

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PERIURBANIZAÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E EMERGÊNCIA DA CO-  
INFECÇÃO HIV/LEISHMANIA, NO RIO GRANDE DO NORTE.**

**ELIANA LÚCIA TOMAZ NASCIMENTO**

**NATAL/RN**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PERIURBANIZAÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E EMERGÊNCIA DA CO-  
INFECÇÃO HIV/LEISHMANIA, NO RIO GRANDE DO NORTE.**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Selma M.B. Jeronimo**

**NATAL/RN**

**2009**

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

N244p

Nascimento, Eliana Lúcia Tomaz.

Periurbanização da leishmaniose visceral e emergência da co-infecção HIV/leishmaniose, no Rio Grande do Norte / Eliana Lúcia Tomaz Nascimento. – Natal, 2009.

84p.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Selma Maria Bezerra Jerônimo.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Leishmaniose Visceral – Periurbanização – Tese. 2. Calazar – Tese. 3. Co-infecção HIV/Leishmania – Tese. I. Jerônimo, Selma Maria Bezerra. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.993.161(043.2)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde:

Prof. Dra. Técia Maranhão

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PERIURBANIZAÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E EMERGÊNCIA DA CO-  
INFECÇÃO HIV/LEISHMANIA, NO RIO GRANDE DO NORTE.**

**BANCA QUALIFICAÇÃO:**

**Prof.<sup>a</sup> Iara Marques de Medeiros (UFRN)**

**Prof.<sup>a</sup> Lara Melo Barbosa (UFRN)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PERIURBANIZAÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E EMERGÊNCIA DA CO-  
INFEÇÃO HIV/LEISHMANIA, NO RIO GRANDE DO NORTE.**

**EXAMINADORES:**

**Titulares:**

Prof. Dr Aldo Ângelo Moreira Lima. Universidade Federal do Ceará.

Prof. Dr. Emerson Luis Lemos Marinho. Universidade Federal do Ceará.

Prof.<sup>a</sup> Dra Iara Marques de Medeiros. Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof.<sup>a</sup> Dra Daniella R. A. Martins Salha. Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof<sup>a</sup> Dra Selma M. B. Jerônimo. Universidade federal do Rio Grande do Norte

**Suplentes:**

Prof<sup>a</sup> Dra Alda Cruz. FIOCRUZ. Rio de Janeiro.

Prof<sup>a</sup> Dra Claude Pirmez. FIOCRUZ. Rio de Janeiro.

Prof<sup>a</sup> Dra Regina F. Braz. Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof<sup>a</sup> Dra Lara Melo Barbosa. Universidade Federal do Rio Grande do Norte

## **AGRADECIMENTOS**

A George, meu filho, motivação maior para seguir em frente, fonte inesgotável de energia;

À minha família, apoio incondicional em todos os momentos, o eterno porto seguro;

À Selma, incansável dedicação à ciência, um exemplo a ser seguido;

Aos meus amigos, memoráveis confidências e alegrias, um brinde a cada conquista;

Aos colegas de trabalho, compreensão e reconhecimento, satisfação de compartilhar o conhecimento;

Aos pacientes, expectativa e confiança, a quem devo o retorno da sabedoria alcançada. Rogo a Deus que a ciência lhes traga dias mais felizes.



## SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ABTS</b>	2'2 Azino-di-(Ácido sulfônico 3-Etilbenzotiazolino)
<b>AIDS</b>	Síndrome da deficiência Humana adquirida
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CR1</b>	Receptor do complemento 1
<b>CR3</b>	Receptor do complemento 3
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>DTH</b>	Reação de hipersensibilidade cutânea do tipo tardia (delayed-type-hypersensitivity)
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-linked immunossorbent assay)
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>Gp63</b>	Glicoproteína de 63 KDa
<b>HAART</b>	Terapia antiretroviral altamente ativa
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>Inos</b>	Enzima óxido nítrico sintase induzida
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IGA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IL-3</b>	Interleucina-3
<b>IL-4</b>	Interleucina-4
<b>IL-5</b>	Interleucina-5
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-9</b>	Interleucina-9

<b>IL-10</b>	Interleucina-4
<b>IL-12</b>	Interleucina-12
<b>IL-13</b>	Interleucina-13
<b>IL-17</b>	Interleucina -17
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>kDNA</b>	DNA de cinetoplasto
<b>L.</b>	<b><i>Leishmania</i></b>
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LCM</b>	Leishmaniose cutâneo-mucosa
<b>LV</b>	Lishmaniose visceral
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicanos (Lipophosphoglycan)
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>N</b>	Normal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Íons superóxidos
<b>PBMC</b>	Células mononucleadas de sangue periférico
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>pg/ml</b>	Picogramas por mililitros
<b>PCR</b>	Reação de polimerização em cadeia
<b>Phox</b>	Enzima oxidase fagocítica
<b>rK39</b>	Anticorpo anti-cinesina recombinante
<b>RNI</b>	Intermediários reativos de nitrogênio
<b>ROI</b>	Intermediários reativos de oxigênio
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sódio.
<b>SLA</b>	Antígeno Soluvel de Leishmania

<b>TCD<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Célula T CD <sub>4</sub> .efetora
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento transformador beta.
<b>Th1</b>	Linfócitos T auxiliares tipo 1
<b>Th2</b>	Linfócitos T auxiliares tipo 2
<b>Th3</b>	Linfócitos T auxiliares tipo 3
<b>TNFα</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TNFβ</b>	Fator de necrose tumoral beta
<b>Treg cells</b>	Células regulatórias naturais

<b>SUMÁRIO</b>		<b>Página</b>
<b>I</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	Aspectos Gerais	1
<b>2</b>	Leishmaniose Visceral	1
<b>2.1</b>	Agente etiológico, reservatórios e vetores.	1
<b>2.2</b>	Transmissão	3
<b>2.3</b>	Aspectos imunológicos	3
<b>2.4</b>	Aspectos Clínicos	6
<b>2.5</b>	HIV/AIDS e co-infecção HIV/Leishmania	7
<b>2.6</b>	Aspectos diagnósticos e terapêuticos	7
<b>2.7</b>	Distribuição geográfica	10
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>III</b>	<b>PACIENTES E METODOLOGIA</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	Área do Estudo	15
<b>2</b>	Desenho de Estudo	15
<b>3</b>	Considerações Éticas	15
<b>4</b>	Diagnóstico de Infecção por Leishmania e de LV	17
<b>4.1</b>	Diagnóstico de infecção por Leishmania e de LV por ELISA com antígeno recombinante (rK39) e antígeno solúvel de Leishmania (SLA).	17
<b>4.2</b>	Diagnóstico de Infecção por Leishmania e de LV utilizando teste de hipersensibilidade tardia (DTH) ou teste de Montenegro	18
<b>5</b>	Diagnóstico de leishmaniose visceral	18
<b>6</b>	Caracterização dos fenótipos	18
<b>7</b>	Diagnóstico de HIV/AIDS	19
<b>8</b>	Seguimento clínico e laboratorial de casos de co-infecção HIV/leishmania	19
<b>9</b>	Análise Estatística	19

