234,4 parasitas/ml e mediana e média de 320,4 parasitas/ml e 2649,6 parasitas/ml respectivamente no sangue, demonstrando que o vírus influencia positivamente a multiplicação da *Leishmania*, pacientes com LV/HIV tem uma maior chance de transmissão do parasita. Foi encontrada uma correlação positiva entre a qPCR de saliva e a qPCR de sangue dos pacientes sem HIV e assintomáticos para LV (Figura 2).

Tabela 2: Distribuição da quantidade de parasitas/ml na saliva e no sangue na técnica de *real time* PCR dos pacientes com e sem HIV. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010.

Grupos de exposição		N	Média	Mediana
HIVpositivo/LVpresente	qPCRsal	21	8083,2	2793,6
	qPCRsangue	21	5754,4	2302,4
HIVnegativo/LVsintomático	qPCRsal	16	10234,4	1821,2
	qPCRsangue	20	2649,6	320,4
HIVnegativo/LVassintomatico	qPCRsal	17	829,2	21,2
	qPCRsangue	17	43,2	15,2

Figura 2: Correlação linear entre a *real time* PCR de sangue (ordenada y) e a *real time* PCR de saliva (abscissa X) de pacientes sem sintomas de leishmaniose visceral e sem infecção pelo HIV. Outlier: um paciente com a pPCR de sangue com parasitemia = 11144 parasitas/ml. Índice de Correlação de Pearson = 0,555; Índice de Correlação de Spearman = 0,64



DISCUSSÃO

A leishmaniose tem alcançado proporções endêmicas em algumas regiões do mundo, como Bangladesh, Nepal, Índia, Etiópia, Afeganistão e Brasil. A resistência aos medicamentos tem aumentado a expressão da doença no norte da Índia e a epidemia de HIV tem levado a novos padrões da leishmaniose visceral na Espanha e em Portugal. Do outro lado do oceano, no Brasil, a urbanização tem causado a propagação da doença em ambientes periurbanos no Nordeste e no Sul. [11]

As populações pobres, que são afetadas principalmente pela leishmaniose, também sofrem com muitas outras infecções crônicas, como helmintos, protozoários outros, tuberculose e HIV/AIDS. A Leishmaniose visceral pode em muitos aspectos ser considerada como infecção oportunista, e pacientes com HIV estão em risco muito maior de desenvolver LV. [12]

Do ponto de vista imunológico, a capacidade dos dois agentes de escapar e manipular a resposta imune parece um grande trabalho realizado em sinergia, o que resulta numa ligação perigosa onde o sistema imune pode ser esgotado rapidamente e o controle dos patógenos ser perdido. [13,14,15] Presença do HIV/AIDS também pode retardar o diagnóstico da LV, pois testes baseados na detecção de anticorpos podem não ser indicativos de doença em pacientes com AIDS. Curiosamente, enquanto o HIV pode ter um impacto profundo na LV, a evolução da doença cutânea parece ser apenas moderadamente. [16] A resposta imunológica que ocorre em pacientes com HIV parece favorecer a reativação de infecção latente por LV, a interação dos dois patógenos na célula hospedeira influencia na expressão e na multiplicação dos mesmos. [17]

A prevalência do sexo masculino no presente estudo foi evidente, a exemplo de outros estudos da coinfeção LV/HIV, [18,19] assim como também na LV não associada ao HIV. A média de idade verificada foi compatível com outros estudos, não demonstrando diferença de

idade entre pacientes coinfectados e sem o vírus HIV, embora a LV/HIV atinja predominantemente adultos jovens; [20] mas foi percebido que pacientes mais velhos possuem mais parasitas circulando no sangue e na saliva, e essa situação se deve a uma menor redução do potencial imunológico de pacientes mais velhos, com reduzida capacidade de resposta celular contra o parasita. No Brasil, desde 2008, o número caso de AIDS em homens jovens tem aumentado em maior velocidade que entre as mulheres, influenciando a razão de sexos, chegando em 2012 a 1,9 casos em homens para cada caso em mulheres. Cabe destacar que nos últimos 10 anos, no País, observa-se um aumento de 67,8% na taxa de detecção de casos de AIDS em jovens do sexo masculino e uma redução de 12,2% entre as jovens do sexo feminino. [21]

