

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS SAÚDE E
BIOLÓGICAS**

Samuel Ricarte de Aquino

**Perfil clínico-laboratorial de pacientes com leishmaniose
visceral de uma região hiperendêmica do nordeste
brasileiro: uma série de casos**

Petrolina – PE
2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS SAÚDE E
BIOLÓGICAS**

Samuel Ricarte de Aquino

**Perfil clínico-laboratorial de pacientes com leishmaniose visceral
de uma região hiperendêmica do nordeste brasileiro: uma série de
casos**

Apresentação de Projeto de Pesquisa à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Petrolina, como requisito da obtenção de nota da Defesa da Dissertação de Mestrado, na linha de pesquisa Saúde, Sociedade e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Feliciano do Carmo.

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson da Costa Armstrong.

Petrolina – PE
2021

Aquino, Samuel Ricarte de
A Perfil clínico-laboratorial de pacientes com leishmaniose
657p visceral de uma região hiperendêmica do nordeste brasileiro: uma
série de casos / Samuel Ricarte de Aquino. - Petrolina - PE, 2021.
x, 71 f.: il. 7 ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e
Biológicas) - Universidade Federal do Vale do São Francisco,
Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Feliciano do Carmo.

1. Leishmaniose visceral. 2. Perfil clínico-laboratorial -
Pacientes. 3. Diagnóstico. I. Título. II. Carmo, Rodrigo Feliciano do.
III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 616.9364

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS SAÚDE E
BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Samuel Ricarte de Aquino

Perfil clínico-laboratorial de pacientes com leishmaniose visceral de uma região hiperendêmica do nordeste brasileiro: uma série de casos

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Da Saúde e Biológicas, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco. Aprovada em 12 de março de 2021.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Rodrigo Feliciano do Carmo.
(PPGCSB – UNIVASF)



Prof. Dra. Zulma Maria de Medeiros.
(Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz)



Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa.
(CPGCVS - UNIVASF)

Petrolina, 12/03/2021

Agradecimentos

Primeiramente a Deus e todos os Santos que me mantiveram firme na fé e no compromisso de realizar mais uma importante etapa da minha formação acadêmica. Em especial a Santa Clara, São Francisco e Padre Cícero por quem tenho devoção singular.

Aos meus pais, Silbênio e Geruza, a minha irmã Natalia que são os grandes tesouros de minha vida e a quem devo muito mais que agradecimentos. A eles que fizeram tudo pra que esse momento pudesse se concretizar em toda plenitude, todo meu amor e afeto.

Ao meu grande Amor, minha namorada Luana, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos. Aquela que me fortalece, que faz enfrentar as adversidades sem esmorecer, a ela meu Amor infinito.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Feliciano do Carmo que sempre acreditou e me guiou nessa árdua tarefa de fazer pesquisa clínica. A ele todo meu respeito, admiração e generosidade em repartir um pouco do seu conhecimento comigo durante essa jornada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Anderson da Costa Armstrong ao qual tenho também admiração profunda, minha gratidão pelas excepcionais aulas de epidemiologia e pela disponibilidade de sempre em ajudar na formulação das dissertações de pós-graduação.

Ao grupo de pesquisa em doenças infecciosas e negligenciadas (GPDIN), e para todos os companheiros de grupo de pesquisa que direta ou indiretamente ajudaram nas coletas e processamentos das amostras dos participantes da minha pesquisa.

A Profa. Zulma Medeiros e todos os pesquisadores a ela associados que fazem parte do Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz - Recife), pelo apoio no processamento das amostras de PCR da nossa pesquisa e pelo incentivo constante na realização de pesquisa no interior do estado do Pernambuco.

Aos médicos hematologistas Dr Lucyo Flávio Diniz, Dr Jandir Nicácio e Dr André Magalhães que foram de suma importância na realização dos mielogramas dos pacientes da pesquisa.

Ao Hospital Regional de Juazeiro-BA, ao HU/UNIVASF e a secretaria municipal de Petrolina meus agradecimentos pelo apoio logístico e para atendimento dos participantes da pesquisa.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), a CAPES e principalmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e Biológicas.

Aos membros da VIII GERES por encarar esse desafio de realizar pesquisa clínica com leishmaniose e nos oferecer todo suporte necessário.

Por fim, a todos os amigos queridos e demais pessoas que direta ou indiretamente ajudaram ou apoiaram a realização desse grande sonho, a vocês meu agradecimento especial e fraterno.

Mar Português

Ó mar salgado, quanto do teu sal

São lágrimas de Portugal!

Por te cruzarmos, quantas mães choraram,

Quantos filhos em vão rezaram!

Quantas noivas ficaram por casar

Para que fosses nosso, ó mar!

Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena.

Quem quer passar além do Bojador

Tem que passar além da dor.

Deus ao mar o perigo e o abismo deu,

Mas nele é que espelhou o céu

Fernando Pessoa

AQUINO, S. R. **Perfil clínico-laboratorial de pacientes com leishmaniose visceral de uma região hiperendêmica do nordeste brasileiro: uma série de casos** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e Biológica) - Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Petrolina-PE.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária, com distribuição mundial, onde 90% dos casos estão concentrados na Índia, Sudão, Nepal e Brasil. A cada ano ocorrem aproximadamente 300.000 casos de LV globalmente, com mais de 20.000 casos fatais. O Brasil é responsável por cerca de 96% dos casos das Américas, entre 2001 a 2017 foram notificados 57.582 casos de LV. O diagnóstico de LV é confirmado parasitologicamente pela demonstração de formas amastigotas nos esfregaços de medula óssea ou nos aspirados esplênicos ou pela demonstração de anticorpos utilizando testes sorológicos. O PCR quantitativo (qPCR) é uma ferramenta promissora com alta sensibilidade que pode contribuir para a identificação de casos assintomáticos ou de falha terapêutica. O objetivo do trabalho realizar descrição do perfil clínico-laboratorial de pacientes com leishmaniose visceral em região hiperendêmica do nordeste brasileiro, utilizando qPCR para monitoramento da doença. Foram incluídos pacientes com LV atendidos em serviços da rede pública de saúde dos municípios de Petrolina-PE e Juazeiro-BA. Os casos foram confirmados através de métodos parasitológicos e sorológicos. Foi realizado qPCR de sangue periférico em quatro tempos: pré-tratamento (T_0), pós-tratamento (T_1), 3 meses (T_2) e 6 meses (T_3) pós tratamento. Um total de 11 pacientes foram incluídos no estudo, dentre os quais 6 mantiveram o acompanhamento clínico. Houve prevalência do sexo masculino (82%) e média de 43,9 anos de idade. Os sintomas mais comuns foram perda de peso (100%), astenia (91%) e febre (81%). Os dados laboratoriais evidenciaram o padrão de pancitopenia com predomínio de anemia, leucopenia e plaquetopenia. Todos os casos incluídos apresentaram qPCR positivo em T_0 . Apenas um paciente apresentou qPCR negativo no T_1 , porém positivou no T_2 . Apenas 1 paciente voltou a positivar no T_3 . A taxa de recidiva foi de 33%. O qPCR de sangue periférico se mostrou uma ferramenta útil para o diagnóstico e monitoramento de recidiva de LV, principalmente com a necessidade de acompanhamento clínico pós-tratamento. Por ser um procedimento não invasivo, possui potencial de aplicação na prática clínica.

Palavras-Chave: leishmaniose visceral, PCR, diagnóstico, doença negligenciada, tratamento.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious-parasitic disease, with worldwide distribution, where 90% of cases are concentrated in India, Sudan, Nepal and Brazil. Approximately 300,000 cases of VL occur globally each year, with more than 20,000 fatal cases. Brazil is responsible for about 96% of cases in the Americas, between 2001 and 2017, 57,582 cases of VL were reported. The diagnosis of VL is confirmed parasitologically by demonstrating amastigote forms in bone marrow smears or splenic aspirates or by demonstrating antibodies using serological tests. Quantitative PCR (qPCR) is a promising tool with high sensitivity that can contribute to the identification of asymptomatic cases or therapeutic failure. The aim of the study was to realize a description of the clinical and laboratory profile of patients with visceral leishmaniasis in a hyperendemic region of northeastern Brazil, using qPCR to monitor the disease. VL patients seen at public health services in the municipalities of Petrolina-PE and Juazeiro-BA were included. The cases were confirmed using parasitological and serological methods. Peripheral blood qPCR was performed in four stages: pre-treatment (T0), post-treatment (T1), 3 months (T2) and 6 months (T3) after treatment. A total of 11 patients were included in the study, 6 of whom maintained clinical follow-up. There was a prevalence of males (82%) and a mean of 43.9 years of age. The most common symptoms were weight loss (100%), asthenia (91%) and fever (81%). Laboratory data showed a pattern of pancytopenia with a predominance of anemia, leukopenia and thrombocytopenia. All cases included had a positive qPCR at T0. Only one patient had a negative qPCR at T1, but it was positive at T2. Only 1 patient was positive again at T3. The recurrence rate was 33%. The peripheral blood qPCR proved to be a useful tool for the diagnosis and monitoring of VL recurrence, mainly with the need for post-treatment clinical follow-up. As it is a non-invasive procedure, it has potential for application in clinical practice.

Keywords: visceral leishmaniasis, PCR, diagnosis, neglected disease, treatment. .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Incidência de LV nas Américas em 2017	13
Figura 2 -	Formas amastigotas de <i>Leishmania ssp</i>	15
Figura 3 -	Ciclo de vida da Leishmaniose Visceral	16
Figura 4 -	Paciente adulto com LV.	19
Figura 5 -	Paciente criança com LV.	20
Figura 6 -	Fluxograma de atendimento dos casos de LV.	26
Gráfico 1 -	Quantificação de parasitas em sangue periférico de 6 pacientes em tratamento para LV no curso do acompanhamento por 6 meses.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fatores de gravidade relacionados a LV	18
Tabela 2 -	Seguimento da coleta dos PCR para LV.	32
Tabela 3 -	Dados Clínico-laboratoriais dos pacientes com LV	33
Tabela 4 -	Dados Laboratoriais dos pacientes com LV.	34
Tabela 5 -	Monitorização da carga parasitária kDNA em pacientes com LV.	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	EPIDEMIOLOGIA	12
2.2	ETIOPATOGENIA	14
2.2.	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	16
1		
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	17
2.4	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA LV	20
2.5	TRATAMENTO	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	25
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
6	RESULTADOS	31
7	DISCUSSÃO	37
8	CONCLUSÃO	42
9	REFERÊNCIA	43
10	APÊNDICES	53
	APÊNDICE A: questionário utilizado na pesquisa	53
	APÊNDICE B: manuscrito submetido e aprovado no The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (IF: 2.1 – Qualis A3)	55
11	ANEXOS	67
	ANEXO 1: Parecer consubstanciado do CEP	

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária, com distribuição mundial, onde 90% dos casos estão concentrados na Índia, Sudão, Nepal e Brasil (GUALDA et al., 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima entre 200.000 e 400.000 casos de LV e 20.000 a 40.000 mortes por ano (HOSSAIN et al., 2017; LINDOSO et al., 2018).

A LV é causada por diferentes espécies de *Leishmania spp.* em diferentes áreas geográficas. Na Índia, Nepal, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia LV são causadas por *Leishmania donovani*, apresentando um ciclo antroponótico onde o humano é o reservatório. No Brasil, a LV é causada por *Leishmania infantum*, apresentando um ciclo zoonótico onde os cães são os principais reservatórios periurbanos. Ambos *L. donovani* e *L. infantum* são transmitidos pelo mosquito *Phlebotomus spp.* (WHO, 2010).

O espectro da infecção por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum-chagasi* varia de assintomática a LV clássica, ou kala-azar, caracterizada por febre e por outros sintomas constitucionais, incluindo mal-estar, perda de apetite, astenia, esplenomegalia, hepatomegalia; e várias anormalidades laboratoriais, incluindo hipergamaglobulinemia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia, marcadores inflamatórios agudos elevados e aumento das enzimas hepáticas. Além disso, hiperpigmentação da pele pode ser observado em pessoas infectadas na Índia e em Bangladesh. A linfadenopatia é vista em algumas pessoas na África Oriental. A febre pode ser intermitente, com picos de temperatura duas vezes ao dia ou menos comumente contínuos (ARONSON et al., 2016).

Se não tratada, a LV é uma doença fatal. É uma das principais causas de mortalidade entre as doenças tropicais negligenciadas no Brasil (MARTINS MELO et al., 2016). Está fortemente associada à pobreza e responsável por altos custos diretos e indiretos. Apesar dos altos gastos ao sistema de saúde causada pela LV, tem havido poucas tentativas de quantificar seus impactos econômicos nas comunidades (MARINHO et al., 2015).

Atualmente, o diagnóstico de LV é confirmado parasitologicamente pela demonstração de formas amastigotas nos esfregaços de medula óssea ou nos aspirados esplênicos ou pela demonstração de anticorpos utilizando o teste rápido imunocromatográfico o rK39 (SUDARSHAN et al., 2015).

A quantificação da carga de *Leishmania* por PCR em tempo real no sangue periférico também pode servir como um método confiável, rápido e menos invasivo para o diagnóstico de LV e um método confiável para monitoramento da resposta ao tratamento medicamentoso em pacientes imunocompetentes (PIZZATO et al 2001, SUDARSHAN et al 2011, HOUSSAIN et al 2017 e SALAM et al 2010).

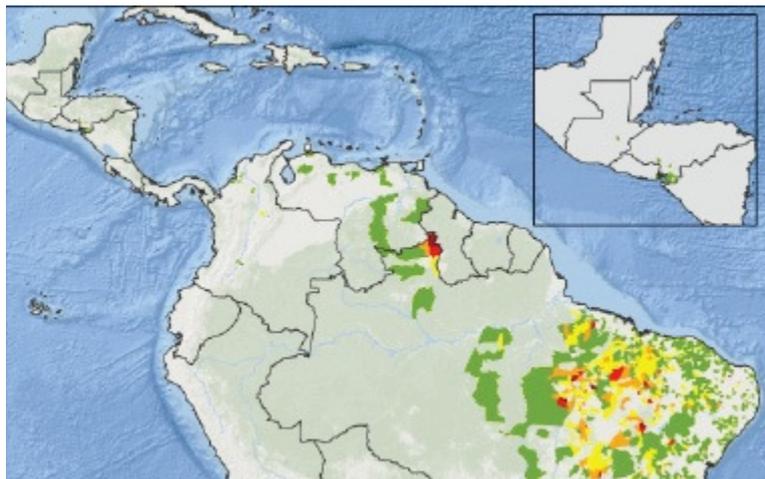
O PCR quantitativo (qPCR) é uma ferramenta promissora que pode ser empregada no diagnóstico de LV, pois distingue o paciente sintomático do assintomático e tem a capacidade de diagnosticar LV de forma precoce (SUDARSHAN et al., 2015). No presente estudo, procuramos realizar uma série de casos prospectiva analisando aspectos clínico-laboratoriais e a carga parasitária medida por qPCR em pacientes com LV sintomática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

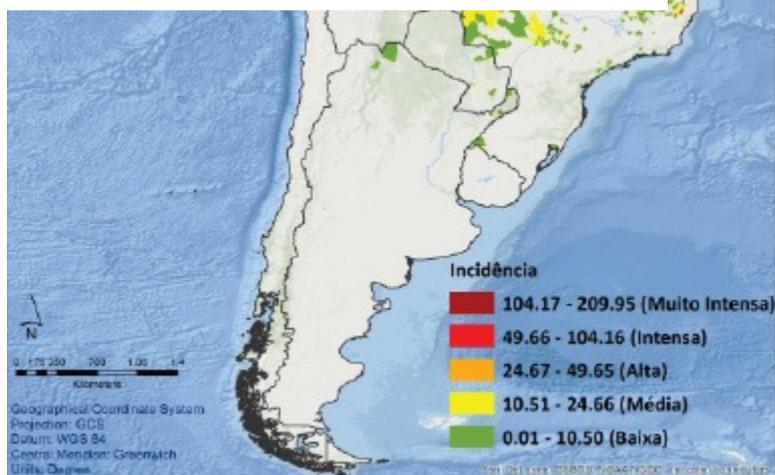
2.1 EPIDEMIOLOGIA

Segundo a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS), em seu informe epidemiológico das Américas 2019, a LV é endêmica em 12 países e no período de 2001-2017 foram registrados 59.769 casos novos nas Américas, resultando em uma média de 3.516 casos por ano (OPAS 2019). Cerca de 96% (57.582) dos casos ocorreram no Brasil, entretanto, países Sulamericanos como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela estão entre aqueles com maiores registros de casos (FIGURA 1). No ano de 2019 foram confirmados 1.241 casos de LV no Nordeste brasileiro (representa 49,07% de todos os casos do Brasil), já no estado do Pernambuco foram confirmados 105 casos em 2019, sendo que 87 destes casos foram notificados na microrregião do Vale do São Francisco e Araripe, sendo 12 casos diagnosticados em Petrolina-PE (BRASIL 2020).