	Página	
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS</b>	22
<b>1</b>	Periurbanização da leishmaniose visceral no Rio Grande do Norte.	22
<b>1.1</b>	Características demográficas da LV no Rio Grande do Norte.	22
<b>1.2</b>	Características espaciais da LV no Rio Grande do Norte.	28
<b>1.2.1</b>	Evolução da LV no período de 1990-2009.	28
<b>1.2.2</b>	Relação incidência de LV e tamanho do município.	32
<b>1.2.3</b>	Detecção de conglomerados de Leishmaniose visceral (clusters).	34
<b>2</b>	Prevalência da infecção assintomática por Leishmania no RN;	37
<b>2.1</b>	Avaliação da Imunidade Celular – DTH.	38
<b>2.2</b>	Avaliação da imunidade humoral – Presença de anticorpo anti-Leishmania.	43
<b>3</b>	A emergência de co-infecção HIV/AIDS e LV no Rio Grande do Norte	47
<b>3.1</b>	Características demográficas, clínicas e laboratoriais da co-infecção HIV/leishmania no Rio Grande do Norte.	47
<b>3.1.2</b>	Análise comparativa entre casos de LV em pacientes HIV positivos e negativos	50
<b>3.2</b>	Distribuição espacial da co-infecção HIV/leishmania no RN	54
<b>V</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	57
<b>VI</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	64
<b>VII</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	65
<b>VIII</b>	<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa dos municípios do Rio Grande do Norte indicando por variação de cor, a taxa de transmissão de LV.	16
<b>Figura 2</b>	Distribuição dos casos de LV no Rio Grande do Norte, no período de 1990 a 2009, de acordo com a faixa etária.	24
<b>Figura 3</b>	Distribuição dos casos de LV no Rio Grande do Norte, no período de 1990 a 2009, de acordo com o sexo.	24
<b>Figura 4</b>	Distribuição temporal dos casos de LV do RN, por faixa etária, no período de 1990 a 2009.	25
<b>Figura 5</b>	Percentual de casos de LV do RN, no período de 1990 a 2009, de acordo com a faixa etária e o sexo.	27
<b>Figura 6</b>	Distribuição temporal, no período de 1990 a 2009, do percentual de casos de LV do RN, no sexo masculino indicando linhas de idades média, mínima e máxima de todos os casos do estado no mesmo período.	28
<b>Figura 7</b>	Distribuição anual de casos de LV do Rio Grande do Norte e incidência média anual por 100.000 hab., no período 1989-2009.	29
<b>Figura 8</b>	Distribuição dos casos de LV do RN, por município, em ordem decrescente de ocorrência e, percentual acumulado, incluindo 80% da totalidade de casos do estado, no período de 1990 a 2009.	30
<b>Figura 9</b>	Mapas da taxa de incidência de LV, considerando o número total de casos notificados no RN, no período de 1990 a 2009, por quinquênios (Box Plot).	31
<b>Figura 10</b>	Incidência média anual de LV, no período 1990 – 2009, de acordo com a população média do município no ano de 2000.	33
<b>Figura 11</b>	Percentual de municípios do RN com incidência de LV por/100.000 hab (A) maior que zero, (B) maior que 1, (C) maior que 2 e (D) maior que 5, distribuído por quinquênios, no período de 1990 a 2009.	34
<b>Figura 12</b>	Agregados ( <i>clusters</i> ) de municípios detectados pelo método de Indicadores de Associação Espacial Local – LISA e scatterplot de Moran, indicando municípios com alta associação espacial.	35
<b>Figura 13</b>	Incidência anual de LV nos municípios de Natal e Mossoró, no período 1990 a 2009.	37
<b>Figura 14</b>	Distribuição percentual acumulada do DTH na população da área endêmica para LV, do RN.	41

<b>Figura 15</b>	Enduração média do DTH e intervalo de confiança segundo a taxa de incidência de LV na família.	43
<b>Figura 16</b>	Incidência de LV (quadrados) e de AIDS (pontos), por 100.000 habitantes, no RN, no período de 2000 a 2007. Os triangulos mostram o percentual de doadores de sangue HIV positivos testados no mesmo período	50
<b>Figura 17</b>	Distribuição geográfica do total de casos de LV (A, mapas de cor verde) e AIDS (B, mapas de cor vermelha) notificados a Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Norte no período de 2000 a-2009.	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Incidência anual de casos de LV no Rio Grande do Norte, no período de 1990 a 2009.	23
<b>Tabela 2</b>	Distribuição temporal do percentual de casos de LV do RN, por sexo, no período de 1990 – 2009.	26
<b>Tabela 3</b>	Percentual de casos de LV do RN no período de 1990 a 2009, de acordo com o sexo e a faixa etária.	27
<b>Tabela 4</b>	Taxa de incidência de LV do RN, em municípios de diferentes portes, no período de 1990 a 2009.	32
<b>Tabela 5</b>	Municípios do RN com associação espacial local significativa ( $p < 0.01$ ) formando dois clusters de LV no estado (áreas pretas no mapa de p-valores).	36
<b>Tabela 6</b>	Distribuição dos fenótipos de infecção por Leishmania em áreas endêmicas do RN, de acordo com a presença de anticorpo anti-SLA e resposta ao teste de Montenegro (DTH).	38
<b>Tabela 7</b>	Média da endureção (mm) do DTH considerando os fenótipos.	39
<b>Tabela 8</b>	Média da endureção (mm do DTH) em famílias com e sem LV	39
<b>Tabela 9</b>	Coefficiente de correlação observado quando considerado a concordância entre o DTH e o parentesco.	40
<b>Tabela 10</b>	Análise do DTH em famílias residentes em áreas do RN, endêmicas para LV, considerando o percentual de membros da família com história de LV.	42
<b>Tabela 11</b>	Análise comparativa do DTH em famílias da área endêmica para LV do RN, considerando o percentual de parentes com história de LV.	42
<b>Tabela 12</b>	Prevalência de anticorpo segundo a incidência de LV na família.	43
<b>Tabela 13</b>	Taxa de infecção por Leishmania, considerando-se DTH e AC segundo a ocorrência de casos de LV na família.	44
<b>Tabela 14</b>	Taxa de infecção por Leishmania, considerando-se DTH e AC segundo o sexo dos indivíduos.	45
<b>Tabela 15</b>	Taxa de infecção por leishmania considerando-se Ac e DTH segundo a faixa etária.	46
<b>Tabela 16</b>	Comparação entre a positividade ao Ac e ao DTH em indivíduos acima de 40 anos da área endêmica para LV.	46
<b>Tabela 17</b>	Dados demográficos, clínicos e laboratoriais e de evolução clínica de	48



pacientes com co-infecção HIV/Leishmania.

<b>Tabela 18</b>	Apresentação clínica de pacientes HIV/Leishmania à admissão.	49
<b>Tabela 19</b>	Características clínicas à admissão, de pacientes HIV positivos e de pacientes HIV negativos, com LV, pareados por sexo e faixa etária.	51
<b>Tabela 20</b>	Características demográficas e laboratoriais, de pacientes HIV positivos e negativos, pareados por sexo e faixa etária.	53
<b>Tabela 21</b>	Estimativas dos parâmetros dos modelos de regressão espacial simples e múltipla.	55

## RESUMO

Leishmaniose visceral (LV) vem sofrendo modificações do ponto de vista clínico e epidemiológico mundialmente. Urbanização foi descrita em diferentes regiões do Brasil e do mundo, como também no estado do Rio Grande do Norte, influenciando sobremaneira no comportamento clínico da doença. Uma nova entidade clínica denominada co-infecção HIV/leishmania vem sendo descrita, como consequência da sobreposição de áreas de ocorrência de LV e HIV/AIDS, em diferentes países incluindo o Brasil. O objetivo deste estudo foi definir o processo de periurbanização da LV e descrever série de casos da co-infecção HIV/Leishmania no Rio Grande do Norte. Mudança no padrão demográfico da LV no RN foi detectada, sendo observado aumento no número de indivíduos na idade adulta, do sexo masculino. Análise da distribuição espacial demonstrou que nos últimos 20 anos LV tende a instalar-se em municípios de maior porte e, portanto, mais urbanizados do RN, sendo as regiões leste e oeste as de maior risco para a doença. A primeira região inclui Natal, capital do estado, onde o processo de periurbanização iniciou-se, em 1990 e, a outra, inclui a cidade de Mossoró, segunda maior do estado, onde a periurbanização iniciou-se nos últimos 5 anos. Também em 1990 registra-se a emergência da co-infecção HIV/ Leishmania no estado. Estudo tipo caso-controle revelou que a nova entidade clínica acomete indivíduos adultos do sexo masculino, que adquirem HIV por via sexual; 40% destes com história de infecção prévia por leishmania. Recaídas e óbito por LV é maior em pacientes HIV positivos comparados com pacientes HIV negativos, pareados por sexo e idade. Esse padrão é bastante semelhante ao europeu, exceto, pela via de transmissão, que ocorre lá de modo concomitante, por via parenteral, em usuários de drogas ilícitas. Adicionalmente, a análise de distribuição espacial identificou sobreposição de áreas de ocorrência de HIV/AIDS e LV no RN apontando para risco aumentado da nova entidade clínica descrita acima. Portanto, vigilância epidemiológica para co-infecção HIV/Leishmania deve ser adotada em todas as áreas de risco. Ao mesmo tempo, faz-se necessário avaliar resistência às drogas utilizadas atualmente, no tratamento da LV, bem como, transmissão parenteral de *L infantum/chagasi*, nas áreas onde a dependência de droga é fator de risco para aquisição de HIV.