A necessidade de testes de diagnóstico é destaque no panorama atual de expansão da doença. As características clínicas e um teste positivo de resposta imune ao parasita podem ser sugestivos, mas, para a definição do diagnóstico, é necessária a identificação do parasita. [22]

Em termos de aplicações práticas, as principais questões clínicas e/ou biológicas podem ser respondidas por meio de métodos baseados em ácidos nucleicos para o diagnóstico da leishmaniose.

A PCR é altamente sensível e específica (até 100%) na detecção do parasita, independentemente de espécie ou gênero *Leishmania*, podendo ser utilizada em amostras não invasivas. Esta aplicação é necessária para o diagnóstico diferencial antes de iniciar a terapia, e as performances de PCR têm-se mostrado consistentemente ser melhor do que a observação direta do parasita através da microscopia ou cultura, particularmente em amostras com baixas cargas parasitárias. [23] A contribuição da PCR também parece ser particularmente relevante para o diagnóstico da leishmaniose em pacientes coinfectados com HIV. [24,25,26] Claramente, a aplicabilidade da PCR nas abordagens delineadas acima depende da existência

de marcadores genéticos adequados.

No entanto, a sofisticada tecnologia necessária para a PCR impede a utilização desta técnica em ambientes pobres em recursos. O uso de PCR em tempo real quantitativo (qPCR) permite a quantificação da carga parasitária, a redução do tempo de análise e o acompanhamento de pacientes coinfectados no diagnóstico de recidivas. [27] No estudo, a qPCR foi utilizada no diagnóstico de LV, em pacientes coinfectados, como também em pacientes sintomáticos e assintomáticos sem HIV . A qPCR indica maior precisão na percepção da presença do parasita do que a técnica convencional, tanto no uso do sangue como da saliva como amostra.

Na análise, foi desenvolvida uma qPCR em tempo real, a fim de quantificar a *Leishmania* no sangue e na saliva com a melhor sensibilidade. Para atingir este objetivo, optou-se pelo DNA de cinetoplasto (kDNA) como alvo molecular. Muitos autores têm publicado artigos que demonstram que o método baseado na amplificação de kDNA é mais sensível, pois este alvo está presente em cerca de 10⁴ cópias por células. [28]

Em áreas onde a transmissão é antroponótica, os pacientes coinfectados com LV/HIV devem ser direcionados como potenciais reservatórios da infecção. [29] No Brasil, a transmissão é antroprozoonótica, mas novos rumos da doença nos levam a observar a possibilidade de transmissão entre pessoas.

Algumas pesquisas apontam a contaminação de flebótomos alimentados com sangue de doentes com HIV-Leishmania, indicando que um novo ciclo antroponótico natural deve ser considerado na epidemiologia coinfeção *L. infantum*-HIV. [30,31] Outro ponto a ser observado é que a parasitemia em indivíduos assintomáticos assinala que o parasita pode ser transmitido por transfusões de sangue, bem como por transmissão direta. A possibilidade de que a transfusão de sangue pode representar um risco de transmissão da Leishmania também foi sugerida pelo aumento significativo na prevalência de anticorpos anti-Leishmania em

pacientes em hemodiálise no Brasil que receberam múltiplas transfusões de sangue.[32] Outros pesquisadores também conseguiram detectar parasitas no sangue de pacientes assintomáticos, confirmando os dados encontrados no presente estudo. [33,34] Um dado importante do estudo foi a verificação de grande quantidade de parasitas na saliva de indivíduos assintomáticos, o que é preocupante, pois dessa maneira há uma maior facilitação na transmissão da doença.