Figura 1: Incidência de LV nas Américas em 2017



Fonte: Informe Epidemiológico, OPAS 2019.



Segundo o IBGE (2010), a macrorregião do baixo-vale do São Francisco, que engloba a Integração Pernambucana-Bahia (PEBA) Rede de Atenção que compreende os principais municípios de Petrolina (estado de Pernambuco) e Juazeiro (estado da Bahia). Essa região forma um cinturão hiperendêmico com taxas de incidência de LV de até 10 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2014).

Entre 2010 e 2016, 181 casos de LV foram confirmados em os municípios de Juazeiro e Petrolina, que respectivamente representaram 40,9% (n = 74) e 59,1% (n = 107). As médias do número de casos por ano durante o período estudado foram de 9,5 em Juazeiro e 14 em Petrolina. A análise das taxas de incidência dos dois municípios revelou variações de 2-8,6 casos por 100.000 habitantes em Juazeiro e de 2,8 a 6,1 casos por 100.000 habitantes em Petrolina (BRASIL, 2017).

Dados mais recentes do banco de dados SINAN demonstram que a taxa global de mortalidade por LV no Brasil variou entre 3,2% e 8,5% entre os anos de 2010 e 2016. A mortalidade foi observada em 5,4% dos casos em Juazeiro e 2,8% em Petrolina (BRASIL, 2017).

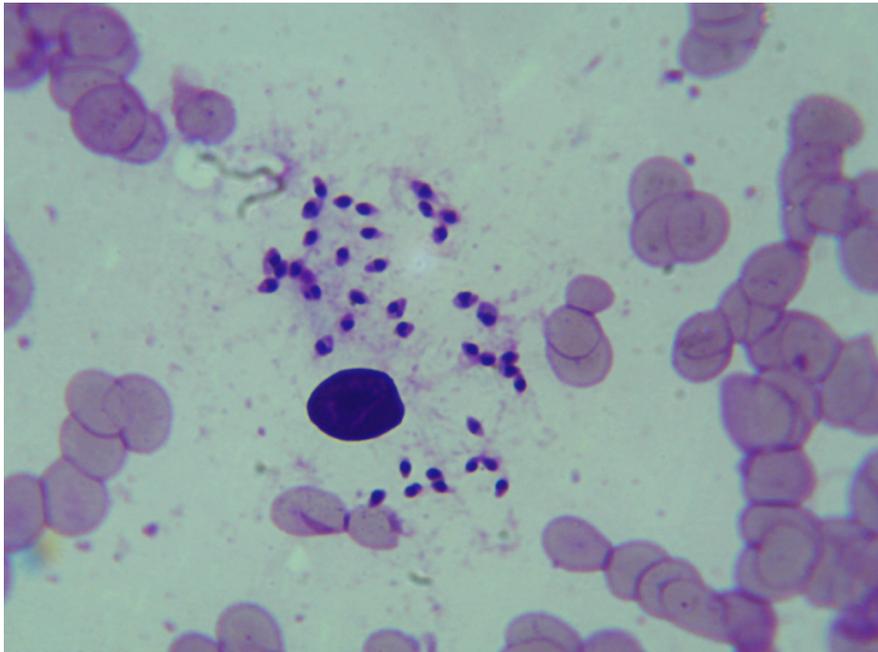
No Estado de Pernambuco, segundo dados do Departamento de Saúde Estadual, foram identificados 907 casos confirmados de VL entre 2006 e 2015. Destes, 49,6% estão concentrados em duas macrorregiões: o Vale do São Francisco e Araripe. Casos foram relatados nas 12 regiões de saúde (RES) Pernambuco e em 130 dos 185 municípios. Durante esse período, observou-se uma média anual de 90,7 casos. O RES com maior incidência foram VII com 65,88 casos por 100.000 habitantes, VIII com 48,86 casos por 100.000 e XI com 37,34 casos por 100.000 habitantes (SOUSA; RAMALHO; MELO, 2018).

2.2 ETIOPATOGENIA

No continente americano, a leishmaniose visceral mais frequentemente é causada por protozoários da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, visualizado na **Figura 2** (BERMAN, 2006). No Brasil normalmente é transmitida por insetos do gênero *Lutzomyia*. (ANTINORI et al., 2007; BOURGEOIS et al., 2008).

O agente causador da LV na África Oriental e na Índia é *L. donovani*, enquanto na Europa, norte da África e América Latina é *L. infantum*. No subcontinente indiano, a doença é uma zoonose transmitida exclusivamente pelo flebótomo *Phlebotomus argentipes* (HOSSAIN et al., 2017).

Figura 2: Formas amastigotas de *Leishmania ssp*

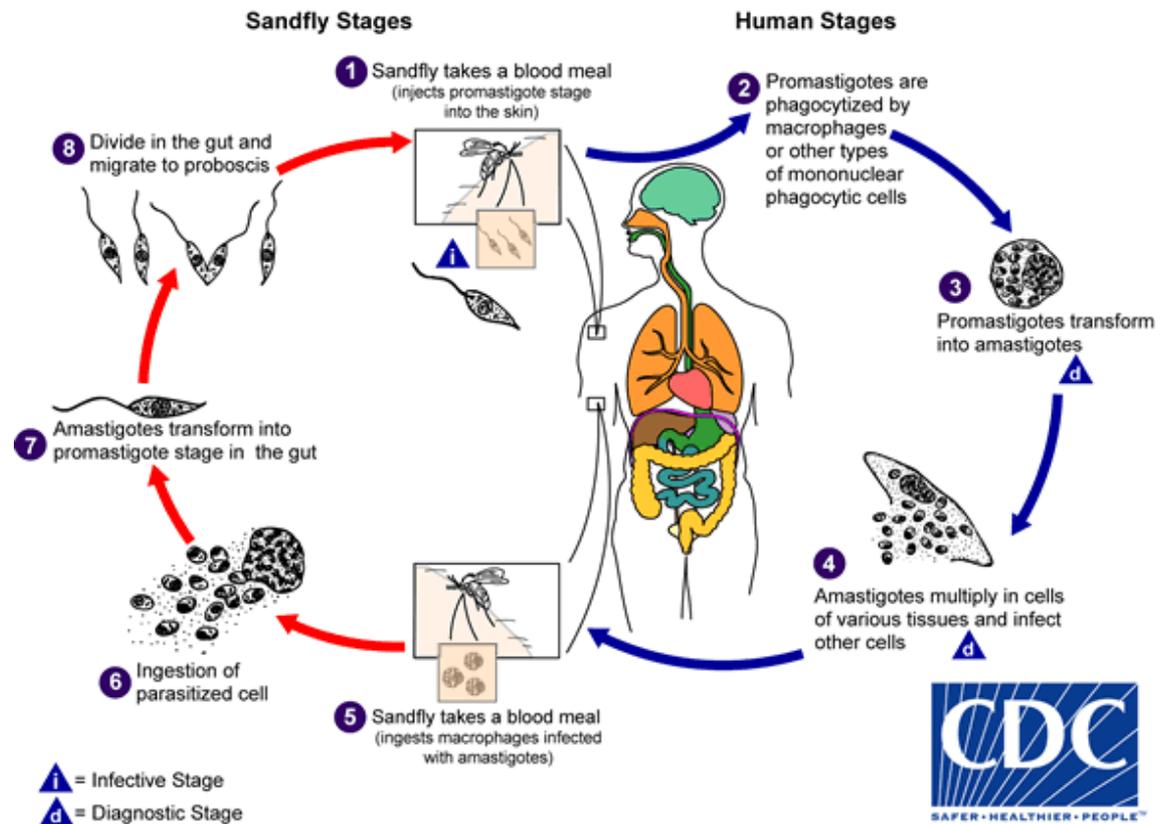


Fonte: banco de fotos do próprio autor.

Sua transmissão pode dá-se de humano para humano, ou de um reservatório animal, principalmente canídeo, para humanos através da picada de insetos vetores pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, como ilustrada na **figura 3** do ciclo de vida da LV (CARVALHO et al., 2007; DANTAS TORRES; FIGUEIREDO; BRANDÃO FILHO, 2006). Existem outras formas de transmissão são: congênitas, transfusionais e pelo compartilhamento de seringas contaminadas. Esta última forma de transmissão tem sido recentemente referenciada como a principal transmissão de LV em países do

Mediterrâneo entre usuários de drogas endovenosas (CRUZ; NIETO; MORENO, 2006).

Figura 3. Ciclo de vida da Leishmaniose Visceral



Fonte: CDC 2010

2.2.1 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LV

A susceptibilidade às doenças infecciosas envolve um processo complexo que depende da relação entre a destruição do microrganismo invasor e a resposta imune do hospedeiro. Fatores genéticos do hospedeiro desempenham uma função importante no controle da infecção e desenvolvimento da doença (ABBEL, 1997). A variabilidade na gravidade da doença entre indivíduos da mesma região infectados pela mesma espécie de parasita pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (BLACKWELL, 1996).

Segundo Jawed et al. (2019), o conjunto de células T têm papel importante nas doenças inflamatórias e desempenham papel vital para prevenir a ativação hiper imune, autoimunidade, imunodeficiência e a execução completa de doenças

infecciosas que podem resultar no aparecimento dessas condições. Na LV, descobriu-se que o estabelecimento bem-sucedido da infecção aumenta a população de células Th2 e Treg que secretam de forma aumentada IL-10 e citocinas como TGF- β que desenvolvem doença imunossupressora grave. Por outro lado, a população elevada de linfócitos Th-17 e as células Th1 secretam várias citocinas pró-inflamatórias que resistem ao início da infecção (JAWED et al., 2019).

Kip et al. (2015) corrobora ao afirmar que a recuperação da LV está ligada principalmente a resposta imune mediada pelos linfócitos T CD4. Mais especificamente, a resposta Th1 é geralmente associada a ativação dos macrófagos, ocasionando resistência do hospedeiro e proteção contra parasitas de Leishmania, levando ao controle da doença. Por outro lado, a resposta Th2 está associada com diminuição da atividade dos macrófagos, levando a progressão da doença (KIP et al., 2015).

As citocinas mais estudadas são as pró-inflamatórias IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e os fatores regulatórios a interleucina-10 (IL-10). O aumento das concentrações de IL-10 em pacientes com LV foi confirmada em vários países, incluindo, Índia, Brasil e Etiópia (KHOSHDEL et al., 2009). Queda dos níveis de IL-10 foram encontrados após o sucesso do tratamento (CALDAS et al., 2005). Curiosamente, A IL-10 mostrou-se positivamente correlacionada com a carga parasitária no sangue de pacientes com LV (DUTHIE et al., 2014). O TNF- α é uma citocina produzida principalmente por macrófagos ativados e foram significativamente aumentadas pacientes com LV ativa (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006).

Embora seja frequentemente assumido que a imunossupressão ocorre durante a atividade leishmaniose visceral em humanos, o sistema imunológico é de fato altamente ativado e produz citocinas ativadoras de macrófagos, como IFN- γ e TNF- α , bem como citocinas desativadoras de macrófagos, como IL-10 e TGF- β . Esses processos de alta ativação e desativação provavelmente ocorrem principalmente no baço e no fígado, e é provável que o sangue periférico as células mononucleares respondem mal aos antígenos de Leishmania porque o antígeno está envolvido os linfócitos ficam presos nos órgãos linfoides (GOTO; PRIANTI, 2009).

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas clássicas associadas a LV são: febre prolongada, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Infelizmente, a maioria dos casos apresenta manifestações atípicas dificultando o diagnóstico clínico da doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; ORSINI et al., 2012; COTA et al., 2014). Na infância, o quadro clínico é semelhante ao quadro em adultos, onde os principais sinais e sintomas descritos são: febre, palidez, aumento do volume abdominal, anorexia, perda de peso, desnutrição, edema, hepatomegalia e esplenomegalia (REY et al 2005).

Diversos fatores clínicos e laboratoriais são descritos como associados a maior gravidade e mortalidade dos pacientes com LV e são descritos no manual “Leishmaniose Visceral – Recomendações para redução da mortalidade” do MS (2011) e apresentados na **Tabela 1**.

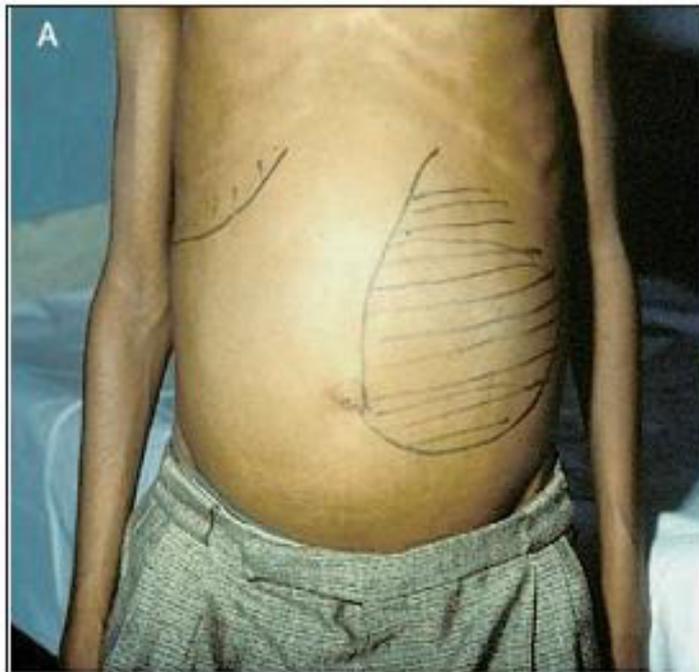
TABELA 1: Fatores ligados a mortalidade por LV. 13.

Fatores associados
Idade inferior a 1 ano
Idade superior a 40 anos
Infecção bacteriana
Recidiva ou reinfeção da LV
Presença de náuseas e vômitos
Edema
Febre por mais de 60 dias
Icterícia
Fenômenos hemorrágicos
Sinais de toxemia
Desnutrição grau III
Comorbidades
Leucócitos abaixo de 1.000 e acima de 7.000 cél/mm ³
Neutrófilos abaixo de 500 cél/mm ³
Plaquetas abaixo de 50.000/mm ³
Creatinina acima do valor de referência
Atividade de protrombina abaixo de 70% e INR > 1,14
Bilirrubinas acima do valor de referência
Enzimas hepáticas (AST, ALT) 5 vezes acima do valor de referência
Albumina menor que 2,5 g/dL

Fonte: Manual de Tratamento de LV, MS 2011

Segundo Dayakar et al. (2019), Febre, perda de peso, anemia, pancitopenia, hiperpigmentação da pele e hepatoesplenomegalia são algumas das manifestações de LV. Crianças menores de a idade de 1 ano e adultos acima de 50 anos são altamente suscetíveis a LV (Figura 4). Fatores genéticos do hospedeiro suscetível, estado nutricional, especialmente desnutrição e imunológico a supressão melhora o resultado clínico da doença (DAYAKAR et al., 2019).

FIGURA 4: Paciente adulto com LV.



Fonte: BRASIL, MS 2011

A hipoalbuminemia observada na LV está associada com edema e outras características de desnutrição (Figura 5). A diarreia pode ser resultado da parasitização e ulceração intestinal. A função hepática pode ser normal ou alterada, em estágios posteriores da doença a produção de pró-trombina diminui. Com a progressão da doença, a LV não tratada pode causar grave sangramento devido à trombocitopenia. Além disso, a diminuição dos leucócitos faz com que os pacientes com LV se comportem como imunossuprimidos e infecções bacterianas acabam sendo causa de morte nesses pacientes (NYLÉN; KUMAR, 2012).