## **ABSTRACT**

Visceral leishmaniasis (VL) has undergone changes in terms of clinical and epidemiological presentation worldwide. Urbanization has been described in different regions of Brazil and the world, as well as in the state of Rio Grande do Norte. These changes have impacted in the clinical outcome of Leishmania infection. A new clinical entity called co-infection of HIV/Leishmania has been described as a consequence of overlapping areas of occurrence of VL and HIV / AIDS in different countries including Brazil. The aim of this study was to define the process of periurbanization of the LV and describe a case series of co-infection HIV / Leishmania in Rio Grande do Norte. A new demographic pattern of VL was detected, with an increase in the number VL adult male subjects. Analysis of spatial distribution of VL in the state of Rio Grande do Norte showed that in the past 20 years VL tends to occur in larger cities and therefore the highest risk disease is greater in the eastern and western regions. The first region included Natal, the state capital, where the process of suburbanization began in 1990, and more recently the city of Mossoró, the second largest state, where periurbanization began in the last five years. In 1990, the emergence of co-infection HIV/Leishmania in the state was observed. Case-control study revealed that the new clinical entity affects adult males, who acquired HIV through sexual intercourse, 40% of those with a previous history of leishmania infection. Relapse and death from LV is increased in HIV positive compared with HIV-negative patients matched by sex and age. This pattern is similar to the observed in Europe, except of the route of transmission, where in Europe occurred concomitantly, by parenteral route in drug users. Analysis of spatial distribution identified overlapping new areas of occurrence of HIV / AIDS and LV potentially signaling to increased risk of this new clinical entity as described above. Therefore, epidemiological surveillance for co-infection HIV / Leishmania should be adopted in all areas of risk of VL. At the same time, it is necessary to evaluate drug resistance currently used in the treatment of VL, as well as parenteral transmission of *L infantum*/*chagasi* in areas where drug dependence is a risk factor for HIV acquisition

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Aspectos Gerais:

Leishmanioses compreendem um complexo de doenças, com grande diversidade clínica e epidemiológica, disseminadas no Velho e no Novo Mundo (1). Espécies do parasita, do vetor e dos reservatórios, bem como, fatores relacionados à imunidade do hospedeiro determinam a apresentação clínica sob a forma cutânea (LC), cutâneo-mucosa (LCM) ou visceral (LV) (2).

LC é causada, principalmente, por *Leishmania major* e *Leishmania tropica* no Velho Mundo e por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* no Novo Mundo; LCM é, mais freqüentemente, ocasionada no Novo Mundo por *Leishmania braziliensis*, enquanto que, no Velho Mundo, *L. major*, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* podem ser a causa em indivíduos imunossuprimidos; LV é determinada em ambas as regiões por espécies do complexo Donovanii (3). Embora associação entre a espécie de leishmania e a apresentação clínica da doença seja freqüente, espécies distintas podem produzir diferentes síndromes clínicas em diversas regiões do mundo. *Leishmania chagasi*, por exemplo, foi descrita como agente de LC na América Central (4). Da mesma forma, casos de forma visceral devido a *Leishmania amazonensis* e por *Leishmania tropica* foram relatados no Brasil e na Índia, respectivamente (5-7).

### 2. Leishmaniose visceral

#### 2.1. Agente etiológico, reservatórios e vetores.

Leishmanias são membros da ordem *Kinetoplastidae*, família *Trypanosomatidae*. São parasitas digenéticos apresentando-se sob duas formas morfológicas principais: amastigota, arredondada e intracelular encontrada dentro dos macrófagos e, promastigota, flagelada e extracelular encontrada no intestino do inseto transmissor.

As espécies que causam LV (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*) fazem parte do gênero *Leishmania*, pertencente ao complexo Donovanii (8). Estudos recentes do genoma do parasita têm mostrado que *L. infantum* e *L. chagasi* são a mesma espécie tendo sido trazida para o Novo Mundo com os colonizadores europeus (9;10). Outros pesquisadores discordam, apontando *L. chagasi* como espécie diferente daquela e, própria das Américas (11). Assim, até o momento, esta questão permanece em discussão na literatura, sendo *L. chagasi* ora referida como tal, ora referida como *L. infantum/chagasi* (12).

Canídeos silvestres, entre eles a raposa (*Dusicyon vetulus*) e marsupiais (*Didelphes albiventris* e *Didelphes marsupialis*) são considerados reservatórios naturais de leishmania. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) constitui-se excelente reservatório, visto que pode adoecer ou ser portador assintomático do parasita (13). A raposa por seus hábitos peridomiciliares é a principal responsável pela inter-relação entre os ciclos, silvestre e doméstico. Recentemente, roedores silvestres (14) e o gato doméstico (15) foram descritos como reservatórios acidentais de *Leishmania infantum/chagasi*, mas, a participação destes na urbanização da LV ainda não foi avaliada.

Tradicionalmente, nas Américas, o cão é considerado a principal fonte de infecção para o homem. Entretanto, nos últimos anos, questionamentos vêm sendo levantados acerca do seu papel na cadeia epidemiológica da LV humana. Os dados atuais da literatura sobre este ponto ainda são contraditórios. Dietze et al demonstraram que a eliminação de cães infectados não se associou à diminuição da transmissão de infecção por *Leishmania* para humanos, (16). Anteriormente, Evans et al observaram que não havia maior risco de infecção em humanos quando ocorria presença de cães infectados no domicílio, mas que crianças oriundas de famílias com história pregressa de LV tinham risco de infecção três vezes maior (17). Ambos sugerindo uma provável participação do homem como reservatório. Contrariamente, estudos de análise espacial revelaram correlação entre distribuição de casos caninos e humanos de LV e que, altas taxas de infecção canina aumentam a chance de transmissão para humanos, na presença do vetor (18). Adicionalmente, foi demonstrado que a retirada sistemática de cães soropositivos diminuiu a incidência de LV humana e canina nas áreas estudadas (19).

O vetor de *Leishmania infantum/chagasi* nas Américas são fêmeas hematófagas de insetos denominados flebotomíneos e, classicamente, descritos como do gênero *Lutzomyia*, espécie *longipalpis* (20). Recentemente, duas outras espécies (*Lu. evansi* e *Lu. cruzi*) foram apontadas como possíveis transmissoras do parasita em alguns países do continente americano (21;22). Demonstrou-se no passado que *Lu. longipalpis* era uma espécie silvestre, porém, com grande capacidade de adaptação aos anexos peridomiciliares (galinheiros) e ao próprio domicílio. Posteriormente, observou-se que o inseto instalara-se na área rural vivendo em locas de animais e frestas de pedras. Atualmente, o vetor está plenamente adaptado ao ambiente urbano onde encontrou nicho ecológico adequado; podendo ser capturado no peridomicílio, em abrigos de animais, bem como, no intradomicílio (23).

Flebotomíneos necessitam de substrato sólido para o desenvolvimento larvário, assim, a presença de solo rico em matéria orgânica em decomposição é primordial para a sua permanência no foco de transmissão. Outros fatores importantes são ventilação escassa, alto grau de umidade, proximidade do domicílio com a vegetação nativa e abundância de reservatórios (24). Entre outras, ações antrópicas têm oferecido condições adequadas para adaptação do vetor de *Leishmania infantum/chagasi* às áreas urbanas (25).

## **2.2. Transmissão**

*Leishmania infantum/chagasi* é transmitida para o homem, principalmente, por via vetorial. Outras vias, ocasionais, de transmissão incluem o uso de seringas contaminadas e transfusão de hemoderivados (parenteral), a via transplacentária (congenita) e contaminação em laboratório (ocupacional) (26). Nos dias atuais, a via parenteral tem se destacado em algumas regiões devido ao crescente número de co-infectados com HIV, sendo esta a principal forma de aquisição da doença nessa população (27).