No estudo, foi pesquisada a possibilidade da contaminação entre pessoas ocorrer através da saliva. A saliva tem sido reconhecida como um espelho da saúde do corpo, já que contém os mesmos componentes do soro que são medidos em exames de sangue padrão usados para monitorar a saúde e doenças. A saliva, como um fluido de diagnóstico, oferece algumas vantagens distintas sobre o soro no diagnóstico de doenças, uma delas é a forma não invasiva e simples como é feita sua coleta, não precisa de aparelhos especiais e nem de mão de obra especializada. [35]

Os resultados ilustraram uma variação na parasitemia entre os diversos pacientes, bem como parasitemias diferentes dependendo do tipo de amostra utilizada. Na análise realizada, verificou-se que a saliva é tão eficiente quanto o sangue na detecção de parasitas, quando utilizada como amostra, bem como ficou evidente a maior quantidade de parasitas na saliva em relação ao sangue. Esses achados são justificados pela grande prevalência do parasita em tecidos e fluídos, embora não seja possível se afirmar se a alta parasitemia encontrada na saliva seja oriunda de parasitas íntegros ou relacionada à presença do DNA da *Leishmania* no fluído. Em alguns países onde não existe a presença do flebotómo transmissor da LV, foram relatados surtos da doença, o que demonstra a possibilidade de transmissão direta da doença, fazendo da saliva uma importante fonte de contaminação entre humanos e entre animais.

Outros estudos demonstraram a presença de leishmania em swabs orais de cães, o que pode implicar na transmissão do parasita entre esses animais através de lambidas e mordidas,

mesmo sem a presença do flebótomo. [36,37] Dessa maneira podemos compreender que a transmissão entre humanos através de fluídos orais também seria possível, já que o parasita pode ser encontrado na saliva e em tecidos bucais.

Estudos clínicos demonstraram que a alta incidência de *Leishmania* em pacientes com AIDS e a parasitemia periférica elevada são indicativos de crescimento do parasita descontrolado. Nos resultados, percebeu-se uma parasitemia elevada em pacientes coinfectados em relação à parasitemia encontrada em pacientes com a LV apenas, em vários outros estudos essa maior quantidade de parasitas em nesse grupo de pacientes também foi encontrada. [37] Pacientes coinfectados geralmente apresentam baixa contagem de CD4 + e altas cargas virais (1000-1000000 cópias). Uma baixa quantidade de células CD4 é um indicativo de uma menor capacidade de resposta celular contra o parasita, o que deve levar a uma maior parasitemia. Essa interação positiva entre o parasita e o vírus HIV deve ser respeitada e levada em consideração, principalmente em regiões com alta prevalência das duas morbidades.

CONCLUSÃO

Este estudo analisou o potencial da qPCR e da saliva no diagnóstico da *L.infantum*. Estudos dessa natureza consistem em um avanço do conhecimento da epidemiologia e da infectologia, devido à importância da investigação e da escassez de estudos com essa perspectiva.

Os resultados apontam a saliva como excelente amostra para realização de diagnóstico de LV, bem como a evidencia como importante fonte de transmissão do parasita, além de evidenciar a importância da influência do HIV na dinâmica da coinfeção com HIV/LV.