FIGURA 5: Paciente criança com LV.



Fonte: BRASIL, MS 2006

2.4 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA LV

Os métodos parasitológicos (observação na microscopia ou cultura) são considerados como o padrão-ouro já que constata a presença do parasita, mas a utilização de métodos de coleta invasivos é uma limitação dos mesmos (BABIKER, 2007). Mesmo assim, é indiscutível que a especificidade deste teste é alta, mas a sensibilidade varia dependendo do tipo de amostra, ou seja, 90-93% em aspirado

esplênico; 53-86% em medula óssea e, 53-65% em linfonodos (CHAPUIS et al., 2007).

Considerando o diagnóstico através dos métodos sorológicos, o teste de Aglutinação Direta (DAT) e os que utilizam o antígeno recombinante rK39 são os mais utilizados na prática clínica nos serviços de saúde. Estudos de Meta-análise verificaram sensibilidades e especificidades semelhantes em ambos os testes, sendo sensibilidade variando de 94-95% e especificidade de 86-91% (CHAPUIS et al., 2007; CHAPUIS et al., 2006; SUNDAR et al., 2010; MAIA; GUILHEM; FREITAS, 2008; COTA et al., 2017). Já nos pacientes com HIV o desempenho destes testes diminui significativamente, variando sua sensibilidade de 66 a 100% e especificidade de 67 a 96,2%. Em geral, são métodos simples, não invasivos e sensíveis. No entanto, não conseguem distinguir infecções passadas e, além disso, deve-se considerar que nos pacientes imunossuprimidos a concentração de anticorpos é baixa gerando assim resultado falso-negativo (SUNDAR et al., 1998; ZIJLSTRAT et al., 2001; ABBASS et al., 2015).

Os métodos moleculares que se utilizam da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), mostram-se com bom desempenho tanto no diagnóstico quanto ao monitoramento e ao seguimento de pacientes co-infectados, principalmente, no acompanhamento da eficácia da terapia e em casos de recidivas (ANTINORI et al., 2007). No entanto, seu desempenho depende de fatores inerentes ao protocolo de extração de DNA, tipos de iniciadores, genes alvos, tipos de amostras e tipo de “primer” utilizados (MOLINA et al., 2003; RUITER et al., 2014; ORSINI et al., 2012).

Silva et al. (2013) afirma que os testes de imunoensaios têm limitações. O indirect fluorescent antibody test (IFAT) tem baixa especificidade, apresenta reações cruzadas, e requer pessoal treinado. O DAT tem boa sensibilidade e especificidade, e é caracterizado por um melhor desempenho do que o IFAT, mas requer equipamentos, como placas de microtitulação e micropipetas, profissionais bem treinados e controles de qualidade regulares (CHAPPUIS et al., 2007).

O teste imunocromatográfico rK39 é considerado um método excelente para aplicação de campo, mas mostra reatividade cruzada com malária, febre tifóide e tuberculose (CHAPPUIS et al., 2006).

O teste de aglutinação de látex (KAtex) foi introduzido pela Kalon Biological Ltd para a detecção de Leishmania antígenos na urina de pacientes afetados com LV ativa. Em alguns estudos, este teste mostrou sensibilidade de 68-100% e

especificidade de aproximadamente 64-100% (SALAM et al., 2011; SUNDAR et al., 2005). KAtex teve melhor desempenho do que qualquer outro teste sorológico. No entanto, alguns resultados negativos para KAtex podem ser encontrados nos casos de baixa parasitemia, o que representa uma limitação deste teste no que diz respeito à detecção de baixos níveis de antígenos para *Leishmania* na urina (SALAM et al., 2011).

O ensaio kDNA PCR se mostra uma técnica útil quando o sangue periférico é utilizado. Diferentes resultados foram obtidos utilizando diferentes iniciadores de kDNA PCR em amostras de sangue periférico, e identificando o DNA de *Leishmania sp* em portadores assintomáticos e co-infectados (ALONSO et al., 2010; SRIVASTAVA et al., 2011; COTA et al., 2014; COTA et al., 2017; ORSINI et al., 2012). Segundo Riera et al. (2004), é possível diagnosticar infecção para VL / HIV várias semanas antes do aparecimento clínico da doença.

Segundo Ruitter et al. (2014) há importância e necessidade de conhecer a eficiência destes testes moleculares frente a detecção de LV em pacientes com HIV/AIDS em protocolos definidos. As pesquisas tentam identificar outros métodos indiretos que mantenham boa especificidade e sensibilidade, que não possuam caráter invasivo e que possam fornecer outras informações relevantes tal qual prognóstico (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Diagnósticos baseados em métodos de biologia molecular são muito promissores, tanto em imunocompetentes quanto em infectados pelo HIV. Em geral, eles têm grande sensibilidade e especificidade e podem ser realizados com uma variedade de amostras: medula óssea, linfonodos, baço e sangue periférico (LINDOSO et al., 2018; LIMA et al., 2017). Reação de cadeia de Polimerase (PCR) é o principal método, com grande sensibilidade e especificidade. Desempenho da PCR depende das amostras e primers usados para amplificar seqüências de DNA (LIMA et al., 2017). A amplificação de regiões de kDNA parece ser uma boa opção e, provavelmente, o DNA alvo mais sensível (LINDOSO et al., 2018).

Nenhum dos métodos diagnósticos, tanto parasitológicos diretos como sorológicos, não se mostraram eficientes para controle de resposta ao tratamento e de cura. Assim, não podem ser utilizados como critério para suspensão precoce do tratamento evitando assim complicações associadas (LACHAUD et al., 2001).

Nessa lacuna metodológica os testes moleculares, mais específicos, possuem um potencial teórico de quantificação parasitária por determinados métodos que porventura podem representar associação diagnóstica com o desfecho clínico (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

2.5 TRATAMENTO

O panorama de drogas disponíveis para LV é limitada aos antimoniais (estibogluconato de sódio [SSG] e antimoniato de meglumina [MA]), paromomicina (PM), miltefosina oral (MF), e anfotericina B, esta última em duas formulações, a forma de desoxicolato livre e formulações lipídicas, com anfotericina B lipossomal (LAB) entre as mais recentes (ALVES et al 2018).

Os tratamentos de LV progrediram muito nos últimos 15 anos. As opções de tratamento passaram de uma dependência de monoterapia com antimoniato para o desenvolvimento de novos tratamentos, incluindo diferentes formulações lipídicas de anfotericina B, a droga oral MF, e PM injetável (ALVES et al 2018; CHAPPIUS et al 2007; SUNDAR et al 2000).

Nos últimos anos, dados clínicos mostraram que o mesmo medicamento e o regime de dosagem pode não ter a mesma eficácia, dependendo da área geográfica de uso. Além disso, as particularidades das populações de pacientes, como genética e características antropométricas, estado imunológico e também o contexto social e epidemiológico, pode influenciar o resultado (RIJAL et al 2003; ALVES et al 2018; THAKUR et al 1999). Apesar das melhorias alcançadas na última década no desenvolvimento de novos medicamentos, a necessidade de uma terapia inovadora que seja segura e possa ser implantado em áreas remotas onde ocorre LV, de preferência com eficácia pangeográfica, é muito necessário. Além disso, as características de cada medicamento podem determinar quais devem ser escolhidos no nível individual ou no coletivo de uso (WHO 2005).

Na América Latina, a terapia de primeira linha é o MA por 20 a 30 dias, com base nas diretrizes da OMS. Um grande ensaio clínico multicêntrico randomizado foi patrocinado pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS) para avaliar a segurança e eficácia dos tratamentos recomendados de anfotericina B desoxicolato (1 mg / kg / dia i.v. por 14 dias), LAB (3 mg / kg / dia i.v. por 7 dias, dose total de 21 mg / kg), e uma combinação de LAB (10 mg / kg em uma dose única i.v.) e MA (20mg Sb5 / kg / dia i.v. por 10 dias) em comparação com o tratamento de primeira linha de MA (20

mg Sb5 / kg / dia i.v. por 20 dias). O objetivo final era fornecer ao Ministério da Saúde evidências para orientar a mudança de política pública (ROMERO et al 2017).

A partir dos dados de segurança obtidos na análise deste ensaio, uma mudança de política foi implementada, com LAB substituindo anfotericina B desoxicolato como tratamento de segunda linha, devido à alta toxicidade deste último. As taxas de eficácia em 6 meses foram de 77,5% para MA, 87,2% para LAB e 83,9% para LAB-MA. No entanto, LAB era mais seguro do que os dois braços envolvendo MA. Com base nesses resultados, o Ministério da Saúde está avaliando uma nova mudança na política pública de tratamento de LV para que LAB seja o tratamento de primeira linha no Brasil e MA o tratamento de segunda linha (ROMERO et al 2017; BORGES et al 2017).

No Brasil, as opções de tratamento são muito limitadas. MA permanece por enquanto o tratamento de primeira linha, apesar de seu perfil altamente tóxico, causando descontinuação em mais de 10% dos casos em tratamento (SILVEIRA et al 2015). Embora não tenha sido estabelecida, a toxicidade antimonial pode ser um dos fatores associados à alta taxa de mortalidade no Brasil, uma das mais altas do mundo (MARTINS-MELO et al 2014).

A LAB é a segunda linha tratamento e tem amplas indicações, utilizada em pelo menos 30% dos casos de LV. Além disso, os pacientes que não toleram MA devem ser transferidos para LAB, aumentando seu uso para mais de 40% dos pacientes com LV no país. Uma análise de custo-efetividade das opções de tratamento poderia fornecer informações adicionais para informar a tomada de decisão (CARNIELLI et al 2014).

Uma potencial utilidade da MF para o tratamento da LV no Brasil ainda não está clara. Um ensaio clínico para avaliar a eficácia e segurança de MF foi realizado em 2005 em Teresina e Montes Claros, embora nunca tenha sido publicado, mostraram eficácia insatisfatória de 43% em 6 meses em pacientes tratados com 2,5 mg / kg / dia por 28 dias e de 67% em pacientes tratados com o mesmo regime por 42 dias, o que resultou no encerramento antecipado do estudo. Esta menor taxa de cura observada no Brasil em comparação com os resultados obtidos na Índia pode ser atribuída a uma menor suscetibilidade das espécies de parasitas da LV no Brasil (CARNIELLI et al 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Descrição do perfil clínico-laboratorial de pacientes com leishmaniose visceral em região hiperendêmica do nordeste brasileiro.

3.2 Objetivos específicos

- a) Descrever as características clínicas e laboratoriais de pacientes com LV;
- b) Realizar quantificação da carga parasitária através de qPCR dos pacientes com LV nas seguintes situações: pré tratamento, pós tratamento, 3 meses após final do tratamento e 6 meses após final do tratamento.
- c) Verificar a aplicabilidade da quantificação da carga parasitária determinada por qPCR no monitoramento de recidiva clínica;

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Área de estudo

O estudo foi realizado na macrorregião de Petrolina - PE e Juazeiro - BA, localizada na Mesorregião do Rio São Francisco (IBGE, 2010).

População de estudo e período de referência

O estudo foi desenvolvido com pessoas encaminhadas pelos serviços do Programa de Atenção Primária a Saúde e pela Vigilância Epidemiológica dos estados de Pernambuco e Bahia, na região que compreende os municípios pertencentes à mesorregião do Vale do São Francisco e foram atendidas no ambulatório de infectologia da Prefeitura de Petrolina (SEINPe) bem como pessoas atendidas no Hospital de Alta Complexidade da Rede de Atenção a Saúde Pernambuco / Bahia, Hospital Universitário – UNIVASF, sintomáticas para Leishmaniose Visceral. Foram entrevistadas todas as pessoas atendidas na unidade hospitalar (em consultório médico com cadeiras e macas apropriadas respeitando a privacidade e conforto do paciente no momento da realização da entrevista e coleta de amostras), e no ambulatório do estudo (que é consultório médico com cadeiras e macas apropriadas

para realização da entrevista e coleta das amostras, de modo a garantir a segurança e privacidade dos participantes, sigilo e confidencialidade das informações colhidas), de ambos os sexos, com idade igual ou maior que 18 anos que aceitem participar da pesquisa e que, através de critérios de inclusão, se enquadrem no estudo (FIGURA 6).

FIGURA 6. Fluxograma de atendimento dos casos de LV.



Desenho de estudo

Foi realizado estudo de série de casos, visando incluir casos novos já identificados de infecção por *Leishmania* bem como o seguimento dessas pessoas durante o tratamento hospitalar e/ou ambulatorial com o seguimento ambulatorial por um período não inferior a seis meses.

Amostra

A amostra foi composta por pacientes confirmados de LV na Macrorregião de Petrolina-PE e Juazeiro-BA segundo MS 2019, e foram incluídos em um grupo de estudo onde verificaremos os critérios de gravidade e indicação de tratamento medicamentoso segundo o manual de recomendações clínicas para o tratamento de Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (MS) de 2016 que estabelece o uso da anfotericina B lipossomal para pacientes com critérios de gravidade (que foram descritos abaixo) e Antimoniato Pentavalente para os pacientes sem critérios de gravidade. Os pacientes incluídos no estudo apresentaram quadro clínico-laboratorial suspeito de LV que preencherem os critérios de seleção e inclusão constantes deste protocolo, que fizeram a leitura do Termo de Consentimento Livre

e Esclarecido e, que após aceitarem participar do estudo, registrarem seu aceite através da assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido.

Protocolo de investigação de Leishmaniose Visceral

Avaliação epidemiológica e clínica

As seguintes informações foram obtidas na entrevista com as pessoas e registradas em formulário próprio, bem como através de revisão de prontuário médico após autorização prévia do TCLE: procedência (cidade onde mora), cor da pele; antecedentes médicos (diagnóstico de patologias crônicas e/ou em tratamento), co-infecção com HIV e Hepatite C, data de nascimento e idade (em anos); sexo; presença e tempo de febre; astenia, sangramentos, desconforto abdominal, diarreia, perda de peso; se já fez uso de anfotericina B ou Glucantime; presença e mensuração (em centímetros) de hepatomegalia (medido através de fita métrica a partir do rebordo costal direito na linha hemi-clavicular direita) ou esplenomegalia (medido através de fita métrica a partir do rebordo costal esquerdo na linha hemi-clavicular esquerda); palidez cutânea; lesões em pele ou mucosa.

Avaliação laboratorial

Contagem dos últimos 30 dias de leucócitos, neutrófilos e linfócitos; hemoglobina, plaquetas, AST, ALT, Fosfatase alcalina, GGT, ureia, creatinina; albumina sérica, bilirrubina, globulina, sódio, potássio, TP, INR, anti-HIV, anti-HCV. Todos estes exames citados anteriormente foram realizados por todos os pacientes atendidos e incluídos no projeto de pesquisa e seus resultados impressos foram entregues ao paciente. A coleta do PCR foi realizada pré tratamento da LV, pós-tratamento, 3 e 6 meses após o tratamento farmacológico respectivamente.

Diagnóstico de LV

Aspirado de Medula Óssea: Realizado por médico hematologista com experiência na coleta de aspirado medular. A coleta foi realizada preferencialmente na crista íliaca posterior ou no manúbrio esternal sob anestesia local com Lidocaína 2% por via subcutânea a critério do médico e da pessoa a ser submetida ao procedimento. Após aspirado foi realizado esfregaço em lâmina para posterior coloração com método *Giemsa* e análise citológica por dois hematologistas individualmente. Este exame é realizado na rotina do diagnóstico de LV, portanto, foi

realizado independentemente dos pacientes serem incluídos ou não nesse projeto de pesquisa.