LV é um exemplo típico de doença metaxênica (vertebrado reservatório - vetor-vertebrado susceptível). Desta forma, a transmissão vetorial permite a perpetuação do parasita e, ao mesmo tempo, determina infecção e/ou doença em seus reservatórios. O ciclo inicia-se quando o flebótomo adquire as formas amastigotas da leishmania, por sucção do sangue de reservatórios infectados; as quais, no interior do seu tubo digestivo, transformam-se em promastigotas metacíclicas e migram para a probóscida. Em um novo repasto sanguíneo, o vetor inocula, por regurgitação esofágica, no homem ou em outro mamífero susceptível, as formas infectantes. No sítio de inoculação, após vencer as barreiras de defesa natural, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e perdem o flagelo, transformando-se em amastigotas. Estas se multiplicam dentro do fagolisossomo, por divisão binária, até a ruptura da célula com liberação de inúmeros parasitas que irão infectar outros macrófagos atraídos para o local. Posteriormente, pode ocorrer disseminação para órgãos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear, determinando as várias formas clínicas da doença (28).

## **2.3. Aspectos imunológicos**

Para o controle da infecção por *Leishmania* é decisivo o padrão de resposta imune celular, o qual é direcionado pela imunidade inata, ativada na fase inicial da infecção. (29). A imunidade humoral é considerada não protetora no curso da doença. Há ativação policlonal de linfócitos B com produção de anticorpos da classe IgG, IgA e

IgE não específico e anti-leishmania porém, ineficientes em controlar a parasitose (30;31). O papel dos anticorpos anti-leishmania na fisiopatologia da LV foi sugerido no modelo murino de infecção por *Leishmania major* ao apontar-se a, potencial, participação de anticorpos na internalização das promastigotas pelos macrófagos (32). Pode ocorrer, ainda, formação de complexo antígeno-anticorpo determinado plaquetopenia e/ou nefropatia (33;34).

A adesão e internalização de promastigotas na célula fagocitária dão-se pela interação de moléculas de superfície do parasita (gp63 e LPG) com receptores do complemento (CR1 e CR3) da superfície da célula (35). Macrófagos são os sítios preferenciais de multiplicação da leishmania. A ação microbicida destas células é determinada pela produção, sob controle genético, de intermediários reativos de oxigênio (ROI), dependente da enzima oxidase fagocítica (Phox) e de intermediários reativos de nitrogênio (RNI), dependente da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (36). Em resposta à infecção por leishmania e, ativados por citocinas geradas por diversas outras células do sistema imune, macrófagos também produzem citocinas determinantes no curso da doença. Entre elas, IL-12 e TNF- $\alpha$ , responsáveis pela destruição do parasita, bem como, IL-10 e TGF- $\beta$ , favoráveis à multiplicação destes (37).

No tocante a imunidade celular, as disfunções envolvendo a célula TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> são cruciais no estabelecimento de uma resposta protetora, ou não, na LV. O modelo murino experimental revelou duas subpopulações destas células com habilidades funcionais distintas e reconhecidas pelo perfil de citocinas produzido quais sejam: o subtipo Th1 capaz de produzir IL-2, TNF- $\beta$  e INF $\gamma$  e, o subtipo Th2 produtor de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Contudo, parece haver um mecanismo de contra-regulação entre as subpopulações de linfócitos Th1 e Th2 (38). Entre eles, já é conhecida a participação de células regulatórias induzidas, no curso da infecção por *Leishmania* a exemplo da subpopulação de células Th3, desenvolvidas a partir de linfócitos TCD4 e produtoras de TGF $\beta$ . Mais recentemente, células regulatórias naturais (Treg cells) foram descritas como capazes de reativar a infecção crônica por *Leishmania*, no modelo animal (39-41).

Com relação às diferenças funcionais, verificou-se que os linfócitos Th1 estimulam a proliferação celular, levando a reação de hipersensibilidade cutânea tipo retardado (DTH) e, induzem a produção de isotípos de imunoglobulinas (IgG2a),

fixadores de complemento, favorecendo assim a fagocitose. Enquanto que, os linfócitos Th2 induzem a produção de IgG1, IgG3 e IgA, pouco fixadoras de complemento, além de IgE, a qual se liga a superfície do mastócito provocando reações de hipersensibilidade tipo imediato, típica dos processos alérgicos (42).

Experimentalmente, a infecção de diferentes linhagens de camundongos com *L. major*, demonstrou que a resposta imune a *Leishmania* apresenta-se polarizada para um dos subtipos da célula TCD4+. Na linhagem susceptível (BALB/c), há predomínio de citocinas produzidas por linfócitos Th2, sendo a doença progressiva e fatal. Enquanto na linhagem resistente, (C57BL/6), há produção de citocinas do perfil Th1 com auto-resolução e cura da infecção (43).

À semelhança do observado no modelo experimental, pacientes com LV apresentam evidências de supressão de células Th1 e ativação de células Th2. Está bem documentado que pacientes na fase ativa da doença não respondem ao teste intradérmico (DTH negativo) e à estimulação de linfócitos *in vitro*, com antígenos de leishmania; além de não produzirem citocinas Th1 (IL-2 e INF $\gamma$ ) em culturas de células estimuladas com antígenos específicos (44). Estas alterações, resultantes da supressão de células Th1, são reversíveis após o tratamento bem sucedido. Também foi demonstrado que altos níveis de IgE e IgG1 estão presentes no soro destes pacientes (45), bem como, de IL-4 (46) confirmando a participação de células Th2 na progressão da doença. O papel das células regulatórias na leishmaniose visceral humana ainda não está estabelecido. Entretanto, TGF  $\beta$  foi encontrado em níveis elevados no soro e em células da medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral do Rio Grande do Norte (Nascimento et. al, dados não publicados) evidenciando a participação das células Th3.

Influência do padrão de resposta imune na evolução clínica da infecção por *Leishmania* foi demonstrada em estudos em área endêmica. Verificou-se que crianças com a forma subclínica de LV e que apresentavam uma forte resposta proliferativa e teste intradérmico positivo a antígenos de leishmania não evoluíram para doença (47). Comparativamente, crianças da área endêmica, com infecção assintomática ou infecção subclínica, evoluindo com auto-resolução da infecção produziam maiores níveis de INF- $\gamma$  do que aquelas que evoluíram para doença (48). Em consonância com isto, experimentos, *in vitro*, indicam que linfócitos de pacientes com LV não produzem citocinas ativadoras de macrófagos, pois, o sobrenadante de suas células mononucleadas



cultivadas com antígenos de leishmania não foi capaz de ativar macrófagos para destruir leishmania (49).

Estudos assinalam que fatores nutricionais e ambientais podem contribuir com o desenvolvimento da LV, conforme bem documentado por estudos anteriores realizados no Rio Grande do Norte (50-52). Da mesma forma, há evidências crescentes da existência de diferenças genéticas entre modelos animais e entre as populações humanas com relação à infecção por parasitas intracelulares, incluindo Leishmania (53). Nosso grupo demonstrou agregação familiar de infecção e doença, por *L. chagasi* no RN e, recentemente, concluiu o estudo de varredura do genoma em uma população da área endêmica no estado onde a prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* é de 40%. Foi observado, nesta população, *loci* associados ao fenótipo doença (LV) e à infecção assintomática (DTH+) (54). Apesar das observações acima, os fatores específicos que determinam se um indivíduo desenvolverá infecção sintomática com *L. chagasi* ainda necessitam ser definidos.

#### **2.4. Aspectos clínicos:**

LV é uma protozoose sistêmica e grave cuja letalidade no Brasil, pode atingir cerca de 10%, quando não tratada adequadamente (55). A leishmania infecta células do sistema fagocitário mononuclear promovendo uma disfunção imunológica específica e determinando um amplo espectro clínico de doença caracterizado pelas formas: assintomática, subclínica e clássica (56-58).

Em áreas endêmicas, a maioria dos indivíduos apresenta infecção assintomática sendo confirmada por meio de positividade ao teste intradérmico a antígenos de leishmania (Montenegro) e/ou aos testes sorológicos que detectam anticorpo anti-leishmania. A doença, quando ocorre, acomete principalmente crianças, de ambos os sexos e, varia do quadro subclínico ao clássico. Estudo prospectivo realizado em Jacobina/BA revelou que 25% das crianças com a forma subclínica de LV progrediram para a forma clássica em um período que variou de 2 a 10 meses. Os outros 75% evoluíram para cura, sem tratamento específico, após um período prolongado de aproximadamente 35 meses (59). De forma semelhante, estudo de coorte realizado no Ceará, cujos participantes eram crianças na faixa de 3 a 9 anos, mostrou uma taxa de soroconversão anual de 5% ao ano, com 13% dos indivíduos infectados evoluindo para doença. O período entre a soroconversão e o diagnóstico de calazar variou de 3 a 14 meses (60).