REFERÊNCIAS

- [1] - Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004, 27:305-318.
- [2] Roselino A M, Chociay M F, Costa R , Machado A, Figueiredo J. L. (L.) chagasi in aids and visceral leishmaniasis (kala-azar) co-infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2008; 50: 251-54.
- [3] Torres FD. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Paulista, Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz – Recife 2006.
- [4] Gontijo, C M F, Melo M N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7(3):338-49.
- [5] Guimarães, F. N. Considerações sobre a leishmaniose visceral americana e classificação das leishmanioses. In: 1º Reunião Anual dos Dermato-filógrafos brasileiros, Rio de Janeiro 1934; 89-93.
- [6] 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, São Paulo*,1990; 24(5):361-72.
- [7] Sinha K, Pandey K, Bhattacharya S K. Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. *Indian J Med Res* 2005; 121:407-14.
- [8] Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Trop Med Int Health*, 2008.
- [9] Chappius, F., et al. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5:S7–S16.
- [10] Pintado V, Martín-Rabadánp, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency vírus (HIV)-infected and non HIV infected patients. *Medicine* 2001; 80:54-73.
- [11] Rolão, N.; Cortes, S.; Rodrigues, O. R.; 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, 90:1150-54.
- [12] Bretagne, S.; Durand, R.; Olivi, M.; Garin, J. F.; Sulahian, A.; Rivollet, D.; Vidaud, M.; Deniau, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol.*2001, 8: 828–31.
- [13] Bossolasco, S., G. Gaiera, D. Olchini, M. Gulletta, L. Martello, A. Bestetti, L. Bossi, L. Germagnoli, A. Lazzarin, C. Uberti-Foppa, and P. Cinque. 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5080–5084.

- [14] Garg R, Barat C, Ouellet M, Lodge R, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* Amastigotes Enhance HIV-1 Production in Cocultures of Human Dendritic Cells and CD4 T Cells by Inducing Secretion of IL-6 and TNF- α . *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3:441.
- [15] Garg R, Trudel N, Tremblay MJ. Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. *Tend Paaiol*. 2007; 23:317–24.
- [16] Wolday D, Berhe N, Akuffo H, Britton S. *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Paaiol Toda*. 1999;15:182-7.
- [17] Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R (2014) Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. *PLoS Negl Trop Dis* 8(8): e3021.
- [18] Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Re*. 2008; 21:334-59.
- [19] Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar): Normas Técnicas. Ministério Nacional da Saúde; Brasília 1999. 85p.
- [20] Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka GW, Sampaio MMC. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78:120-7.
- [21] Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico: HIV/AIDS; Brasília 2013; ano II, n.01. 68p.
- [22] Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-solar B, Jiménez MI, Laguna F, López-vélez R, [Molina R](#), [Moreno J](#). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10:298-319.
- [23] Weirather J L et al. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49:3892–3904.
- [24] Garcia A L A, Kindt K W, Quispe-Tintaya H, Bermudez A, Llanos J, Arevalo A L, Banñuls S, De Doncker D, Le Ray and J C Dujardin. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxon-omy and clinical pleomorphism. *Infect. Genet. Evol*. 2005; 5:109–116.
- [25] Cruz I, Morales M A, Nogueira I, Rodriguez A, and J. Alvar. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002; 359:1124– 1125.
- [26] De Doncker S V, Hutse S, Abdellati S, Rijal B M, Singh-Karki S, Decuypere D, Jacquet D, Le Ray M, Boelaert S, Koirala and Dujardin J C. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2005; 99:25–31.

- [27] Lambson, B., A. Smyth, and D. C. Barker. 2000. *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.* 94:15–22.
- [28] Nicolas, L., E. Prina, T. Lang, and G. Milon. 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.* 40:1666–1669.
- [29] WHO-World Health Organization. Study Group on Integration on Health Care Delivery. Report. Ethiopia; 2007. (WHO-Technical Report Series, 861).
- [30] Molina R C, Canavate E, Cercenado F, Laguna R, Lopez-Velez and J. Alvar. Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV- infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS* 1994; 8:277–280.
- [31] Molina R J M, Lohse F, Pulido F, Lagun R, Lopez-Velez and J. Alvar. Infection of sand flies by humans coinfecting with leishmania infantum and human immunodeficiency virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60:51–53.
- [32] Sudarshan M, Sundar S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. *J. diagn. microbio.* 2014; 80:40-42.
- [33] Dos Santos Marques LH, Gomes LI, da Rocha ICM, da Silva TAM, Oliveira E, et al. (2012) Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 6(12): e1955.
- [34] Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of Saliva-A Review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:197-212.
- [35] Zandra D, Francis J, et al. Canine Visceral Leishmaniasis, 2000–2003
- [36] Ferreira SdA, Almeida GG, Silva SdO, Vogas GP, Fujiwara RT, et al. (2013) Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis* 7(4): e2150.
- [37] Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, et al. 2006. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(5):858–863.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral desta tese foi investigar a importância da reação em cadeia de polimerase quantitativa para estimativa da quantidade de *Leishmania infantum* e da infectividade da saliva de pacientes com calazar e infecção pelo HIV, mediante os seguintes objetivos específicos: avaliar a PCR em tempo real como indicador de carga parasitária de *L. infantum* no sangue periférico e na saliva; investigar a possibilidade de transmissão de *L. infantum* através da saliva; estudar a saliva como importante amostra biológica para investigação diagnóstica em doenças infecciosas; avaliar a infecção com HIV como fator de risco para a transmissão de *L. infantum*; descrever as características demográficas dos pacientes infectados pela *L. infantum* e pelo HIV. Ao final deste estudo:

- a) demonstrou-se que a *real time* PCR é um indicador de infectividade;
- b) identificaram-se os fatores de risco que aumentam a transmissão de *L. infantum* para o vetor, o flebotomíneo *Lu. longipalpis*;
- c) descreveu-se a influência da infecção por HIV no aumento da transmissão de *L. infantum* para o *Lu. longipalpis*;
- d) descreveu-se a contribuição das pessoas assintomáticas, com ou sem o HIV, na transmissão da *L. infantum* para *Lu. longipalpis*;
- e) verificou-se a influência da infecção por HIV de pessoas assintomáticas com *L. infantum* e sintomáticas com LV no aumento do risco de transmissão de *L. infantum* para outras pessoas; e
- f) verificou-se a viabilidade da saliva no diagnóstico de calazar.

Os resultados apontam uma correlação significativa da quantidade do parasita na saliva, quando comparada com a quantidade no sangue, bem como evidenciam a importância da influência do HIV na dinâmica da coinfeção com HIV/LV.

Assim, o entendimento da importância da influência das pessoas com HIV/AIDS como fonte de infecção deverá ter elevado impacto no meio científico de saúde pública, uma vez que os humanos, apesar de serem reservatórios competentes, não têm recebido importância epidemiológica. A demonstração de seu papel deverá implicar na recomendação de testagem anti-*L. infantum* em indivíduos com sorologia reagente para HIV. Recomenda-se estudos futuros com uma maior abrangência de pacientes, no intuito de melhor entender a dinâmica da *Leishmania* e do vírus HIV e seu papel na transmissão da doença.

Por fim, essas informações são de suma importância para o futuro, pois não se pode perder de vista que, de longe, a maior parte dos casos de infecção por *L. infantum* é originária

do Brasil. Os resultados encontrados neste estudo podem não somente ter enorme potencial explicativo, mas vir a identificar valiosos bioprodutos para o diagnóstico, para alvos terapêuticos e para o desenvolvimento de vacinas. Este potencial também realça a importância da conservação dos isolados de *L. infantum* em território nacional, uma vez que correspondem a importantíssimo patrimônio genético que poderão resultar em soluções biotecnológicas de elevado valor médico, social e econômico.

APÊNDICES

APÊNDICE A - DADOS ADICIONAIS DO ARTIGO 1

Tabela 1 - *Status* de Leishmaniose visceral e correlação com a presença de pelo menos um familiar com reação de Montenegro positiva de acordo com a situação de LV/HIV sintomática e assintomática. Teresina, Piauí, Brasil. 2008-2010

	Proporção de familiares com Montenegro positivo		Total
	<50%	≥50%	
HIVpositivo/LVpresente	21 (95,5%)	1 (4,5%)	22 (100%)
HIVnegativo/LVsintomático	18 (90,0%)	2 (10,0%)	20 (100%)
HIVnegativo/LVassintomático	17 (100%)	0 (0%)	17 (100%)
Total	56 (94,9%)	3 (5,1%)	59 (100%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 - Distribuição por idade dos pacientes-fonte com LV de acordo com de acordo com a situação de LV/HIV sintomática e assintomática. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