Teste de imunocromatografia: utilizando o rK39 (rK39) - O teste rápido utilizará uma membrana (inBios, Seattle, WA, USA) como suporte para o antígeno rK39 e uma gota de soro na base da membrana, sendo absorvido, e acrescenta-se três gotas de tampão de teste. Essa mistura então migra pela membrana por ação capilar. Após 10 minutos surge uma linha vermelha superior indicando a presença de IgG (controle), o que valida o kit. O aparecimento de outra linha vermelha abaixo indicará a presença de IgG anti-rK39, sendo considerado nesse caso um resultado positivo. Este exame é realizado na rotina do diagnóstico de LV, portanto, foi realizado independentemente de os pacientes serem incluídos ou não nesse projeto de pesquisa.

qPCR: a quantificação da carga parasitária foi realizada através de PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan (Thermo Fisher) seguindo o protocolo de Dantas-Torres et al. (2017). O DNA genômico foi obtido através de sangue total utilizando a técnica de salting out adaptada de Miller (1988). Os ensaios foram realizados por PCR em tempo real Line Gene (Bioer Technology, China) no Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/Recife. Este exame não é realizado na rotina do diagnóstico de LV, portanto, somente foi realizado nos pacientes incluídos nesse projeto de pesquisa. A carga parasitária por qPCR foi realizada nos seguintes tempos: pré-tratamento (T_0), pós-tratamento (T_1), 3 meses (T_2), e 6 meses (T_3) pós-tratamento.

Critérios de inclusão

Idade igual ou maior que 18 anos, ter suspeita clínico-laboratorial de Leishmaniose Visceral definida por febre associada à citopenias (anemia e/ou, leucopenia e/ou plaquetopenia) e/ou visceromegalias (hepatomegalia e/ou esplenomegalia).

Critérios de Exclusão

Foram excluídos do projeto de pesquisa os pacientes que não realizaram as coletas de PCR para LV durante execução do estudo.

Estratégia de operacionalização da pesquisa

As pessoas atendidas no ambulatório de infectologia da Prefeitura de Petrolina-PE e Hospital Universitário – UNIVASF (que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Consentimento Livre e Esclarecido foram submetidas a exames de triagem para LV com testes sorológicos para pesquisa de anticorpos (rk39 e/ou Aspirado de Medula Óssea).

Depois de verificado que atendem aos critérios de inclusão da pesquisa, foram esclarecidos sobre a finalidade do estudo, por meio do *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*. Depois dos esclarecimentos que se fizeram necessários, a pessoa usuária foi convidada a assinar o *Consentimento Livre e Esclarecido*.

Uma vez autorizada a pesquisa pela pessoa, o pesquisador aplicou o roteiro padronizado do questionário e buscou dados no prontuário médico. Na seqüência, o próprio pesquisador responsável, foi realizado aspirado de medula óssea (em sala apropriada no ambulatório de infectologia de Petrolina ou na sala de procedimentos do HU/UNIVASF) pelo médico hematologista colaborador com coleta de 4ml de medula óssea em tubo com EDTA para PCR e esfregaço em lâmina para análise citológica. Posteriormente o pesquisador disponibilizou ao entrevistado tubos plásticos, identificado com o nome, e/ou o número do registro do prontuário hospitalar e orientou sobre a realização de uma punção venosa periférica, seguindo as normas de biossegurança. Dois tubos foram usados para coleta de amostras de sangue, cada um com capacidade para 5mL, sendo um deles seco (para sorologias) e outro com EDTA (para PCR), onde foram coletados 4mL de sangue para cada tubo.

O material coletado (sangue e medula) foi acondicionado em caixa térmica sob refrigeração e foi enviado, no mesmo dia da coleta, Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF em Petrolina para a realização dos exames sorológicos e o PCR foi enviado para realização no Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz - Recife). Os resultados estavam disponíveis em cerca de cinco dias. Foram enviadas duas cópias impressas e assinadas dos laudos aos locais de origem, uma para a pessoa e outra anexada ao prontuário dela. Além da pessoa, o médico(a) assistente foi informado(a).

Os casos que apresentaram sintomas clínicos e positividade para exames de rK39 e/ou mielograma para LV foram encaminhados para tratamento medicamentoso com Anfotericina B lipossomal 4mg/kg/dia por 5 dias ou com Antimoniato Pentavalente de meglumina 20mg/kg/dia por 20-30 dias no HU/UNIVASF ou tratamento ambulatorial.

Definição de caso de LV

Foi considerado caso de *Leishmaniose Visceral* aquele que apresente pelo menos um dos testes positivo para LV acrescido de quadro clínico compatível.

Definição de recidiva de LV

Recidiva – recrudescimento da sintomatologia, em até 12 meses após cura clínica.

Coleta e análise dos dados

Para todas as pessoas que concordarem em participar da pesquisa foram aplicados questionários padrão, com identificação, antecedentes pessoais e interrogatório sintomatológico. Foi realizada uma análise descritiva com representação das médias, medianas e freqüências relativas e absolutas.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEP/UNIVASF) sob o CAAE: 99849718.2.0000.5196, na data de 25 de fevereiro de 2019.

6 RESULTADOS

Neste estudo, foram incluídos 11 pacientes no presente estudo, sendo 08 pacientes do Estado do Pernambuco (04 procedentes de Petrolina, 01 de Lagoa

Grande, 01 de Parnamirim, 01 de Cabrobó e 01 de Trindade), bem como 03 pacientes do estado da Bahia (02 procedentes de Juazeiro, 01 de Sento Sé). Destes, 3 pacientes (27%) são oriundos de zonas urbanas e 8 pacientes (73%) de zonas rurais dos municípios descritos. Os pacientes foram diagnosticados com LV principalmente nas unidades hospitalares da macrorregião de Petrolina-PE e Juazeiro-BA (10 pacientes, cerca de 91% dos casos), apenas 01 foi diagnosticado inicialmente no ambulatório de infectologia de Petrolina-PE.

Todos os 11 pacientes incluídos no protocolo da pesquisa realizaram coleta do PCR para LV nos momentos pré-tratamento e pós-tratamento. Foram realizados em todos os pacientes pelo menos um exame diagnóstico para LV, rK39 (100% dos pacientes), Mielograma (73% dos pacientes).

Durante o seguimento ambulatorial, 06 pacientes continuaram a realizar as consultas e exames de seguimento, todos os 06 pacientes realizaram coleta do PCR para LV no 3º mês após final do tratamento e 05 pacientes realizaram coleta do PCR para LV no 6º mês após o final do tratamento (TABELA 2). Os 05 pacientes que não mantiveram o acompanhamento ambulatorial relataram diversos motivos para o abandono como baixas condições econômicas para se deslocarem às consultas médicas, outros pacientes relataram quadro de depressão, dependência química e alcoólica.

Tabela 2: Acompanhamento da adesão dos pacientes ao longo do estudo.

Paciente	Pré- tratamento	Pós- tratamento	3 meses	6 meses
1	X	X	X	X
2	X	X	X	X
3	X	X	X	X
4	X	X	X	X
5	X	X	X	X
6	X	X	X	
7	X	X		
8	X	X		
9	X	X		
10	X	X		
11	X	X		
Total	11	11	6	5

Fonte: Dados do Autor

Ao analisar as características clínicas observamos uma frequência significativamente maior dos casos de LV no sexo masculino com 9 pacientes (82%), com prevalência em pacientes que se identificaram como negros com 5 pacientes (46%) e média de idade de 43,9 anos (TABELA 3). Os sintomas mais comuns foram perda de peso identificado em 11 pacientes (100%), astenia em 10 pacientes (91%) e febre 9 pacientes (81%), porém desconforto abdominal em 7 pacientes (64%), diarreia 4 pacientes (36%) e sangramentos em 4 pacientes (36%) também foram relatados. A média de dias de febre até o diagnóstico de LV foi de 53 dias, nenhum dos pacientes foram diagnosticados co-infecções com HIV e/ou Hepatite C. As principais co-morbidades identificadas foram Hipertensão arterial em 2 pacientes (18%), diabetes em 2 pacientes (18%), doença hepática em 1 paciente (9%) e doença cardíaca em 1 paciente (9%).

Em relação aos sinais aferidos durante exame físico: a palidez cutânea 8 pacientes (73%) e icterícia 6 pacientes (55%) foram os mais prevalentes, tamanho do fígado teve média 5,5 cm e o tamanho do baço 11,2 cm. O tratamento medicamentoso mais utilizado foi Anfotericina B Lipossomal em 9 pacientes (82%) e o Antimoniato Pentavalente de Meglumina em 2 pacientes (18%), evidenciando resposta adequada do tratamento clinicamente curado em 9 pacientes 82% dos casos, em 1 paciente (9%) foi considerado parcialmente curado e ocorreu 01 óbito durante esse período correspondendo a 9% de mortalidade.

Tabela 3: Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com LV incluídos no estudo.

Variável	Caracterização Clínico-laboratorial (Média)	Desvio-padrão
	<i>(Dados pré-tratamento)</i>	
Idade	43,9	13,5
Sexo	82%:18 % (M:F)	
Cor da pele	(%)	
Branca	3 (27%)	
Parda	3 (27%)	
Negro	5 (46%)	
Febre	9 (82%)	
Nº de dias	53	23,1

Astenia	10 (91%)	
Desconforto Abdominal	7 (64%)	
Sangramentos	4 (36%)	
Diarréia	4 (36%)	
Perda de Peso	11	
	(100%)	
Co-infecções		
HIV		
HCV	0 (0%)	
Co-morbidades	0 (0%)	
Hipertensão Arterial		
Diabetes	2 (18%)	
Doença Hepática	1 (9%)	
Doença Cardíaca	2 (18%)	
Tamanho do Fígado	1 (9%)	5,3
	5,5 cm	
Tamanho do Baço	11,2 cm	5,2
Ascite	2 (18%)	
Icterícia	6 (55%)	
Palidez cutânea	8 (73%)	
Lesões de mucosa	2 (18%)	
Tratamento		
Anfotericina B	9 (82%)	
Lipossomal		
Antimoniato de	2 (18%)	
Meglumina		
Resposta ao Tratamento		
Curado	9 (82%)	
Resposta parcial	1 (9%)	
Sem resposta	0 (0%)	
Óbito	1 (9%)	

Fonte: Dados do próprio autor.

Os dados laboratoriais evidenciaram o padrão de pancitopenia com predomínio de anemia (média da hemoglobina 8,8 mg/dl), leucopenia (média de leucócitos 2.570 cel/mm³) e plaquetopenia (média de plaquetas 90.000 p/mm³), aumento das enzimas hepáticas AST, ALT, bilirrubinas, fosfatase alcalina e gama-GT (exames que caracterizam lesão hepática), alargamento dos valores médios de Tempo de Protrombina, bem como hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. Importante observar que os valores médios das medidas de ureia e creatinina (que determinam lesão renal) foram normais, como também os valores médios de sódio e potássio séricos que foram normais (TABELA 3).

Todos os pacientes realizaram pelo menos um exame diagnóstico para LV, onde 75% dos pacientes apresentaram Mielograma positivo para LV e 82% dos pacientes apresentaram rK39 positivo (TABELA 4).

Tabela 4: Dados Laboratoriais dos pacientes com LV

Variável	Dados Laboratoriais	Valor de Referência
	<i>Mediana (Min. - Máx)</i>	
Hemoglobina	8,8 (8,0-10,2)	12,5-15,5g/dl
Leucócitos	2.570 (800-	4.500-10.000 cél/mm ³
Neutrófilos	4.600)	2.610-6.600 cél/mm ³
Linfócitos	1.512 (0-2392)	900-3.000 cél/mm ³
Plaquetas	873 (0-1.932)	150 x 10 ³ -450 x 10 ³ p/
	90 x 10 ³ (12 x	mm ³
Uréia	10 ³ -313 x 10 ³)	
Creatinina	30 (19-131)	10-40 mg/dl
AST	0,7 (0,5-1,6)	0,4-1,3 mg/dl
ALT	88 (10-514)	Até 54U/L
Bilirrubina Total	51 (28-156)	Até 47U/L
Fosfatase	1,9 (0,3-4,6)	0,3-1,2mg/dl
Alcalina	383 (85-1.381)	53-128U/L
Gama-GT	209 (47-1.102)	<55U/L
Sódio	136 (123-142)	135-145 mEq/L
Potássio	4,2 (3,4-4,7)	3,9-5,5mEq/L
Albumina	2,3 (1,4-3,5)	3,8-5,2g/dl
Globulina	4,5 (1,0-6,5)	2,2-4,2g/dl
INR	1,0(0,9-1,5)	2,0-3,0
Tempo de	16,6 (11,9-62,3)	10-14 seg.
Protrombina		
Mielograma		
Positivo	6 (75%)	
Negativo	2 (25%)	
rK39		
Positivo	9 (82%)	
Negativo	2 (18%)	

Fonte: Dados do próprio autor.

Em relação a determinação da carga parasitária por qPCR kDNA para LV, foi realizado um recorte dos 6 pacientes que continuaram em acompanhamento clínico e que dosaram a carga parasitaria nos momentos: pré-tratamento, pós-tratamento, 3 meses após final do tratamento e 6 meses após o final do tratamento.

A Tabela 5 mostra o panorama do recorte dos pacientes em acompanhamento prospectivo do estudo até o 6º mês pós-tratamento de LV.

Tabela 5: Monitorização da carga parasitária kDNA em pacientes com LV.

N.º	Idade	Sexo	Mielograma	rK39*	PCR kDNA (T0)	PCR kDNA (T1)	PCR kDNA (T2)	PCR kDNA (T3)	PCR kDNA parasitas/ml			
									T0	T1	T2	T3
1	42	M	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	79,5	0,0	0,0	0,0
2	57	F	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	0,5	0,1	0,0	0,0
3	51	M	-	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	269,6	0,4	0,0	0,0
4	27	M	Pos	-	Pos	Pos	Neg	Pos	32,4	10,5	0,0	0,1
5	49	M	-	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	1183,8	0,2	0	0
6	67	M	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	-	0,8	0,0	47,1	-

*Pos = Positivo, Neg = Negativo, - = Não há valores disponíveis.

Fonte: o próprio autor.

Podemos evidenciar que todos os pacientes da tabela 4 tiveram resultado de qPCR para LV positivo pré-tratamento, corroborando com o resultado da pesquisa de rK39 dos pacientes que realizaram o exame (um dos pacientes avaliados não realizou rK39).

Apenas 01 paciente (paciente número 6) apresentou qPCR negativo logo após o tratamento, os outros 05 negativaram o qPCR no 3º mês pós tratamento. Todos os pacientes apresentaram melhora clínica e laboratorial imediatamente pós-tratamento (PT).

Importante destacar que o paciente número 6, ao retornar para consulta de acompanhamento no 3º mês PT apresentava quadro de febre, calafrios, astenia, perda de peso e aumento do volume abdominal. Foi diagnosticado com quadro de recaída da LV, sendo submetido a novo tratamento com Anfotericina B lipossomal. O resultado do qPCR deste paciente no 3º mês PT foi novamente positivo, com quantificação de 47,1 parasitos/mL, maior do que identificado na dosagem pré-tratamento (que foi 0,8 parasitos/mL).