A forma clássica da LV cursa, em geral, de modo arrastado, embora apresentação aguda também possa ocorrer. O quadro clínico se caracteriza por febre prolongada, hepatoesplenomegalia volumosa e desnutrição acentuada, além de anemia, leucopenia, fenômenos hemorrágicos e infecções bacterianas secundárias. É comum, atraso do crescimento nas crianças, retardo na puberdade nos adolescentes e amenorréia nas mulheres. Icterícia é manifestação rara no calazar podendo relacionar-se à infecção leishmaniótica, à presença de infecção bacteriana concomitante (colestase trans-inecciosa) ou outra hepatopatia, principalmente co-infecção com agentes virais. Insuficiência hepática pode ser um evento final nas formas graves e refratárias da doença. Casos não tratados evoluem, invariavelmente, para o óbito em 1 a 2 anos, em geral por infecções bacterianas.

### **2.5. HIV/AIDS e co-infecção HIV/ Leishmania**

AIDS foi descrita no início da década de 80, nos Estados Unidos e em 1983 um vírus da família *Retroviridae* denominado HIV (vírus da imunodeficiência humana) foi identificado como seu agente etiológico por pesquisadores franceses e americanos, quase simultaneamente. (Centers for Disease Control. Pneumocystis pneumonia, Los Angeles. MMWR 30 (21): 250-252, 1981; Barre-Sinoussi et al, Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220:868-71, 1983; Gallo, RC et al Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patient with AIDS and at risk for AIDS. Science 224: 500-3, (1984). O HIV infecta linfócitos TCD4 provocando destruição progressiva destas células. Em média, cinco anos após a infecção instala-se pronunciada imunossupressão favorecendo o surgimento de infecções oportunistas como tuberculose, infecções fúngicas, virais, por protozoários, bem como, neoplasias, entre outras situações clínicas, consideradas isoladamente ou associadas condição definidora de AIDS. ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)).

Leishmaniose visceral foi inicialmente reconhecida como doença oportunista em pacientes com AIDS na Espanha acometendo, especialmente, usuários de drogas endovenosas (100). Com o processo de urbanização da LV, leishmania tornou-se um importante agente de infecção oportunista em pacientes vivendo com HIV/AIDS em outras regiões. A co-infecção HIV/Leishmania pode ter apresentação clínica bastante diversificada. A maioria das vezes se apresenta de forma clássica, porém, não são raras as formas atípicas com manifestações digestivas, pulmonares e cutâneas, ou ainda, pode

apresentar-se como febre de origem obscura. A evolução pode ser rapidamente progressiva e fatal e, recaídas pós-tratamento são freqüentes (61).

## **2.6. Aspectos diagnósticos e terapêuticos:**

O diagnóstico de LV é confirmado, tradicionalmente, pela pesquisa de amastigotas de leishmania em aspirados de medula óssea corados pelo Giemsa ou Wright. Contudo, este método além de doloroso e de exigir profissional especializado, apresenta sensibilidade relativamente baixa (62). A punção esplênica tem elevada sensibilidade (96% a 98%), porém oferece risco de hemorragia (63). O isolamento de leishmania em meios de cultura específicos, a partir de biópsia tecidual e de sangue periférico, pode ser um processo demorado e de custo mais elevado para ser usado na rotina nas áreas endêmicas.

O teste de hipersensibilidade cutânea retardada (DTH) aos antígenos de leishmania apresenta alta positividade em indivíduos residentes em área endêmica com infecção assintomática (64), sendo negativo nas formas sintomáticas devido à imunossupressão celular específica. É, portanto, um bom marcador de resolução de infecção, mas, não de doença.

Os métodos sorológicos mais comumente utilizados são imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Por utilizarem como fonte de antígeno, o parasita inteiro ou extrato do parasita, a especificidade destes testes é baixa (65). Apesar de serem mais aplicáveis a inquéritos epidemiológicos podem ser realizados em alguns casos clínicos sem confirmação parasitológica. Reações cruzadas podem ocorrer com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, hanseníase, tuberculose, esquistossomose e malária.

O ELISA com o antígeno recombinante K39, de uma proteína relacionada à família das cinesinas, cujo gene é expresso predominantemente em amastigotas de *L. chagasi* e *L. donovani* (66) apresentou especificidade, de aproximadamente 100%, em diferentes populações: Brasil e Sudão (67); China e Paquistão (68). No Rio Grande do Norte, esse antígeno também mostrou elevada sensibilidade (94%) e especificidade (99,5%) para o diagnóstico de LV (69). Adicionalmente, foi também verificado nessa população que anticorpos anti-rK39 estavam presentes em apenas 2,7% de indivíduos assintomáticos com teste intradérmico positivo, confirmando que o rK39 é um marcador de doença ativa (70). Entretanto, seu uso é ainda limitado à pesquisa científica, mas há previsão de que um dot-ELISA utilizando o antígeno rK39 esteja disponível no Brasil em 2010.

A reação de polimerização em cadeia (PCR) com amplificação de regiões específicas do DNA do cinetoplasto e/ou cromossômico de leishmania, tem se mostrado um método rápido e sensível podendo ser realizado no sangue periférico, bem como, em aspirados esplênicos e de medula óssea (71). A PCR, utilizando DNA extraído do sangue periférico, em pacientes indianos apresentou positividade de 93% entre os doentes e de 72% entre os suspeitos (72), indicando ser um bom método para confirmação de infecção. Também foi possível identificar o DNA de leishmania em indivíduos assintomáticos da área endêmica, com teste intradérmico positivo ou negativo (73); (Jerônimo et al., dados não publicados). Como permite detectar cargas parasitárias muito baixas, foi sugerido que a PCR poderá servir como marcador de resposta terapêutica (74).

Entre as modernas técnicas de PCR lançadas, a PCR em tempo real capaz de quantificar o DNA e de identificar a espécie de leishmania, tem-se destacado pela rapidez do resultado e pela possibilidade de avaliação da resposta terapêutica (75;76). Essa técnica, a nível experimental, tem revelado potencial utilidade, especialmente, em pacientes co-infectados com HIV, os quais apresentam elevado índice de recaída da doença (76).

O tratamento de escolha da LV no Brasil continua sendo realizado com o antimonial pentavalente (antimoniato de N-metil glucamina), por via intravenosa ou intramuscular, na dose de 20 mg/ Kg/dia por um período que varia de 20 a 28 dias. Apesar de geralmente bem tolerada, a aplicação do antimonial requer hospitalização para monitorização dos efeitos colaterais. Alterações eletrocardiográficas comumente ocorrem na 2ª semana de tratamento sem repercussões hemodinâmicas (77), porém, em alguns casos podem exigir a suspensão da droga. A toxicidade renal é de ocorrência rara (78), mas alterações das enzimas hepáticas são frequentes (79). Muitos pacientes apresentam elevação da amilase e lipases séricas e alguns deles podem apresentar pancreatite grave, principalmente se há insuficiência renal associada (80-82). Resistência ao antimonial ainda é rara no Brasil, porém, recaídas após tratamento da LV em co-infectados com HIV vêm sendo observado.

A anfotericina B e a pentamidina são drogas alternativas ao tratamento convencional, somente indicada, nos casos de falência ao primeiro esquema (83-86). Porém, também exige hospitalização além de ter maior toxicidade e o custo ser mais elevado. A anfotericina B, em suspensão lipossomal, tem melhorado sua tolerabilidade e reduzido o tempo de internação, entretanto, o custo é ainda mais alto (87).

Medicamentos de uso oral como alopurinol, cetoconazol, aminosidina e sitamaquina não têm até então, eficácia comprovada para serem utilizadas isoladamente na LV. Entretanto, miltefosine, uma droga oral, inicialmente mostrou-se eficaz no tratamento de casos de LV resistentes ao antimonial na Índia (88-90). No entanto, o uso de miltefosine no tratamento da LV não mostrou boa eficácia no Brasil (Dietze R, comunicação pessoal), apesar de dados iniciais mostrarem uma boa eficácia no tratamento da LC (Machado P, comunicação pessoal).