Idade	Grupos de exposição			Total
	HIVpositivo/LVpresente	HIVnegativo/LVsintomático	HIVnegativo/LVassintomático	
6 -20 anos	1 (10%)	9 (90%)	0 (0%)	10 (100%)
Maior que 20 anos	20 (41,7%)	11 (22,9%)	17 (35,4%)	48 (100%)
Total	21 (36,2%)	20 (34,5%)	17 (29,3%)	58 (100%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3 - Distribuição por sexo dos pacientes-fonte com LV de acordo com de acordo com a situação de LV/HIV sintomática e assintomática. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

	grupos de exposição			Total	Valor p (1)
	HIVpositivo/LVpresente	HIVnegativo/LVsintomático	HIVnegativo/LVassintomático		
Masculino	16 (53,3%)	11 (36,7%)	3 (10%)	30 (100%)	0,003
Feminino	6 (20,7%)	9 (31%)	14 (48,3%)	29 (100%)	
Total	22 (37,3%)	20 (33,9%)	17 (28,8%)	59 (100%)	

Fonte: Dados da pesquisa.

(1) Teste Qui-Quadrado.

Tabela 4 - Regressão logística bivariada, associação entre a carga viral de pacientes com LV/HIV e a negatividade da Reação de Montenegro entre os coabitantes. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

	Proporção de familiares com Montenegro positivo		Total	Razão de Chance (IC _{95%})	Valor P
	<50%	≥50%			
Carga viral não detectável*	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8 (100%)	0,875 (0,673; 1,137)	0,381
Carga viral detectável**	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)		
Total	20 (95,2%)	1 (4,8%)	20 (100%)		

Fonte: Dados da pesquisa.

*carga viral menor ou igual a 50 cópias de vírus/mm³ sangue.

** carga viral maior ou igual a 50 cópias de vírus/mm³ sangue.

Tabela 5 - Regressão logística bivariada, associação entre a quantidade de células CD4 de pacientes com LV/HIV e a negatividade da Reação de Montenegro entre os coabitantes. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

	PROPOÇÃO DE FAMILIARES COM MONTENEGRO POSITIVO		Total	Razão de Chance (IC _{95%})	Valor P
	<50%	≥ 50%			
CD4 até 150*	14 (93,3%)	1 (6,7%)	15 (100%)	2 (0,108; 36,954)	0,999
CD4 até acima de 150*	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8 (100%)		
Total	21 (91,3%)	2 (8,7%)	23 (100%)		

Fonte: Dados da pesquisa.

*células/mm³ sangue

Tabela 6 - Regressão logística bivariada, associação entre a carga viral de pacientes com LV/HIV e a proporção pacientes com nenhum familiar com da Reação de Montenegro positiva e pelo menos um familiar com da Reação de Montenegro positiva. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

	Montenegro		Total	Razão de Chance (IC _{95%})	Valor P
	Nenhum familiar	Pelo menos um familiar			
Carga viral não detectável*	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7 (100%)	8,33 (1,034; 67,142)	0,046
Carga viral detectável**	3 (23,1%)	10 (76,9%)	13 (100%)		
Total	8 (40%)	12 (60%)	20 (100%)		

Fonte: Dados da pesquisa.

*carga viral menor ou igual a 50 cópias de vírus/mm³ sangue

** carga viral maior ou igual a 50 cópias de vírus/mm³ sangue

Tabela 7 - Regressão logística bivariada, associação entre a quantidade de células CD4 de pacientes com LV/HIV a proporção pacientes com nenhum familiar com da Reação de Montenegro positiva e pelo menos um familiar com da Reação de Montenegro positiva. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010

	MONTENEGRO		Total	Razão de Chance (IC _{95%})	Valor P
	Nenhum familiar	Pelo menos um			
CD4 até 150*	6 (42,9%)	8 (57,1%)	14 (100%)	1,875 (0,266; 13,202)	0,528
CD4 até acima de 150*	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7 (100%)		
Total	8 (38,1%)	13 (61,9%)	21 (100%)		

Fonte: Dados da pesquisa.