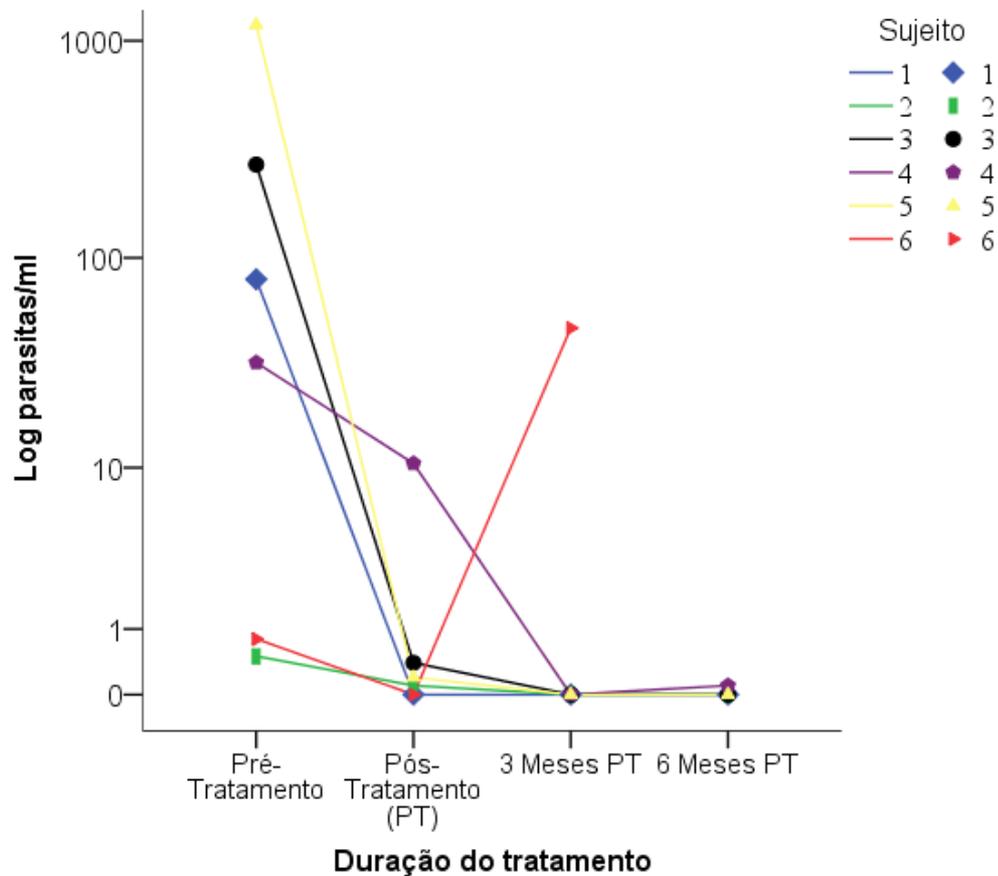
Nos outros 5 pacientes que realizaram coleta do qPCR no 6º mês PT, apresentaram resultado negativo (pacientes 1,2 e 3) e 01 apresentou resultado positivo (paciente 5). O paciente que apresentou qPCR positivo no 6º mês PT estava assintomático. Apesar do qPCR positivo, a carga parasitária foi menor do que a identificada pré-tratamento.

Em relação ao tratamento medicamentoso, 05 pacientes foram tratados com anfotericina B lipossomal (pacientes 2,3,4,5,6), e 01 paciente foi tratado com Antimoniato Pentavalente de Meglumina (paciente 1). 02 pacientes tiveram lesão renal durante o tratamento (paciente 2 e 4). Todos os 6 pacientes em acompanhamento foram classificados como LV grave pelos critérios do MS. Nesse recorte não houve nenhum óbito associado a LV.

No Gráfico 1 podemos observar a quantificação da carga parasitária dos 6 pacientes em acompanhamento, foi identificado redução significativa na carga parasitária em relação as dosagens pré-tratamento e pós-tratamento, bem como manutenção de baixas cargas parasitárias nas dosagens subsequentes. Exceto na dosagem 3º mês PT do paciente 6 que apresentou elevação da carga parasitária provavelmente por conta da recidiva clínica da LV.

O Gráfico 1 foi montado para que se possa visualizar a redução da carga parasitária ao longo do período de acompanhamento dos 6 pacientes onde cada paciente está destacado com uma linha do tempo de cor diferente. Nota-se semelhante ao Gráfico 1, a importante redução da carga parasitária a partir da dosagem PT e mantendo-se após os demais meses de acompanhamento. Novamente, exceto o paciente 6, destacado em linha vermelha que apresentou elevação da carga parasitária no 3º mês PT.

Gráfico 1: Quantificação de parasitas em sangue periférico de 6 pacientes em tratamento para LV no curso do acompanhamento por 6 meses.



7 DISCUSSÃO

Neste estudo, acompanhamos 6 pacientes diagnosticados com LV através da quantificação da carga parasitária através da detecção de kDNA da *L. infantum* pela técnica de qPCR, por um período que foi desde o momento pré-tratamento da LV até 6 meses após o término do tratamento medicamentoso. Foram incluídos no total 11 pacientes, porém 5 destes perderam seguimento clínico, realizando apenas coleta de carga parasitária nos momentos pré e pós-tratamento.

Na análise das características clínicas dos pacientes com LV, nosso estudo identificou uma frequência maior dos casos de LV no sexo masculino (82%), com prevalência em pacientes que se identificaram como negros (46%) e mediana de idade de 43,9 anos. Simão et al. (2020), mostrou predominância dos casos de LV em pessoas do sexo masculino 63%, com faixa etária de maior frequência entre 20 a 59 anos (40,1%), onde 46,9% se consideram afro-brasileiros. Já Cota et al. (2017), em seu estudo com pacientes que tiveram diagnóstico de LV e co-infectados LV-HIV, mostrou frequência maior dos casos no sexo masculino (88%), na faixa etária predominante de 31 a 52 anos. Hossain et al. (2017), em seu estudo em Bangladesh

evidenciou uma frequência menor entre os casos do sexo masculino (60%), numa faixa etária entre 20 a 31 anos.

As principais co-morbidades identificadas no nosso estudo foram: hipertensão arterial (18%), diabetes (18%), doença hepática (9%) e doença cardíaca (9%). Simão et al. (2020) mostrou como co-morbidades principais: doença cardíaca (2,1%), doença pulmonar (2,6%), co-infecção com HIV (9,6%), diabetes (1,4%).

Em relação aos sinais e sintomas pesquisados, nós destacamos: febre (82%) com média de 53 dias, astenia (91%), perda de peso (100%), palidez cutânea (73%) e icterícia (55%), tamanho do fígado teve média 5,5 cm e o tamanho do baço 11,2 cm, corroborando com os achados de Aoun et al. (2009).

O tratamento medicamentoso mais utilizado nesta pesquisa foi Anfotericina B Lipossomal (82%) e o Antimoniato Pentavalente de Meglumina (18%), evidenciando resposta adequada do tratamento com paciente clinicamente curado em 82% dos casos, em 9% os pacientes foram considerados parcialmente curados e ocorreu 1 óbito durante esse período correspondendo a 9% de mortalidade.

Pizzuto et al. (2001) evidenciou sinais e sintomas clínicos: febre (100%), anemia (66,6%), esplenomegalia (62,3%), hepatomegalia (58,3%). Enquanto Simão et al. (2020) demonstrou resultados semelhantes nos sintomas clínicos: icterícia (5,8%), hepatomegalia (73%), esplenomegalia (75,3%), palidez (53%), bem como em relação aos medicamentos utilizados para tratamento: anfotericina B desoxicolato (3,9%), anfotericina B lipossomal (75,8%), antimoniato de Meglumina (20,3%).

Nossos dados laboratoriais evidenciaram o padrão de pancitopenia com predomínio de anemia (mediana da hemoglobina 8,8 mg/dl), leucopenia (mediana de leucócitos 2.570 cel/mm³) e plaquetopenia (mediana de plaquetas 90.000 p/mm³), aumento das enzimas hepáticas AST, ALT, bilirrubinas, fosfatase alcalina e gama-GT (exames que caracterizam lesão hepática) que vem a ser confirmados nos resultados apresentados por Bossolasco et al. (2003) e Salam et al. (2010), bem como hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia.

Importante observar que os valores médios das medidas de uréia e creatinina (que determinam lesão renal) foram normais tanto no nosso estudo como no estudo de Simão et al. (2020).

Durante o nosso estudo identificamos recidiva em 1 paciente dos 6 acompanhados, que corresponde a 16,6% dos casos, o paciente em questão apresentava lesão renal crônica como co-morbidade. Aoun et al. (2009) em seu estudo de acompanhamento longitudinal de carga parasitária por qPCR de 46 pacientes na Tunísia, evidenciou recidiva em apenas 1 caso após 7 meses do tratamento.

Bossolasco et al. (2013) em seu estudo de carga parasitária por PCR para LV e acompanhamento pós tratamento com 25 pacientes co-infectados com LV-HIV, evidenciou que 7 pacientes apresentaram recidiva pós tratamento de LV, 3 pacientes após 268 dias do tratamento e 4 pacientes após 78 dias do tratamento (os 4 pacientes não estavam realizando profilaxia secundária para LV). O autor observou que a persistência de carga parasitária para LV está relacionada a alto risco de recidiva da doença, independente da resposta clínica ao tratamento.

Cota et al. (2017) em seu estudo de acompanhamento de pacientes co-infectados LV-HIV evidenciou recidiva em 16 dos 32 pacientes do estudo, sendo que dois terços dos casos de recidiva ocorreram nos 6 primeiros meses de seguimento. O autor relata que em pacientes imunocompetentes o clareamento da carga parasitária é rápido e mantido após o início da terapia medicamentosa. Seus achados estão de acordo com os dados apresentados por Pizzuto et al. (2001), onde observaram que a persistência da carga parasitária para LV (kDNA) em sangue periférico é preditor de recidiva clínica nos meses de seguimento.

Segundo Simão et al. (2020), em seu estudo de acompanhamento de 571 pacientes diagnosticados e tratados com sucesso para LV em um Hospital Estadual da cidade de Bauru-SP, a taxa de recidiva foi 6,8%, nos pacientes que obtiveram sucesso no tratamento apresentaram média de 6 meses para recidiva dos casos. O principal fator identificado nos casos de recidiva foi a co-infecção com HIV com 23,7% dos casos de recidiva em seu estudo.

Na avaliação clínico-laboratorial do paciente do nosso estudo que apresentou recidiva, ele apresentou leucopenia com linfopenia, alteração de transaminases ALT com 2 vezes o valor de referência pré tratamento, ferritina persistentemente elevada (pré-tratamento 1.487 → pós tratamento 1.529). Importante notar que avaliamos o hemograma pré-tratamento dos 11 pacientes incluídos no estudo com característica marcante de linfopenia (mediana de linfócitos 873 cél/mm³), autores com estudos

semelhantes como Simão et al. (2020) e Pourabas et al. (2013) não citam a contagem de linfócitos como variável laboratorial analisada.

Khatun et al. (2017), no seu estudo com 26 pacientes com LV foi para determinar se o qPCR pode ser usado para diagnóstico e compará-lo aos métodos aspirado esplênico, cultura para LV, aspirado de medula óssea com microscopia direta e o teste imunológico rK39. Esse estudo mostrou sensibilidade de 98,08% e especificidade de 100% em todas as amostras analisadas. Em conclusão, identificação de *Leishmania sp* em amostras de medula óssea ou aspiração esplênica poderia ser substituído pela detecção em sangue periférico para do complexo circulante de *L. donovani* por PCR sem comprometer a eficiência diagnóstica de LV em Bangladesh.

No nosso estudo todos os 11 pacientes incluídos no estudo apresentaram PCR para LV positivo pré-tratamento, enquanto o rK39 apresentou 2 resultados negativos. Maurya et al. (2005) destaca a importância do PCR para LV como método diagnóstico de grande acurácia, outros estudos mostram que o PCR para LV em sangue periférico pode ser utilizado como método diagnóstico de excelência e menos invasivo do que, por exemplo, submeter o paciente a realizar aspirado de medula óssea para mielograma (POURABAS et al., 2013; KHATUN et al., 2017)

Molina et al. (2003) cita que as técnicas de biologia molecular têm se mostrado valiosas para o diagnóstico de LV e que sua realização está cada vez mais simples apresentando alta sensibilidade e especificidade.

Semelhante ao desenho do nosso estudo de acompanhamento longitudinal de carga parasitária através de dosagem kDNA de LV, Pourabas et al. (2013) realizou estudo com 21 pacientes do Iran com diagnóstico de LV através de sintomas clínicos e testes como IFI e rK39, onde foi realizada dosagem de carga parasitária para LV através de detecção de kDNA nos intervalos pré-tratamento, durante o tratamento e 90 dias após o tratamento.

Pourabas et al. (2013) observou na fase pré-tratamento: todos os 21 pacientes apresentaram carga parasitária positiva de kDNA, a carga parasitária não teve relação com titulação de anticorpos, tempo de febre ou idade dos pacientes. Neste estudo também identificamos em todos os 11 pacientes na fase pré-tratamento PCR para LV positivo, apresentando maior sensibilidade para diagnóstico do que rK39 onde 2 pacientes tiveram resultados negativos.

Nos 6 pacientes acompanhados no momento pós-tratamento, 5 ainda apresentaram PCR positivo pós-tratamento, contudo somente 16,6% pacientes apresentaram mais de 1 parasita/mL na dosagem da carga parasitária. Pourabas et al. (2013) mostrou que no pós-tratamento: dosado no 28º dia pós tratamento obteve menos de 1 parasita/mL em 95% dos pacientes tratados, no 90º dia pós tratamento todos os pacientes apresentaram carga parasitária menor que 1 parasita/mL. 1 paciente apresentou recaída no dia 135 pós-tratamento.

Aoun et al. (2009) e Pourabas et al. (2013) ainda sugerem que sejam estabelecido ponto de corte na carga parasitária para ser usado como método diagnóstico para LV, seria maior que 1 a 3 parasita/mL de ponto de corte. Sudarshan et al. (2015) e Lachaud et al. (2000) afirmam que o qPCR apresenta alta sensibilidade principalmente para detectar precocemente infecção em pacientes assintomáticos. Em nosso estudo todos os pacientes apresentaram algum sintoma relacionados a LV, portanto não podemos extrapolar o nosso estudo para pacientes assintomáticos, porém identificamos que como acompanhamento de pacientes já tratados para LV pode ser um marcador importante para recidiva clínica da LV e/ou falha terapêutica.

Sudarshan et al. (2011), em seu estudo na Índia com 46 pacientes diagnosticados com LV foi determinado a carga parasitária através de kDNA de *Leishmania* que foram tratados com Anfotericina B lipossomal e Anfotericina B complexo lipídico para determinar eficácia do tratamento com essas drogas durante o acompanhamento desses pacientes no período de 6 meses. O autor dosou a carga parasitária nos dias 0, 3, 5, 7 e 30 dias, bem como 6 meses após o tratamento.

Neste estudo foi demonstrada a utilidade de qPCR na determinação de uma associação entre carga parasitária e sintomas clínicos em pacientes em tratamento para LV. No diagnóstico, carga parasitária no sangue periférico se correlacionou significativamente com o aspirado esplênico.

Assim como nosso estudo, Salam et al. (2010) e Sudarshan et al. (2011) analisaram a cinética do parasita em termos de carga antes tratamento e em diferentes intervalos de tempo após a administração do medicamento a fim de observar a eliminação do parasita, e concluiu que monitorar a carga do parasita por qPCR pode indicar cura completa ou detecção precoce do tratamento falha ou recaída.

O ressurgimento de parasitemia e, mais importante, o aumento da carga parasitária está correlacionada com recaídas clínicas (PIZZUTO et al., 2001; SUDARSHAN et al., 2015; SALAM et al., 2010). Estudos anteriores com LV em pacientes imunocomprometidos indicam que uma recaída clínica está associada a um certo nível de parasitemia, e estima-se que um aumento acima de 10 parasitas/mL de sangue percebe uma recaída clínica (SUDARSHAN et al., 2015).

8 CONCLUSÃO

Evidenciamos maior prevalência em pacientes do sexo masculino (86%) e cor da pele negra (46%), média de idade de 43,9 anos. Exames laboratoriais mostraram pancitopenia, predominância de linfopenia, lesão hepática, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia.

Em última análise, no presente estudo a carga parasitária foi <1 parasita/mL em 84,4% dos pacientes logo após o tratamento. Três meses após o tratamento, 5 pacientes apresentaram PCR negativo carga parasitária <1 parasita/mL, um único paciente apresentou PCR positivo no 3º mês PT e carga parasitária >1 parasita/mL (sendo este o paciente que recidivou clinicamente).

A quantificação da carga de *Leishmania* por PCR em tempo real também pode servir como um método confiável, rápido e menos invasivo para o diagnóstico de LV e um método confiável para monitoramento da resposta ao tratamento medicamentoso em pacientes imunocompetentes. Assim como a monitorização da carga parasitária por qPCR pode identificar quadro de recidiva da LV mesmo que o paciente não apresente sintomas clínicos naquele momento, corroborando com os estudos de Pizzuto et al. (2001), Sudarshan et al. (2015), Hossain et al. (2017) e Salam et al. (2010).