Para pacientes com co-infecção HIV/leishmania não há uma clara definição da droga mais eficaz e do tempo de tratamento. O antimonial parece ser menos eficaz que anfotericina B, especialmente, as formulações lipídicas. Falhas terapêuticas e recaídas são frequentes com qualquer esquema usado. Na Europa, tem sido relatada taxa de resposta favorável aos antimonials de 83%. No entanto, 52% dos pacientes recaíram em um período de 1 mês a 3 anos. A OMS sugere terapias alternativas que podem incluir pentamidina, anfotericina B convencional ou anfotericina B lipossomal. As formulações lipídicas reduzem o risco de nefrotoxicidade, porém não o de recaídas. Recomenda-se terapia de manutenção quinzenal ou mensalmente, utilizando-se antimônio, anfotericina B ou pentamidina (91-93).

O tratamento da LV durante a gravidez visa curar a gestante e evitar a transmissão congênita da leishmania. Os antimonials estão proscritos, pois atravessam a barreira placentária e podem provocar retardo mental no concepto. A anfotericina B pode ser uma opção; entretanto, atenção especial deve ser dada à nefro e à cardiotoxicidade. Há propostas para o emprego da aminosidina; no entanto, há limitações pela toxicidade e pela pouca experiência clínica. Os antimonials podem ser usados nas nutrízes sem restrições.

## **2.7. Distribuição geográfica**

As áreas endêmicas para leishmaniose visceral (LV) encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, ocorrendo em 65 países onde 200 milhões de pessoas vivem sob risco de infecção por Leishmania e registram-se 500.000 novos casos de LV por ano. Entretanto, cerca de 90% destes concentram-se em pobres áreas rurais e suburbanas de apenas cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (94). No Brasil ocorrem cerca de 3000 casos por ano sendo a maioria dos casos notificados no nordeste (95), Sobreposição de áreas de ocorrência de LV e HIV/AIDS, em todos os continentes, propiciou o surgimento de nova entidade clínica, a co-infecção HIV/Leishmania, atualmente já relatada em 34 países (96).

Classicamente, são descritos dois padrões epidemiológicos da doença no mundo. No Sul da Ásia e na África Subsariana, LV é, predominantemente, uma antroponose tendo como reservatório o homem e como vetor, insetos do gênero *Phlebotomus*; sua transmissão é urbana e é causada por *Leishmania donovani*. Na bacia do Mediterrâneo (Europa) e nas Américas, LV é primariamente uma zoonose tendo mamíferos domésticos e silvestres como reservatórios e, insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são os vetores, respectivamente; a transmissão é rural e peri-urbana, sendo causada, principalmente, por *Leishmania infantum*, na Europa e, exclusivamente, por *Leishmania chagasi*, nas Américas (97). Em alguns países da África e da Ásia, bem como, na Itália há infecção tanto por *L. donovani* quanto por *L. infantum* (98).

Nas últimas duas décadas, modificações dos padrões epidemiológicos descritos vêm acontecendo mundialmente, sob influência de diversos fatores. Alterações ambientais como intenso processo migratório e desmatamento, além de pressões sociais e econômicas são os principais fatores de risco para a ocorrência de novos casos em uma determinada área. Fatores de risco individuais incluem infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), desnutrição e fatores genéticos (99). LV é, portanto, uma endemia em franca expansão, com aumento de incidência em regiões previamente atingidas e disseminação para áreas não afetadas.

Nos países europeus do Mediterrâneo (Espanha, França, Itália, e Portugal), LV tinha baixa endemicidade, entretanto, em meados da década de 80, emergiu de modo epidêmico entre portadores de infecção pelo HIV, sendo a maioria dos casos registrados na Espanha onde o primeiro caso foi descrito em 1985 (100). Transmissão homem a homem passou a ser documentada nessa população, por via parenteral, através do compartilhamento de agulhas e seringas entre usuários de drogas ilícitas. Epidemias também foram descritas na Ásia e na África resultante das migrações populacionais por razões ocupacionais e por situações de guerra, bem como, em consequência da deterioração das condições socioeconômicas em regiões suburbanas de grandes cidades (101).

No continente americano, LV tinha alta endemicidade em áreas rurais, com 90% dos casos notificados na América Latina e destes, 92% eram registrados no nordeste do Brasil. Nos últimos 20 anos, com a migração rural-urbana e crescimento não planejado de grandes cidades, LV re-emergiu sob a forma de epidemias, em áreas urbanas, no Brasil e em muitos outros países da América do Sul. Transmissão peri-

urbana passou a ser observada nessas áreas, bem como, crescente registro de co-infecção com HIV (102). Risco de expansão de LV para regiões indenes das Américas foi demonstrado pela detecção de *Lutzomya longipalpis* na Argentina (103) e na Colômbia (104), bem como, pela ocorrência de surtos de LV em canis dos Estados Unidos e Canadá (105; 106). Ao mesmo tempo, casos humanos já foram descritos na Argentina, em paciente natural da Espanha (107) e, em Nova York em co-infectado com HIV, com história de viagem para área endêmica (108).

O processo de urbanização da LV no Brasil iniciou-se nos anos 80 quando epidemias passaram a ocorrer em diversas capitais nordestinas (109-111) e progressivamente, estenderam-se para as demais regiões. Assim, na década de 90, apesar do considerável aumento do número de casos no país (de 1.510 em 1991 para 4.858 em 2000), em consequência do aumento da área de abrangência da doença, o percentual de casos no nordeste reduziu de 90% até os anos 90 para 77% a partir de 2000. Desde então, os estados do Pará e Tocantins (Região Norte), Mato Grosso do Sul (Região Centro-Oeste), Minas Gerais e São Paulo (Região Sudeste) passaram a influenciar de modo significativo no total de casos de LV no Brasil.

No país, atualmente, em função desta ampla distribuição, LV assume perfil bastante diversificado determinado, sobretudo, por influência de alterações climáticas. Inicialmente transportada da zona rural, de áreas de vales e montanhas com clima seco e baixa precipitação pluviométrica, para áreas de terra firme na periferia de grandes centros urbanos, inclusive no litoral, onde também há pobreza e precárias condições sanitárias; LV ocorre agora em áreas centrais de cidades da região Centro-Oeste e Sudeste, com clima ameno, maior precipitação pluviométrica e melhores condições de vida, caracterizando um novo perfil social da doença (8). Por outro lado, em Teresina /PI e em São Luiz/MA os picos de maior incidência da doença foram precedidos por longos períodos de seca que ocasionaram grande êxodo rural; da mesma forma, na Bahia observaram-se nítida correlação entre o fenômeno do El Niño e a incidência anual de LV (112). Paralelamente, a instalação da LV em áreas peri-urbanas fez surgir em algumas regiões casos de co-infecção com HIV como já relatado (95) o que, certamente terá uma participação efetiva na mudança do padrão epidemiológico e clínico das duas doenças no Brasil.

No Rio Grande do Norte, aumento de número de casos de LV passou a ser observado em Natal, a partir de 1989 mantendo-se elevado nos anos seguintes, caracterizando, assim, o padrão epidêmico da doença. Fatores como rápido

crescimento populacional, migração urbana e expansão da cidade para áreas pouco povoadas anteriormente, influenciaram sobremaneira a instalação da LV na zona periurbana da capital do Estado (113). Adicionalmente, foi demonstrado que variações climáticas determinaram variações na densidade populacional de *Lu. longipalpis* e que, o aumento da população do vetor coincidiu com o aumento do número de casos de LV em municípios da área peri-metropolitana de Natal (114). Por outro lado, casos de co-infecção com HIV também passaram a ser observado entre nós (115).

Portanto, leishmaniose visceral vem sofrendo profundas modificações do ponto de vista clínico-epidemiológico mundialmente. Urbanização foi descrita em diferentes regiões e também no Rio Grande do Norte o que vem influenciando sobremaneira no comportamento clínico da doença. Assim, o objetivo deste estudo é descrever 20 anos de periurbanização de LV no Rio Grande do Norte e demonstrar o impacto da mudança do perfil epidemiológico da doença no seu padrão clínico ao relatar a emergência de co-infecção HIV/Leishmania no estado.