*células/mm³ sangue

Tabulação cruzada

		HIV			p-valor
		Sim	Não	Total	
<u>sexo</u>	<u>Masculino</u> Contagem	19	14	33	,006
	% dentro de sexo	57,6%	42,4%	100,0%	
	<u>Feminino</u> Contagem	7	23	30	
	% dentro de sexo	23,3%	76,7%	100,0%	
<u>Total</u>	<u>Contagem</u>	26	37	63	
	% dentro de sexo	41,3%	58,7%	100,0%	

sexo * AssintomaticoLV

Tabulação cruzada

		AssintomaticoLV			p-valor
		Sim	Não	Total	
<u>sexo</u>	<u>Masculino</u> Contagem	6	27	33	,007
	% dentro de sexo	18,2%	81,8%	100,0%	
	<u>Feminino</u> Contagem	15	15	30	
	% dentro de sexo	50,0%	50,0%	100,0%	
<u>Total</u>	<u>Contagem</u>	21	42	63	
	% dentro de sexo	33,3%	66,7%	100,0%	

sexo * Lvsintomatico

Tabulação cruzada

		Lvsintomatico			p-valor
		Sim	Não	Total	
<u>sexo</u>	<u>Masculino</u> Contagem	27	6	33	,007
	% dentro de sexo	81,8%	18,2%	100,0%	
	<u>Feminino</u> Contagem	15	15	30	
	% dentro de sexo	50,0%	50,0%	100,0%	
<u>Total</u>	<u>Contagem</u>	42	21	63	
	% dentro de sexo	66,7%	33,3%	100,0%	

APÊNDICE B - DADOS ADICIONAIS DO ARTIGO 2

		Tabulação cruzada				p-valor	
		qPCRsálnova			Total		
		De 1 Até 100	De 101 a 1000	Acima de 1000			
idademediana	Até 36 anos	Contagem	15	6	5	26	,089
		% dentro de idademediana	57,7%	23,1%	19,2%	100,0%	
	Maior de 36 anos	Contagem	7	8	10	25	
		% dentro de idademediana	28,0%	32,0%	40,0%	100,0%	
Total		Contagem	22	14	15	51	
		% dentro de idademediana	43,1%	27,5%	29,4%	100,0%	

Testes de chi-quadrado			
	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)
Chi-quadrado de Pearson	4,844a	2	,089
Razão de probabilidade	4,943	2	,084
Associação Linear por Linear	4,503	1	,034
N de Casos Válidos	51		

<u>idademediana * pcrsal Tabulação cruzada</u>						
		pcrsal				
		Positivo	Negativo	Total		
<u>idademediana</u>	<u>Até 36 anos</u>	<u>Contagem</u>	<u>14</u>	<u>10</u>	<u>24</u>	<u>,187</u>
		% dentro de idademediana	58,3%	41,7%	100,0%	
	<u>Maior de 36 anos</u>	<u>Contagem</u>	<u>19</u>	<u>6</u>	<u>25</u>	
		% dentro de idademediana	76,0%	24,0%	100,0%	
<u>Total</u>		<u>Contagem</u>	<u>33</u>	<u>16</u>	<u>49</u>	
		% dentro de idademediana	67,3%	32,7%	100,0%	

Tabulação cruzada

			pcrsal		
			Positivo	Negativo	Total
qPCRsalsimnã	zero parasitas	Contagem	3	2	5
		% dentro de qPCRsalsimnã	60,0%	40,0%	100,0%
Total	Detectou pelo menos um parasita	Contagem	37	15	52
		% dentro de qPCRsalsimnã	71,2%	28,8%	100,0%
		Contagem	40	17	57
		% dentro de qPCRsalsimnã	70,2%	29,8%	100,0%