A determinação de carga parasitária por kDNA de *Leishmania* por técnica de qPCR tem se mostrado, através de diversos estudos clínicos apresentados nesta pesquisa, uma ferramenta substancialmente importante para o diagnóstico, acompanhamento e como possível preditor de quadros de recidiva da LV e falhas associadas ao tratamento.

Além de que a quantificação da carga parasitária pode ser realizada através de sangue periférico, o que torna o procedimento menos invasivo e mais simples do

ponto de vista de coleta do que o método tradicional de aspirado de medula óssea ou aspirado esplênico.

Em comparação com exames imunológicos, como o rK39, evidenciamos superioridade no que diz respeito ao diagnóstico de pacientes com sintomas clínicos de LV, tendo a vantagem de poder ser utilizado para acompanhamento desses doentes tanto pré-tratamento quanto em dosagem de acompanhamento pós-tratamento.

Devemos salientar as dificuldades em se realizar um estudo clínico prospectivo de acompanhamento por longo período, onde tivemos desistências substanciais de 5 participantes do estudo que, na maioria das vezes, relataram dificuldades sócio-econômicas para continuarem com o acompanhamento clínico.

Entendemos que a realização de qPCR requer investimentos em novas tecnologias laboratoriais em saúde e que o custo inicial por vezes é elevado, mas também ressaltamos o quanto esse tipo de investimento pode impactar nas estratégias de diagnóstico e tratamento de doenças negligenciadas que assolam nosso país.

Apresentamos uma série de casos clínicos em acompanhamento prospectivo, que apesar do número pequeno de participantes na pesquisa pode traçar um paralelo singular com outros estudos clínicos mais robustos tanto nacionais como internacionais, para que possamos fazer uso de uma ferramenta eficaz no diagnóstico e monitoramento da LV na região Sub-médio do Vale do São Francisco.

9 REFERÊNCIAS

ABBASS, E; et al. Heterogeneity of *Leishmania donovani* Parasites Complicates Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Comparison of Different Serological Tests in Three Endemic Regions. **PLOS ONE**. N. 3; 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116408>>. Acesso em: 30 out. 2020.

ABELL, L.; DESSEIN, A. J. The impact of host genetics on susceptibility to human infectious diseases. **Curr Opin Immunol**, 1997; v.9, p.509–516.

ALONSO, D. P.; et al. Heterogeneity of *Leishmania infantum* chagasikinetoplast DNA in Teresina (Brazil). **The American journal of tropical medicine and hygiene**. V.8: P. 819-821. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0600>>. Acesso em: 07 ago. 2020.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in parasitology**, 2006, v.22, p.552-557. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>>. Acesso em: 22 mai. 2020.

ALVES, F; et al. Recent development of visceral leishmaniasis treatments: successes, pitfalls, and perspectives. **Clin Microbiol Rev**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.00048-18>>. Acesso em: 22 mai. 2020.

ANTINORI, S; et al. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected d HIV-Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and review of the Literature. **Clinical Infectious Diseases**, 2007; 44:1602-10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/518167>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

ARONSON, N.; et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/cid/ciw670>>. Acesso em: 12 nov. 2020.

AOUN, K.; et al. Contribution of quantitative real-time polymerase chain reaction to follow-up of visceral leishmaniasis patients treated with meglumine antimoniate. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 2009, 1004-1006pp. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0285>>. Acesso em: 03 jan. 2021.

BABIKER, Z. O. E.; et al. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** V. 76; n.4. p.689-93 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.689>>. Acesso em: 20 out. 2020.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian J Med Res** 123: 289-294; 2006. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.516.3878&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2020.

BLACKWELL, J. M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. **Parasitology**, 1996; 112: S67–S74. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0031182000076678>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

BOSSOLASCO, S.; et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, 2003, 5080-5084. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5080-5084.2003>>. Acesso em: 27 mar. 2020.

BRUNO, B.; et al. Serum indirect immunofluorescence assay and real-time PCR results in dogs affected by *Leishmania infantum*: evaluation before and after treatment at different clinical stages. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2019, v.31.2, 222-227. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177%2F1040638718824140>>. Acesso em: 07 out. 2020.

BORGES, M. M.; et al. Efficacy and safety of amphotericin B deoxycholate versus N-methylglucamine antimoniate in pediatric visceral leishmaniasis: an open-label, randomized, and controlled pilot trial in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 2017, v.50, p.67–74. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0455-2016>>.

BOURGEOIS, N.; et al. Long-Term Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Patients With AIDS: Relapse Risk Factors, Value of Polymerase Chain Reaction, and Potential Impact on Secondary Prophylaxis. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology**, Vol 48(1), 2008, pp 13-19.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). DEPARTAMENTO DE INFORMAÇÃO E INFORMÁTICA DO SUS. DATASUS. **Informações de Saúde: Epidemiológicas e Morbidades**. Brasília: MS; 2019. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acesso em: 04 nov. 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: MS; 2014. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/18/Guia-LV-2016.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). DEPARTAMENTO DE INFORMAÇÃO E INFORMÁTICA DO SUS. DATASUS. **Informações de Saúde: Epidemiológicas e Morbidades**. Brasília: MS; 2017. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acesso em: 26 set 2020.

CALDAS, A.; et al. **Balance of IL-10 and interferon - plasma levels in human visceral leishmaniasis**: implications in the pathogenesis. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-5-113>>. Acesso em: 21 set. 2020.

CARNIELLI, J. B.; et al. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosinesensitive and -resistant *Leishmania infantum* chagasi isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. **J Proteomics**, 2014, v.108, p.198 –208. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.010>>. Acesso em: 30 jan. 2021.

CARVALHO, M. R.; et al. Phlebotomine sandflies species from American visceral leishmaniasis in the North Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 23: 1227-1232, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.org/article/csp/2007.v23n5/1227-1232/en/>>. Acesso em: 08 ago. 2020.

CHAPPUIS, F.; et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, 2007, 5: 873– 882. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>>. Acesso em 08 de ago. 2020.

CHAPPUIS, F.; et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews | Microbiology**. V. 5; P. 873-882; 2007. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro1748>>. Acesso em: 08 ago. 2020.

CHAPPUIS, F.; et al. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ**. V.333; n. 7571. P. 723. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmj.38917.503056.7C>>. Acesso em: 08 ago. 2020.

COTA, G.; et al. *Leishmania*-HIV Co-infection: Clinical Presentation and Outcomes in an Urban Area in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2014, v. 17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003653>>. Acesso em: 07 jun. 2020.

COTA, G. F.; et al. Exploring prognosis in chronic relapsing visceral leishmaniasis among HIV-infected patients: Circulating *Leishmania* DNA. **Acta tropica**, 2017, v.172, p.186-191. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.011>>. Acesso em: 21 nov. 2020.

CRUZ, I.; NIETO, J.; MORENO, J.; et al. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **Indian Journal of Medical Research**. 123(3): 357-388, 2006. Disponível em: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/103324/1/Cruz%20et%20al_IndianJMedRes_123_2006.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2020.

DANTAS TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, 39(1):. 64-67, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0037-86822006000100012&script=sci_arttext>. Acesso em: 21 nov. 2020.

DANTAS-TORRES, F.; et al. Leishmania-FAST15: a rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and cellular probes**, 2017, v.31, p.65-69. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.08.006>>. Acesso em: 30 out. 2020.

DARCIS, G.; et al. Recurrence of visceral and muco-cutaneous leishmaniasis in a patient under immunosuppressive therapy. **BMC infectious diseases**, 2017, v.17.1, p.1-4. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12879-017-2571-x>>. Acesso em: 30 out. 2020.

DAYAKAR, A.; et al. Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in immunology**, 2019, v.10, issue 670. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00670>>. Acesso em: 07 set. 2020.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s13578-015-0021-2>>. Acesso em: 17 jul. 2020.

DUTHIE, M. S.; et al. Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2014, v.33, p.639–649. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-013-1999-1>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

GUALDA, K. P.; et al. New primers for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 2015, v.57(5), p.377–83. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500002>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

GOTO, H.; PRIANTI, M. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**,

2009, v. 51(5), p. 241-246. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652009000500002>>. Acesso em: 15 nov. 2020.

HOSSAIN, F.; et al. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **PLoS ONE**, 2017, v.12(9). Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185606>>. Acesso em: 19 nov. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Demográfico 2010**. Rio de Janeiro: IBGE; 2010. 199p. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 dez. 2020.

JAWED, J. J.; Dutta; S.; Majumdar, S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2019, v.117. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109098>>. Acesso em: 30 nov. 2020.

KHATUN, M; et al. Novel PCR primers to diagnose visceral leishmaniasis using peripheral blood, spleen or bone marrow aspirates. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 2017, v.10(8), p.753-759. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.002>>. Acesso em: 15 ago. 2020.

KHOSHDEL, A; et al. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN in patients with visceral leishmaniasis. **Braz J Infect Dis**, 2009, v.13, p.44–46. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702009000100010>>. Acesso em: 30 ago. 2020.

KIP, A. E.; et al. Systematic Review of Biomarkers To Monitor Therapeutic Response in Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2015, v. 59(1). Disponível em: <DOI:10.1128/AAC.04298-14>. Acesso em: 15 set. 2020.

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, v.38(1), p.236-240. Disponível em: < DOI: 10.1128/JCM.38.1.236-240.2000>. Acesso em: 12 jul. 2020.

LACHAUD, L.; et al. Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood. **Journal of Clinical Microbiology**. 2001, v.39(2), p.613-617. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/39/2/613.short>>. Acesso em: 26 jul. 2020.

LIMA, L. C. B.; et al. Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with hiv co-infection in Northeastern Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 2017, v.59, e48. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759048>>. Acesso em: 21 nov. 2020.

LINDOSO, J. A. L.; et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, 2018, v.10, p.193–201. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6197215/>>. Acesso em: 05 jun. 2020.

MAIA, C.; GUILHEM, D.; FREITAS, D. Vulnerabilidade ao HIV/Aids de pessoas heterossexuais casadas ou em união estável. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 42, n. 2, 2008. Disponível em: < https://www.scielo.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rsp/v42n2/6357.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2020.

MARTINS-MELO, F. R.; et al. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **PLoS One**, 2014, v.9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093770>>. Acesso em: 13 jan. 2021.

MARTINS-MELO, F. R.; et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bull World Health Organ**, 2015, p.103–110. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.2471%2FBLT.15.152363>>. Acesso em: 12 jun. 2020.

MARINHO, D. S.; et al. Health economic evaluations of visceral leishmaniasis treatments: a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, 2015, 9: e0003527. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003527> >. Acesso em: 21 ago. 2020.

MAURYA, R.; et al. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. **Journal of clinical microbiology**, 2005, v.43(7), p.3038-3041. Disponível em: < <https://jcm.asm.org/content/43/7/3038.short>>. Acesso em: 14 mai. 2020.

MILLER, S. A simple salting-out procedure tissue for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, 1988, v.16.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of Leishmania. **Ann. Trop. Med. Parasitol**. 2003, v.1(1), p.29–45. Disponível em: < <https://doi.org/10.1179/000349803225002516>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

MOLINA, I.; et al. Ultrasensitive real-time PCR for the clinical management of visceral leishmaniasis in HIV-Infected patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 2013, v.89(1), p.105-110.

NYLÉN, S.; KUMAR, R. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, 2012, v.3, p.251. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>>. Acesso em: 29 set. 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS); **Informe epidemiológico das Américas, Leishmanioses**, 2019.

ORSINI, M.; et al. Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*–HIV co-infection: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2012, v.35, p.259–262. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000300011>>. Acesso em: 12 mai. 2020.

Pan American Health Organization. *Leishmanioses: epidemiological report of the Americas. Leishmanioses Report 5*. Pan American Health Organization, Washington, DC. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34112>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor monocytes are hallmarks of active human visceral leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Clin Exp Immunol**, 2006, v.146, p.124–132. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03171.x>>. Acesso em: 05 mai. 2020.

PETERS, W. The treatment of kala-azar–new approaches to an old problem. **Indian J Med Res**, 1981, 73(Suppl), p.1–18.

PIZZUTO, M.; et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. **Journal of clinical microbiology**, 2001, v.39(1), p.357-361. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/39/1/357.short>>. Acesso em: 08 jan. 2021.

POURABAS, B.; et al. Quantification of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA for monitoring the response to meglumine antimoniate therapy in visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 2013, v.88(5), p.868-871. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0440>>. Acesso em: 16 jan. 2021

REY LC, MARTINS CV, RIBEIRO HB, LIMA AA. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81:73-8.

RIERA, C.; et al. Evaluation of a látex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV- *Leishmania* co-infection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 2004, v.23, p.899-904. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-004-1249-7>>. Acesso em: 06 out. 2020.

RIJAL, S.; et al. Treatment of visceral leishmaniasis in south-eastern Nepal: decreasing efficacy of SSG and need for a policy to limit further decline. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 2003, v.97, p.350 –354. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)90167-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)90167-2)>. Acesso em: 15 mar. 2021.

ROMERO, G. A. S.; et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: a multicenter, randomized, open label trial. **PLoS Negl Trop Dis**, 2017, v.11, e0005706. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005706>.

RUITER, C. M.; et al. Molecular Tools for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, 2014, v.52, n.9, p.3147–3155. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/52/9/3147.short>>. Acesso em: 17 set. 2020.

SALAM, M. A.; et al. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh. **Acta tropica**, 2010, v.113(1), p.52-55. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.09.005>>. Acesso em: 25 mai. 2020.

SILVA, M. A. L.; et al. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Experimental parasitology**, 2013, v.134(2), p.206-210. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.003>>. Acesso em: 25 mai. 2020.

SILVEIRA, L. J. D., et al. Historical series of patients with visceral leishmaniasis treated with meglumine antimoniate in a hospital for tropical diseases, Maceio-al, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, 2015, Sao Paulo, v.57, p.33–38. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100005>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

SIMÃO, J. C.; et al. Predictors of relapse of visceral leishmaniasis in inner São Paulo State, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, 2020, v.95, p.44-49. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.028>>. Acesso em: 28 out. 2020.

SOUSA, J. M. S.; RAMALHO, W. M.; MELO, M. A. Demographic and clinical characterization of human visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. **Rev Soc Bras Med Trop**, 2018, v.51(5), p.622-630. Disponível em: <[doi:10.1590/0037-8682-0047-2018](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0047-2018)>. Acesso em: 25 mai. 2020.

SRIVASTAVA, P.; et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 2011, v.105(1), p.1–6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>>. Acesso em: 18 set. 2020.

SUDARSHAN, M; et al. A Correlative Study of Splenic Parasite Score and Peripheral Blood Parasite Load Estimation by Quantitative PCR in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, 2015, v.53, n.12. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/53/12/3905.short>>. Acesso em: 29 jun. 2020.

SUDARSHAN, M.; et al. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial**

Chemotherapy, 2011, v.66(8), p.1751-1755. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkr185>>. Acesso em: 02 out. 2020.

SUNDAR, S.; et al. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **The Lancet**, 1998, v.351, p.563-565. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)04350-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)04350-X)>. Acesso em: 10 jan. 2020.

SUNDAR, S.; et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin Infect Dis**, 2000, v.31, p.1104 – 1107. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/318121>>. Acesso em: 28 jan. 2021.

SUNDAR, S.; et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, 2002, v.347, p.1739 –1746. Disponível em <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa021556>>.

SUNDAR, S., & Murray, H. W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. **Bull World Health Organ**, 2005, v.83, p.394 –395. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/15976883>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

SUNDAR, S.; et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **N. Engl. J. Med.**, 2010, v.362(6), p504–512. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0903627>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

SUNDAR, S.; et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clin Infect Dis**, 2012, v.55, p.543–550. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/cid/cis474>>. Acesso em: 10 mar. 2021.

THAKUR, C. P.; et al. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 1999, v.93, p.319 –323. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(99\)90037-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(99)90037-8)>. Acesso em: 25 fev. 2021.

WORLD HEATH ORGANIZATION. **Control of the Leishmaniases**. Geneva: WHO; 2010. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/227957/WER6612_88-88.PDF>. Acesso em: 13 dez. 2020.