## **II. Objetivos**

### **Objetivo Geral:**

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento da Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Norte, no período de 1990-2009, e demonstrar a emergência da nova entidade clínica “Co-infecção HIV/Leishmania” em áreas periurbanas do estado.

### **Objetivos Específicos:**

1. Caracterizar o processo de periurbanização da leishmaniose visceral no Rio Grande do Norte  
- Seguimento de 20 anos.
2. Determinar a prevalência da infecção assintomática por leishmania no RN.
3. Relatar série de casos de co-infecção HIV/Leishmania.

### **III. PACIENTES E METODOLOGIA**

#### **1. Área de estudo**

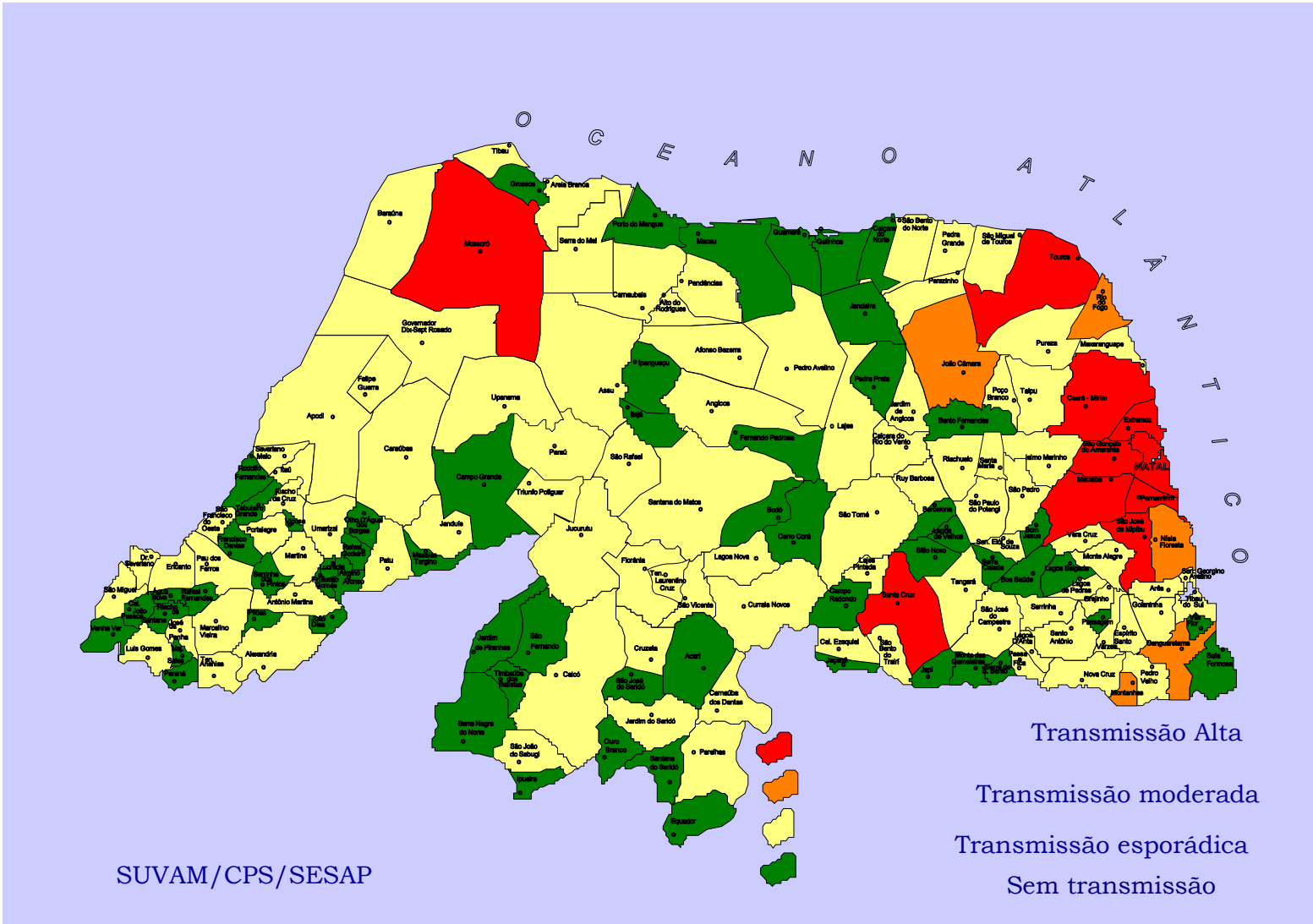
A área de estudo englobou diversas cidades do estado do Rio Grande do Norte com notificação de casos de LV, sendo a maioria da população estudada residente nos distritos Norte e Oeste de Natal e na área periurbana de Natal, incluindo principalmente os municípios de Macaíba, Parnamirim, São Gonçalo do Amarante, Nísia Floresta, São José de Mipibú, Extremoz e Ceará Mirim. A figura 1 mostra as principais áreas de notificação de LV, destacando em vermelho as áreas recentes de maior transmissão da doença.

#### **2. Desenho do estudo**

1. Estudo da demografia e da distribuição espacial da LV no Rio Grande do Norte. Foi realizada uma análise evolutiva das características demográficas e espaciais da leishmaniose visceral no estado, no período de 1990 a 2009, a partir de dados obtidos na Secretaria de Estado da Saúde Pública.
2. Estudo coorte. No período de 1996 a 2009, foi realizado um estudo prospectivo das famílias residentes na área endêmica para LV no estado do Rio Grande do Norte, identificadas a partir de casos notificados à Secretaria Estadual de Saúde Pública, sendo estudados 2438 indivíduos.
3. Descrição de série de casos de Co-infecção HIV/leishmania: São relatados 17 casos de LV em pacientes, co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana, internados no Hospital Giselda Trigueiro em Natal/RN, no período de 1990 a 2009.
4. Estudo da Sobreposição de áreas de AIDS e LV no Rio Grande do Norte. Foi realizada uma análise comparativa da distribuição espacial da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) e da leishmaniose visceral no RN, no período de 2000 a 2007, a partir de dados obtidos na Sec.de Estado da Saúde.

#### **3. Considerações éticas**

O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP-UFRN) e pela comissão nacional de ética em pesquisa (CONEP), sob os números, CEP-UFRN 19-01 e CONEP 4572 e, CEP-UFRN 172-06 e CONEP 13.745. Todos os participantes do estudo ou o representante legal assinaram termo de consentimento livre e esclarecido como parte do protocolo citado acima.



**Figura 1.** Mapa dos municípios do Rio Grande do Norte indicando por variação de cor a taxa de transmissão de Leishmaniose Visceral (Fonte: SUVAM/CPS/SESAP/RN).

#### **4. Diagnóstico de infecção por Leishmania.**

A identificação de infecção por leishmania, na população de área endêmica (n = 2438), foi realizada por avaliação da resposta imune humoral (sorologia) e/ou celular (teste de Montenegro) ao parasita. Não foi possível, em todas as análises estatísticas utilizar o número total de indivíduos por diferentes motivos incluindo mudança de endereço, impossibilidade de coleta de amostra de sangue, de realização ou de leitura do teste de Montenegro, entre outras.