Tabulação cruzada

			pcrsal		
			Positivo	Negativo	Total
qPCRsanguesimnã	zero parasitas	Contagem	5	1	6
		% dentro de qPCRsanguesimnã	83,3%	16,7%	100,0%
Total	Detectou pelo menos um parasita	Contagem	35	16	51
		% dentro de qPCRsanguesimnã	68,6%	31,4%	100,0%
		Contagem	40	17	57
		% dentro de qPCRsanguesimnã	70,2%	29,8%	100,0%

qPCRsalmil * qPCRsanguemil Tabulação cruzada

			qPCRsanguemil		
			De 1 a 1000 parasitas	Maior que 1000 parasitas	Total
qPCRsalmil	De 1 a 1000 parasitas	Contagem	27	5	32
		% dentro de qPCRsalmil	84,4%	15,6%	100,0%
Total	Maior que 1000 parasitas	Contagem	10	4	14
		% dentro de qPCRsalmil	71,4%	28,6%	100,0%
		Contagem	37	9	46
		% dentro de qPCRsalmil	80,4%	19,6%	100,0%

Testes de chi-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Chi-quadrado de Pearson	1,037a	1	,308		
Correção de continuidade	,378	1	,539		
Razão de probabilidade	,988	1	,320		
Fisher's Exact Test				,423	,263
Associação Linear por Linear	1,015	1	,314		
N de Casos Válidos	46				

a. 1 células (25,0%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 2,74.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Tabulação cruzada

			pcrsal		
			Positivo	Negativo	Total
qPCRsalmil	De 1 a 1000 parasitas	Contagem	26	9	35
		% dentro de qPCRsalmil	74,3%	25,7%	100,0%
	Maior que 1000 parasitas	Contagem	9	5	14
		% dentro de qPCRsalmil	64,3%	35,7%	100,0%
Total		Contagem	35	14	49
		% dentro de qPCRsalmil	71,4%	28,6%	100,0%

Testes de chi-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Chi-quadrado de Pearson	.490a	1	.484		
Correção de continuidade ^b	.123	1	.726		
Razão de probabilidade	.478	1	.489		
Fisher's Exact Test				.503	.356
Associação Linear por Linear	.480	1	.488		
N de Casos Válidos	49				

a. 1 células (25,0%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 4,00.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Tabulação cruzada

			pcrsal		
			Positivo	Negativo	Total
qPCRsanguemil	De 1 a 1000 parasitas	Contagem	28	11	39
		% dentro de qPCRsanguemil	71,8%	28,2%	100,0%
	Maior que 1000 parasitas	Contagem	5	5	10
		% dentro de qPCRsanguemil	50,0%	50,0%	100,0%
Total	Contagem		33	16	49
	% dentro de qPCRsanguemil		67,3%	32,7%	100,0%

Testes de chi-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Chi-quadrado de Pearson	1,719a	1	,190		
Correção de continuidadeb	,871	1	,351		
Razão de probabilidade	1,642	1	,200		
Fisher's Exact Test				,261	,174
Associação Linear por Linear	1,684	1	,194		
N de Casos Válidos	49				

a. 1 células (25,0%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 3,27.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Resumo de modelo e estimativas de parâmetro

Variável dependente: qPCRsangue

Equação	Resumo do modelo					Estimativas do parâmetro
	R Quadrado	F	df1	df2	Sig.	Constante
Linear	,107	6,361	1	53	,015	437,841

A variável independente é qPCRsals.

Correlações

0,3271085447

		qPCRsals	qPCRsangue
Rô de Spearman	qPCRsals	1,000	,629**
			,000
		56	55
qPCRsangue	qPCRsangue	,629**	1,000
		,000	
		55	61

** . A correlação é significativa no nível 0.01 (2 extremidades).