WORLD HEATH ORGANIZATION. **Regional strategic framework for elimination of kala-azar from the South-East Asia region (2005-2015)**. SEA-VBC-85 (Rev-1). Regional Office for South-East Asia, Department of Communicable Diseases, World Health Organization, New Delhi, India, 2005. Disponível em: <http://apps.searo.who.int/pds_docs/b0211.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2020.

ZIJLSTRA, E. E.; et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1992, v.86; n.5, p.505-7, 1992.

10 APÊNDICES

Apêndice A - Questionário utilizado na pesquisa

Determinação de fatores associados a diminuição da carga parasitária em pacientes com Leishmaniose visceral			
Data (coleta):	____/____/____	Prontuário HU:	CINPe: _____ Cidade: _____
Nome completo:	_____		
Qual a data do seu nascimento	____/____/____		
Ocupação:	Escolaridade (anos de estudo):	Estado Civil:	
Sexo: 1. Masc. 2. Fem.	Cor de pele: 1. Branca 2. Parda 3. Negro 4. Índio 5. Outro		
Cidade/Estado (mora):		Telefone ()	
Febre: 1. Sim 2. Não	Tempo da febre (dias):		
Sintomatologia:			
1. Astenia	3. Sangramentos	5. Perda de peso	
2. Desconforto abdominal	4. Diarréia	6. Outros: _____	
Co-infecções: 1. HIV: Sim () Não ()			
Já teve diagnóstico de LV? 1. Sim 2. Não			
Quantas vezes? ()			
Fez uso de Anfotericina B e/ou Glucantime? 1. Sim 2. Não			
Tabagismo:	1. Nunca fumou	2. Ex-fumante	3. Fumante
Investigação clínica.			
Além da LV existe outra doença.		1. Sim	2. Não 9. Não sabe
Se sim, qual a outra doença que o (a) senhor (a) tem ou teve.			
1. Hipertensão 2. Diabetes 3. Outra: _____			
Exame físico			
Peso: _____ (quilo, gramas)	Altura: _____ (metro, centímetro)		
P.A: _____ (mmHg)			
Abdome:			
Hepatimetria(cm):	Ascite: 1. Sim 2. Não		
Esplenometria(cm):	Dor abdominal: 1. Sim 2. Não		
Aparelho Cardiovascular:			
Aparelho Respiratório:			
Pele/Mucosas:			
Icterícia: 1. Sim 2. Não Palidez Cutânea: 1. Sim 2. Não Lesões de Mucosa: 1. Sim 2. Não			
Exames Laboratoriais			
Hemoglobina: ____ (____/____) Hematócrito: ____ (____/____) VGM: ____ (____/____) Leucometria: ____ (____/____)			
Neutrófilos: ____ (____/____) Linfócitos: ____ (____/____) Plaquetas: ____ (____/____)			
Na: ____ (____/____) K: ____ (____/____)			
Ferritina: ____ (____/____) PCR: ____ (____/____) VHS: ____ (____/____)			
TP: ____ (____/____) INR: ____ (____/____) Albumina: ____ (____/____) Proteínas Totais: ____ (____/____)			
Globulina: ____ (____/____)			
AST: ____ (____/____) ALT: ____ (____/____) : ____ (____/____) BT: ____ (____/____) BD: ____ BI: ____			
GGT: ____ (____/____) FA: ____ (____/____) Anti-HIV: ____ (____/____) Anti-HCV: ____ (____/____)			
Uréia: ____ (____/____) Creatinina: ____ (____/____)			
Mielograma:			
rK39(teste rápido): ____ (____/____)			
Elisa rK39: ____; ____ (____/____)			
Regime de tratamento			
() Antimoniato de Meglumina () Anfotericina B desoxicolato () Anfotericina B complexo lipídico			
() Anfotericina B lipossomal			
Resposta ao tratamento:			
Observações:			
ENTREVISTADOR: _____			

Apêndice B: Manuscrito submetido e aprovado no the american journal of tropical medicine and hygiene (if: 2.1 – qualis a3)

**SEVERE VISCERAL LEISHMANIASIS IN A PATIENT WITH HIV
COINFECTION UNDERGOING TREATMENT FOR ERYTHEMA NODOSUM
LEPROSUM: A CASE REPORT**

Running head: Severe HIV-VL coinfection in an immunosuppressed patient

**Samuel R Aquino^{1,2}, Lucyo FB Diniz², Igor T Queiroz³, Mirella A Cunha⁴, Alda M
Justo⁵, Elis D Silva⁵, Valéria RA Pereira⁵, Zulma M Medeiros⁵, *Rodrigo F
Carmo¹**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Biológicas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

²Hospital Universitário da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil. ³Hospital Giselda Trigueiro, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁵Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil.

Corresponding Author: Dr. Rodrigo Feliciano do Carmo. Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco. Av. José de Sá Maniçoba, s/n – Centro, Petrolina-PE, 56304-917.

Phone: 55 87 2101-6862

E-mail: rodrigo.carmo@univasf.edu.br

Key words: AIDS, HIV, kala-azar, leprosy, visceral leishmaniasis

Word counts (Abstract): 101

Word counts (Text): 1,535

Number of figures: 2

Abstract

We report a case of visceral leishmaniasis (VL)/HIV coinfection in a patient undergoing regular antiretroviral therapy and treatment with thalidomide for erythema nodosum leprosum. He presented at a health service with high fever, chills, asthenia, pale skin, lower limb edema, hepatomegaly, and splenomegaly. VL was confirmed by direct examination, serological and molecular tests. Serum levels of Th1/Th2 cytokines were measured. The patient began treatment with liposomal amphotericin B, with good clinical response; however, VL recurred six months later. Treatment was reinitiated, maintaining secondary prophylaxis with liposomal amphotericin B. The patient showed clinical improvement with important recovery of CD4+ T lymphocyte count.

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious parasitic disease with worldwide distribution; 90% of cases are concentrated in India, Sudan, Nepal, and Brazil. The World Health Organization estimates that there are between 200,000 and 400,000 cases of VL and 20,000 to 40,000 deaths due to VL annually.¹

It is estimated that approximately one third of people infected with HIV around the world live in areas at a high risk of transmission of VL, and an increase in the number of cases of VL-HIV coinfection has been reported in 35 countries.^{2,3} In

Brazil, changes in the distribution of cases of HIV and VL, related both to an increase in the number of cases of HIV in rural areas in the interior of the country and to the urbanization of cases of VL, have elevated the risk of coinfection.^{2,4}

The municipality of Petrolina, located in the state of Pernambuco, in the Northeast Region of Brazil, has undergone an intense process of immigration in recent years, motivated by the expansion of fruit production in the region. In conjunction with a lack of health infrastructure and basic sanitation, this disordered growth has contributed to an increase in the incidence of diverse neglected infectious diseases in the region, such as VL and leprosy.^{5,6} Co-occurrence of these diseases, coupled with immunosuppression caused by HIV, has contributed to the appearance of atypical clinical pictures that require cautious investigation.

In this case report, we describe a severe case of VL in a patient with HIV infection who was also undergoing treatment for erythema nodosum secondary to lepromatous leprosy.

Case Report

On October 11, 2017, a 40-year-old male patient was attended at the municipal health service in Petrolina, Pernambuco, Brazil with 30-day-history of high fever, chills, asthenia, and weight loss. Clinical examination revealed pale skin, lower limb edema, and increased abdominal volume due to hepatomegaly and splenomegaly. Laboratory tests revealed pancytopenia and renal dysfunction. The patient had been followed by the service since 2014, for the treatment of HIV infection, with regular use of tenofovir/lamivudine/efavirenz. At the time, his exams showed CD4+ T lymphocyte count of 14 cells/mm³ and viral load of < 40 copies. The

patient also had erythema nodosum leprosum, and he had been undergoing treatment with thalidomide 100 mg daily and prednisone 20 mg daily since 2015.

The patient was hospitalized, and diagnosis proceeded with chest radiography, which showed no changes, abdominal ultrasound, showing hepatomegaly and splenomegaly, negative blood cultures, and negative urine culture. Microscopic examination of bone marrow aspirate revealed the presence of numerous amastigote structures compatible with *Leishmania*, on the other hand, immunochromatographic test (rK39) showed negative result. Then, samples were sent to the Aggeu Magalhães Institute (IAM)/FIOCRUZ (Recife, PE) for serological and molecular analysis, which demonstrated positive ELISA (rK39) for antileishmanial antibodies, positive direct agglutination test (DAT) for VL (1:51,200), positive urinary antigen for VL (KAtex) (+++) and positive qPCR.

Quantification of serum levels of the cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, and IL-2 was performed by multiplex fluorescent bead immunoassay (CBA, BD-Biosciences, San Jose, CA, USA). The IL-10, and IL-6 levels were 7.75 pg/mL, 10.58 pg/mL, and 1.32 pg/mL, respectively. IFN- γ , TNF- α , IL-4, and IL-2 were not detected (Figure 1).

The patient began treatment with liposomal amphotericin B 4mg/kg daily for 5 days, showing good clinical response, with no fever on the second day of treatment. Physical examination during treatment revealed reduction in the size of the liver and spleen. The patient also showed laboratory improvement, with progressive increase in leukocytes and platelets. The patient was subsequently discharged for outpatient follow-up. During this period, the patient did not undergo secondary prophylaxis with liposomal amphotericin B 4mg/kg every 15 days, and VL recurred approximately 6

months after the first treatment, with the patient again presenting fever, chills, asthenia, weight loss, and worsened hepatosplenomegaly.

The patient was hospitalized again in April 2018; a new bone marrow aspirate was performed, revealing the presence of numerous amastigote structures compatible with *Leishmania*. Liposomal amphotericin B 4mg/kg daily was reinitiated for 5 days, and the patient once more evolved with good clinical and laboratorial response.

Six months after the last treatment for VL, the patient was clinically cured, undergoing secondary prophylaxis with liposomal amphotericin B 4 mg/kg every 15 days, in order to prevent recurrence of the disease. The patient currently shows important recovery in CD4+ T lymphocyte count (144 cells/mm³), maintaining undetectable viral load.

Two years after the first treatment, the patient presents undetectable levels of IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4, and IL-2. Serum levels of IL-6 are almost undetectable (1.17 pg/mL).

A summary of the patient's timeline is shown in Figure 2.

Discussion

We have reported a case of VL-HIV coinfection in a hyperendemic area for VL and leprosy; the patient was undergoing ART and receiving immunosuppressive medications for treatment of erythema nodosum secondary to multibacillary leprosy.

In the reported case, the patient presented a typical clinical picture of visceral leishmaniasis with presence of high parasite load by direct examination. In patients with VL-HIV coinfection, clinical presentation may be similar to that in

immunocompetent patients. However, as patients with coinfection have some specific immunological characteristics, their clinical manifestations may differ from those of patients who are not infected with HIV, making diagnosis challenging, due to similarities with other opportunistic infections.⁷ In addition, elevated parasite load is a common finding in coinfecting patients, due to compromised immune system (reduced monocyte and macrophage function) and stimulation of viral replication.^{8,9}

Serological tests for antibodies normally show low performance for VL/HIV coinfecting patients. Freire et al. (2019)¹⁰ demonstrated that, among serological tests available in Brazil for diagnosing VL, DAT showed the highest sensitivity in individuals with coinfection, and immunochromatographic assay (IT LEISH, rk39) showed sensitivity of only 63.2%. *Leishmania* urine antigen tests using KAtex and detection of parasitic DNA using molecular biology have shown good performance both in patients with VL alone and in those with VL-HIV coinfection.¹¹⁻¹³ In this case report, only immunochromatographic assay (rK39), which is recommended by the Brazilian Ministry of Health for diagnosis of VL, showed a negative result. This underscores the importance of implementing, in addition to immunochromatographic assay, other tests with higher sensitivity for diagnosing VL in patients with coinfection.

It is well-known that cytokines play a role in pathogenesis and hosts resistance of VL. In this case report, serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-2 were undetectable before and after treatment. The patient did, on the other hand, express IL-10 and IL-6 before treatment, but only IL-6 remained detectable after treatment. Our results are in line with a previous study that found significantly high serum levels of IL-10, IL-6 and IFN- γ , while TNF- α , IL-2, and IL-4 were minimal in Indian patients

with VL. Upon treatment, significant decrement in IL-10 and IL-6 levels were observed, however, the level of IL-6 remained significantly elevated in comparison with controls.¹⁴ In addition, Caldas *et al.* (2005)¹⁵ observed that IL-10 and IFN- γ circulating levels dropped dramatically 30 days after treatment.

It is important to highlight that the results found in the present case report cannot be directly compared with previous studies in patients with VL only. Here, we have a patient with VL and AIDS undergoing immunosuppressive treatment for erythema nodosum leprosum. Therefore, this could explain, at least in part, the absence of expression of other cytokines, such as IFN- γ , which is produced mainly by activated CD4 and CD8 T cells.¹⁶ In addition, lack of IFN- γ may be related to the presence of elevated levels of IL-10, its main suppressor.¹⁷

The lack of IFN- γ may have contributed to the disease's progression in the case described here. IFN- γ is a key cytokine involved in host protection, it is responsible for skewing Th1 response and stimulate the macrophages to produce reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) for oxidative killing of intracellular amastigotes.¹⁷ Accordingly, a recent study showed that asymptomatic immune responders for *Leishmania* had high levels of IFN- γ among HIV + individuals, reinforcing the role of this cytokine in the resolution of the infection.¹⁸

In leishmaniasis pathogenesis, IL-10 plays a substantial role by causing the downregulation of Th1 response, macrophage activation and antigen presentation by dendritic cells (DCs).¹⁹ Furthermore, IL-10 inhibits the leishmanicidal functions of macrophages by diminishing the production of reactive nitrogen intermediates by macrophages, IFN- γ by T and natural killer (NK) cells, and IL-12 mediated activation of macrophages.^{17,20} In a murine model of VL, overexpression of IL-10 during the

initial phase of infection led to higher disease susceptibility due to decreased multifunctional CD4 T cells.²¹ In addition, the severity of VL in human has been associated with increased levels of IL-10 in serum as well as tissue lesions.^{22,23} Similarly, IL-6 has been associated with disease severity and death in patients with VL.^{24,25}

In individuals with VL-HIV coinfection, the chance of recurrence of VL is five times greater than in individuals without coinfection.⁹ The high rate of recurrence may be associated with the inability to control replication of parasites due to an ineffective immune response mediated by *Leishmania*-specific lymphocytes, resulting from immunodeficiency caused by HIV.²⁶ In the reported case, the patient showed clinical worsening six months after treatment of VL, as he did not follow up with secondary prophylaxis. The establishment of secondary prophylaxis in these patients would, thus, be of fundamental importance.

Conflict of interest

None.

Financial support

None.

List of authors

Samuel R Aquino - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil. E-mail: samricarte@hotmail.com

Lucyo FB Diniz - Hospital Universitário da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil. E-mail: lucyoflaviodiniz@gmail.com

Igor T Queiroz - Hospital Giselda Trigueiro, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. E-mail: igorthiago@hotmail.com

Mirella A Cunha - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. E-mail: mirellaac@gmail.com

Alda M Justo - Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: aldajusto@hotmail.com.

Elis D Silva - Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: dionisio.elis@gmail.com.

Valéria RA Pereira - Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: valeria@cpqam.fiocruz.br

Zulma M Medeiros - Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: medeiros@cpqam.fiocruz.br

Rodrigo F Carmo – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil. E-mail: rodrigo.carmo@univasf.edu.br

REFERENCES

- 1 Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one* **7** (2012).
- 2 de Sousa-Gomes, M. L., Romero, G. A. S. & Werneck, G. L. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough? *PLoS neglected tropical diseases* **11** (2017).
- 3 HIV/AIDS, J. U. N. P. o. *Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010*. (Unaid, 2010).
- 4 Maia-Elkhoury, A. N. S., Alves, W. A., Sousa-Gomes, M. L. d., Sena, J. M. d. & Luna, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de saude publica* **24**, 2941-2947 (2008).
- 5 Diniz, L. F. B., Souza, C. D. F. d. & Carmo, R. F. d. Epidemiology of human visceral leishmaniasis in the urban centers of the lower-middle São Francisco Valley, Brazilian semiarid region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **51**, 461-466 (2018).

- 6 Silva, M. E. G. d. C., Souza, C. D. F. d., Costa, F. M. d. & Carmo, R. F. d. Epidemiological aspects of leprosy in Juazeiro-BA, from 2002 to 2012. *Anais brasileiros de dermatologia* **90**, 799-805 (2015).
- 7 Lindoso, J. A. L., Moreira, C. H. V., Cunha, M. A. & Queiroz, I. T. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV/AIDS (Auckland, NZ)* **10**, 193 (2018).
- 8 Mock, D. J. *et al.* Leishmania induces survival, proliferation and elevated cellular dNTP levels in human monocytes promoting acceleration of HIV co-infection. *PLoS pathogens* **8** (2012).
- 9 Queiroz, I., Cruz, L., Fred, J., Madaloso, G. & Lindoso, J. (2008).
- 10 Freire, M. L. *et al.* Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases* **13** (2019).
- 11 Singh, O. P. & Sundar, S. Developments in diagnosis of visceral leishmaniasis in the elimination era. *Journal of parasitology research* **2015** (2015).
- 12 van Griensven, J., Simegn, T., Endris, M. & Diro, E. Visceral leishmaniasis and HIV co-infection in Northwest Ethiopia: antiretroviral treatment and burden of disease among patients enrolled in HIV care. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **98**, 486-491 (2018).
- 13 Vogt, F. *et al.* Antigen detection in urine for noninvasive diagnosis and treatment monitoring of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus coinfecting patients: an exploratory analysis from Ethiopia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **99**, 957-966 (2018).
- 14 Ansari, N. A., Saluja, S. & Salotra, P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clinical immunology* **119**, 339-345 (2006).
- 15 Caldas, A. *et al.* Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC infectious diseases* **5**, 113 (2005).
- 16 Gough, D. J., Levy, D. E., Johnstone, R. W. & Clarke, C. J. IFN γ signaling—Does it mean JAK–STAT? *Cytokine & growth factor reviews* **19**, 383-394 (2008).
- 17 Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S. V. & Kalangi, S. K. Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. *Frontiers in immunology* **10**, 670 (2019).
- 18 Botana, L. *et al.* Asymptomatic immune responders to Leishmania among HIV positive patients. *PLoS neglected tropical diseases* **13**, e0007461 (2019).
- 19 Nylén, S. & Sacks, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends in immunology* **28**, 378-384 (2007).
- 20 Bacellar, O. *et al.* Interleukin-12 restores interferon- γ production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* **173**, 1515-1518 (1996).
- 21 Mesquita, I. *et al.* The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. *Cytokine* **112**, 16-20 (2018).
- 22 Ghalib, H. W. *et al.* Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections. *The Journal of clinical investigation* **92**, 324-329 (1993).
- 23 Karp, C. L. *et al.* In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *The Journal of clinical investigation* **91**, 1644-1648 (1993).

- 24 dos Santos, P. L. *et al.* The severity of visceral leishmaniasis correlates with elevated levels of serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS neglected tropical diseases* **10**, e0004375 (2016).
- 25 Costa, D. L. *et al.* Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathogens and global health* **107**, 78-87 (2013).
- 26 Bourgeois, N. *et al.* Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **48**, 13-19 (2008).

Figure legends

Figure 1. Serum levels (pg/mL) of IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, and IL-2 in a patient with Visceral Leishmaniasis/HIV coinfection before and after treatment with liposomal amphotericin B.

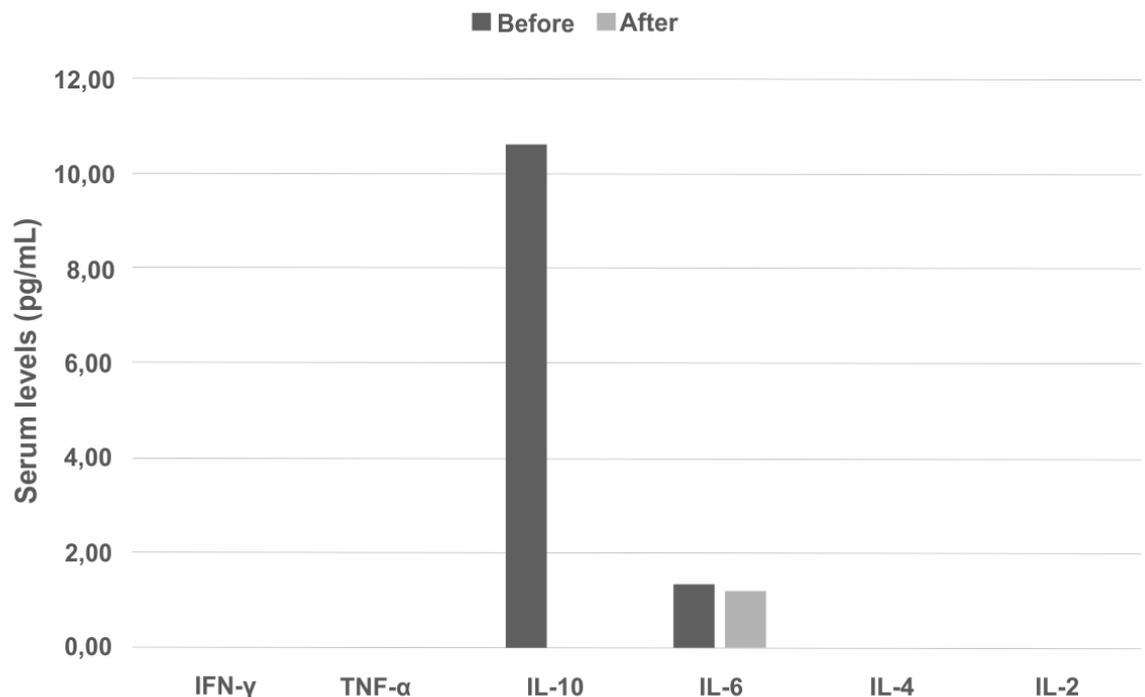
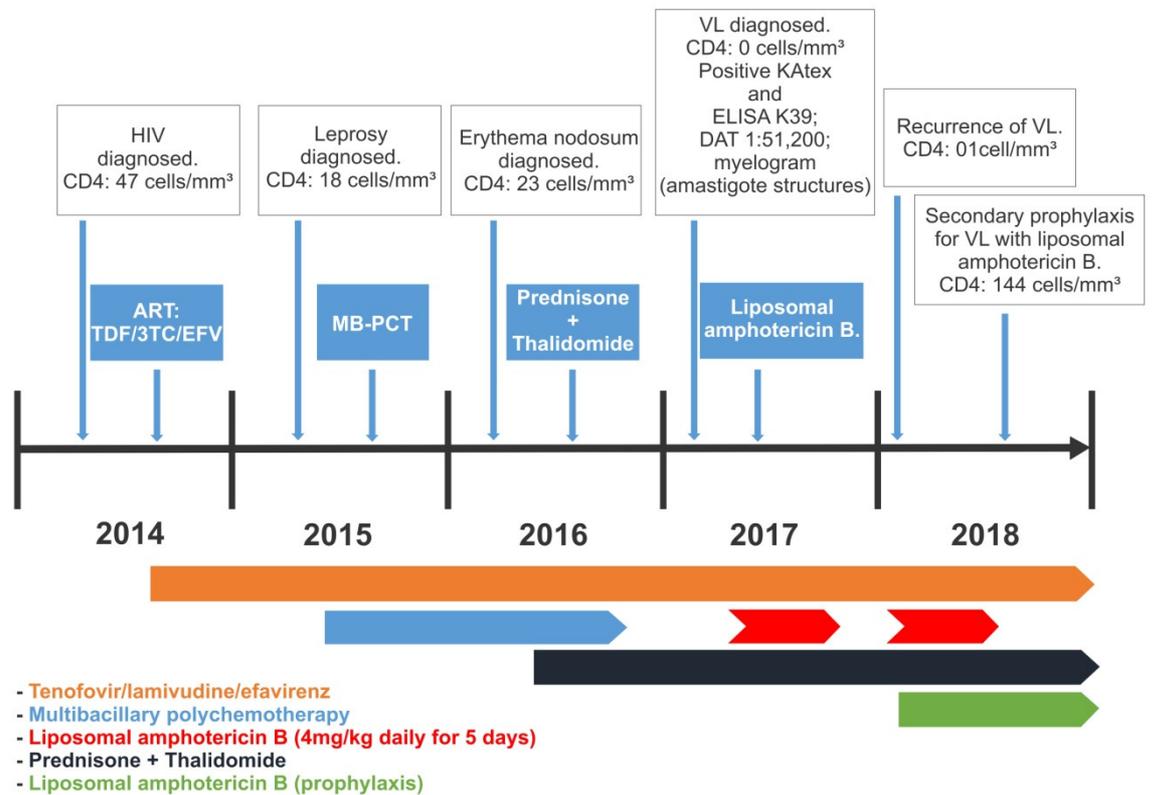


Figure 2. Patient timeline showing diagnosis time, CD4 counts and therapy scheme.



ART: antiretroviral therapy, DAT: direct agglutination test, MB-PCT: multibacillary polychemotherapy, TDF/3TC/EFV: tenofovir/lamivudine/efavirenz, VL: visceral leishmaniasis

11 ANEXOS

Anexo A – Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação de fatores associados a diminuição da carga parasitária em pacientes com Leishmaniose viscerai

Pesquisador: Rodrigo Feliciano do Carmo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 99849718.2.0000.5198

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.168.850

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa está ligado ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas e da Saúde e a sua equipe executora é composta por: LUCYO FLAVIO BEZERRA DINIZ, SAMUEL RICARTE DE AQUINO e RODRIGO FELICIANO DO CARMO. O projeto contempla todas as seções essenciais para a análise ética.

Objetivo da Pesquisa:

2. Os objetivos estão bem delineados, são exequíveis, estão em acordo com a metodologia proposta e podem ser atingidos no prazo estipulado pelo cronograma;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

3. Em parecer anterior, foi solicitado que o pesquisador elencasse os riscos pelo quais os participantes da pesquisa estariam expostos, assim como a forma de mitigação destes riscos. O pesquisador inseriu a seguinte sentença na página 18 do projeto "porém todas as etapas do procedimento, desde a coleta de sangue e de medula óssea, será realizado por profissional habilitado, com larga experiência na realização desses procedimentos, a coleta será feita em sala de procedimentos e/ou consultório médico com acomodações apropriadas e posicionamento favorável para cada tipo de coleta utilizando material adequado e padronizado, resultando em menor desconforto e possibilidade de ocorrência de eventos adversos aos pacientes".

Continuação do Parecer: 3.168.850

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

4.6 Foi solicitado ao pesquisador que descrevesse na metodologia "se haverá algum critério para separação dos grupos com a indicação dos dois tipos de tratamentos medicamentosos citados na página 14 do projeto detalhado aos participantes de pesquisa." o que o pesquisador respondeu: "Foi inserida nas seguintes sentenças: "e separados em 2 grupos definidos pelo tratamento medicamentoso que realizarão (01 grupo que tratará com anfotericina B e 01 grupo que tratará com Antimoniato Pentavalente)" (Página 12 do projeto corrigido). A compreensão de que haveriam dois grupos distintos de tratamento já havia sido identificada por esse comitê, no entanto, não ficaram claros os CRITÉRIOS (motivos) que vão definir quais pacientes serão tratados com medicação A e quais serão tratados com a B. É necessário informar se o tipo de tratamento está sendo avaliado (se A é melhor ou pior que B). Neste caso, os pacientes serão randomizados para o tratamento? Se sim, qual a forma de randomização? Se não, por favor, definir o critério (motivos) para medicar alguns pacientes com anfotericina B e outros com Antimoniato Pentavalente?".

O pesquisador informou neste parecer (página 12 do projeto) que: "definidos a partir dos critérios de gravidade e indicação de tratamento medicamentoso segundo o manual de recomendações clínicas para o tratamento de Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (MS) de 2011 que estabelece o uso da anfotericina B lipossomal para pacientes com critérios de gravidade (que serão descritos abaixo) e Antimoniato Pentavalente para os pacientes sem critérios de gravidade. Os grupos de pacientes serão divididos em 2 onde 10 utilizarão Anfotericina B lipossomal e 10 utilizarão Antimoniato Pentavalente". "Critérios de gravidade segundo MS (2011): Idade menor que 1 ano; Idade maior que 50 anos; Insuficiência renal; Insuficiência hepática; Insuficiência cardíaca; transplantados cardíacos, renais ou hepáticos; Intervalo QT corrigido maior que 450 ms; uso concomitante de medicamentos que alteram o intervalo QT; hipersensibilidade ao antimonial pentavalente ou a outros medicamentos utilizados para o tratamento da LV; infecção pelo HIV; Infecção pelo HIV (profilaxia secundária); comorbidades que comprometem a imunidade; uso de medicação que compromete a imunidade; falha terapêutica ao antimonial pentavalente ou a outros medicamentos utilizados para o tratamento da LV gestantes".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

5. O TCLE foi reformulado, atendendo as pendências pontuadas no parecer anterior. No entanto, foi solicitado observar a necessidade da inclusão da forma de mitigação dos riscos que serão rescritos conforme solicitação 4. O pesquisador informou na página 26 e 27 do projeto que: "porém todas as etapas do procedimento como coleta de sangue, será realizado por profissional

Continuação do Parecer: 3.168.850

habilitado, com larga experiência na realização desses procedimentos, a coleta será feita em sala de procedimentos e/ou consultório médico com acomodações apropriadas e posicionamento favorável para coleta de sangue, utilizando material adequado e padronizado, resultando em menor desconforto e dor ao paciente". "Lembrando que todas as etapas do procedimento, desde a coleta de sangue e de medula óssea, será realizado por profissional habilitado, com larga experiência na realização desses procedimentos, a coleta será feita em sala de procedimentos e/ou consultório médico com acomodações apropriadas e posicionamento favorável para cada tipo de coleta utilizando material adequado e padronizado, resultando em menor desconforto e possibilidade de eventos não desejados ao paciente". "Em caso de ocorrer qualquer dos efeitos adversos descritos acima, haverá solicitação de avaliação médica para averiguar as medidas necessárias a serem tomadas. Os pacientes que necessitarem de atendimento hospitalar serão transportados por meio de ambulância do Serviço Atendimento Médico de Urgência do município de Petrolina".

Recomendações:

6. Recomendamos aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

7. O projeto foi corrigido e atende aos aspectos éticos de proteção aos participantes da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

É com satisfação que informamos formalmente a V^{ra}. Sr^a. que o projeto "Determinação de fatores associados a diminuição da carga parasitária em pacientes com Leishmaniose visceral" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVASF. A partir de agora, portanto, o vosso projeto pode dar início à fase prática ou experimental. Informamos ainda que no prazo máximo de 1 (um) ano a contar desta data deverá ser enviado a este comitê um relatório sucinto sobre o andamento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1211416.pdf	24/01/2019 18:54:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	24/01/2019 18:52:57	Rodrigo Feliciano do Carmo	Aceito

Continuação do Parecer: 3.168.850

Outros	Carta_Resposta_CEP_Samuel_Ricarte_2.pdf	09/01/2019 22:41:25	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Samuel_Ricarte_Carta_Resposta_2.docx	09/01/2019 22:39:22	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	03/12/2018 15:45:23	Rodrigo Feliciano do Carmo	Aceito
Orçamento	Orcamento_Samuel.pdf	29/09/2018 17:58:39	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_COMPROMISSO_DO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL_RODRIGO FELICIANO DO CARMO.p	28/09/2018 20:29:11	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_confidencialidade_Samuel_Ricarte_de_Aquino.pdf	28/09/2018 20:24:10	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE_E_SIGILO_RODRIGO_FELICIANO_DO_CARMO.pdf	28/09/2018 20:23:49	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_confidencialidade_de_Lucyo_Flavio_Bezerra_Diniz.pdf	28/09/2018 20:22:31	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_de_anuencia_HU_UNIVASF.pdf	28/09/2018 20:21:51	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_de_anuencia_da_prefeitura_petrolina.pdf	28/09/2018 20:21:27	SAMUEL RICARTE DE AQUINO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PETROLINA, 25 de Fevereiro de 2019

**Assinado por:
Luciana Duccini
(Coordenador(a))**