##### **4.1. Diagnóstico de infecção por Leishmania e de LV por sorologia (ELISA) utilizando antígeno recombinante rK-39 e extrato solúvel de antígenos (SLA), obtidos de promastigotas de *Leishmania chagasi*.**

A detecção de anticorpos anti-leishmania no soro de pacientes com suspeita de LV e indivíduos residentes na área endêmica para LV foi realizada por ELISA, utilizando antígenos solúveis de *L. chagasi* (116) e a proteína recombinante (rK39) (117). Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato (15mM) bicarbonato (28mM) pH 9,6, sendo aplicados a micro placa (Falcon Probind, cat. n<sup>o</sup> 3915) e incubados por 18 horas, a 4°C. Após a incubação, o excesso de antígeno foi removido por lavagem e o tampão de bloqueio (PBS/Tween20 1%) foi adicionado e mantido por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada 4 vezes com PBS/Tween20 0,1% e os soros dos pacientes e dos controles negativos, diluídos em PBS, foram aplicados nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:10000, sendo incubados por 1 hora, a temperatura ambiente. Subseqüentemente, procederam-se a remoção do soro e a lavagem dos poços, conforme descrito anteriormente. Após esta etapa, o anticorpo secundário (conjugado anti-IgG-peroxidase, diluído 1:4000, para o SLA) ou a proteína-A (marcada com peroxidase, diluída 1:10000, para o antígeno rK39) foi adicionado e incubado por 1 hora. O excesso de anticorpo secundário foi, então, desprezado e a placa foi novamente lavada, nas mesmas condições anteriores, para aplicação do substrato (peróxido de hidrogênio), na presença do cromógeno (ABTS, 0,001 mM) diluído em tampão citrato (29,3 mM)-fosfato (41,1 mM, pH 4.2); o qual, permaneceu por 1 hora, a temperatura ambiente, quando a reação foi interrompida pela adição de SDS 5%. A intensidade da cor desenvolvida é proporcional à quantidade de anticorpo presente na amostra. A densidade óptica foi lida a 405nm (Titerteck Instruments, Inc., Huntsville, AL, EUA), com posterior estabelecimento de um ponto de corte (0,145 para o SLA e 0,416 para o rK39), que corresponde à média das absorvâncias dos soros controles negativos na

diluição 1:500 e 1:100 mais três desvios padrões para SLA e proteína rK39, respectivamente.

#### **4.2. Diagnóstico de infecção por *Leishmania* utilizando o teste de hipersensibilidade tardia (Teste de Montenegro).**

A avaliação da imunidade celular específica foi realizada utilizando-se antígeno de *leishmania* gentilmente cedido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiologia (CPPI, Secretaria de Saúde de Estado do Paraná, Curitiba/PR). Estes antígenos são oriundos de uma preparação de *Leishmania amazonensis* e são os únicos antígenos disponíveis no Brasil e usados pelo Ministério da Saúde. Após assepsia local com álcool a 70%, 100 µl de antígeno (25 µg de proteína), foi aplicado via intradérmica na face externa do antebraço esquerdo. A leitura foi realizada 48- 72 horas após a inoculação do antígeno, sendo considerados positivos indivíduos cuja área de endureção foi  $\geq 5$  mm.

#### **5. Diagnóstico de leishmaniose visceral.**

Os indivíduos admitidos com suspeita clínica de LV, no hospital Giselda Trigueiro, no hospital infantil Varela Santiago, no hospital Maria Alice Fernandes e no hospital de pediatria da UFRN em Natal/RN e, no hospital Rafael Fernandes em Mossoró/RN, apresentando febre, emagrecimento, hepatoesplenomegalia e hemograma revelando anemia, leucopenia e plaquetopenia tiveram o diagnóstico confirmado por demonstração do parasita em exame direto e/ou cultura de aspirado de medula óssea e/ou detecção de anticorpos anti-*leishmania* por sorologia. A técnica sorológica utilizada foi ELISA com antígeno solúvel de *L. chagasi* e antígeno recombinante rK-39, conforme descrito acima.

#### **6. Caracterização de fenótipos**

Com base em dados clínicos, sorológicos e imunológicos, a população estudada foi caracterizada em quatro fenótipos, a saber:

1. LV: Paciente com LV sintomática ou com história pregressa de LV.
2. DTH +: Indivíduo que apresentou auto-resolução da infecção, detectado por positividade ao teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania*, sem história de tratamento para leishmaniose.
3. DTH-/Anticorpo +: Indivíduo com teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de *leishmania* negativo e sorologia positiva (presença de anticorpo anti-*leishmania* no soro). Este grupo de indivíduos provavelmente teve infecção recente podendo evoluir para qualquer um dos fenótipos indicados (60;118;119)

4. DTH-/Anticorpo-: Indivíduo residente na área endêmica para LV, sem sinais de infecção.

## 7. Diagnóstico de HIV/AIDS

O diagnóstico de infecção por HIV foi realizado no laboratório central do estado (LACEN/RN) utilizando-se detecção de anticorpos anti-HIV por ELISA com confirmação por Western blot. Em alguns casos foi quantificada a carga viral, bem como, os linfócitos T CD4 e CD8. O diagnóstico de AIDS foi baseado nos critérios adotados pelo Ministério da Saúde do Brasil (CDC modificado e Rio de Janeiro-Caracas). O MS considera como definição de caso de AIDS, em adolescentes e adultos, todo indivíduo com idade  $\geq 13$  anos, com sorologia positiva para HIV e pontuação  $\geq 10$  em uma escala de sinais, sintomas e condições concomitantes associadas com AIDS conforme consta na página ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)) e descrito abaixo:

Sarcoma de Kaposi ou tuberculose disseminada = 10 pontos;

Candidíase oral ou tuberculose pulmonar ou disfunção do SNC = 05 pontos

Diarréia ou febre ou caquexia ou astenia ou anemia = 02 pontos

## 8. Seguimento clínico-laboratorial de casos de co-infecção HIV/Leishmania.

Parâmetros clínicos, de diagnóstico e de terapêutica, bem como, dados de avaliação laboratorial inespecífica, dos pacientes com co-infecção HIV/Leishmania foram obtidos dos prontuários médicos, em visitas semanais, durante o período de internação e após a alta, no arquivo médico do hospital.

## 9. Análise Estatística

A incidência média anual de LV, por 100.000 habitantes, no período de k anos foi calculada segundo a fórmula abaixo, para cada quinquênio e para todo o período de 20 anos (1990 – 2009).

$$IC = 100000 \frac{\sum_1^k Detected_i}{\sum_1^k Population_i}$$

Os cálculos foram feitos por municípios e adicionados como atributos em um mapa do estado do Rio Grande do Norte. Em seguida, mapas temáticos tipo box-plot foram construídos para cada quinquênio usando o programa R version 2.9.0 – 2009-4-17 <http://www.r-project.org/>;

Para estudar a associação entre a taxa de incidência de LV e o tamanho do município, os 167 municípios do estado foram categorizados em quatro grupos segundo a sua incidência média anual no período de estudo. Faixas foram determinadas de acordo

com os percentís da distribuição da incidência para cada município do estado: ( $IC < 1$ ;  $1 \leq IC < 2$ ;  $2 \leq IC < 5$ ;  $IC \geq 5$ ). A população média no ano 2.000 foi calculada em cada um dos grupos;

Clusters de municípios de alto risco foram detectados usando indicadores espaciais de associação local e o diagrama de dispersão de Moran (120) (*Local Indicators of Spatial Association – LISA and Moran scatterplot*) (121). A primeira técnica consiste em mapear o estado calculando para cada município um índice de associação espacial, o índice de Moran. Considera-se a nível local, o referido município e seus vizinhos, avaliando-se a significância do grau de similaridade entre eles em relação a incidência de LV. A segunda técnica, Moran scatterplot, é uma ferramenta alternativa para mostrar a associação espacial do fenômeno estudado. Consiste em um *scatterplot* bidimensional, tendo no eixo horizontal, os valores padronizados (valor da variável menos sua média global dividida pelo desvio-padrão)  $z$  referentes aos municípios e, no eixo vertical, a média de seus municípios vizinhos  $wz$ . A idéia é comparar o valor da incidência de LV observada em um município com a média dos municípios vizinhos. Os  $n$  pontos correspondentes aos  $n$  municípios ficarão distribuídos nos quatros quadrantes definindo clusters dos tipos High-High (quadrante 1), High-Low (quadrante 2), Low-Low (quadrante 3) e Low-High (quadrante 4). Pontos afastados a mais de duas unidades da origem são considerados discrepantes (*outliers*).

A associação entre a ocorrência de LV e AIDS foi avaliada através do ajuste de dois *Modelos espacial autorregressivo misto (Spatial Autoregressive – SAR)*. O primeiro considerando como resposta a incidência de LV ao nível de município, no período 2000-2007 e, como co-variável a incidência de Aids no mesmo período. O segundo, uma regressão múltipla, considerando a mesma variável resposta, mas, ficando a incidência de AIDS em três diferentes períodos: 2000-2001, 2002-2004 e 2005-2007. O modelo difere do modelo linear ordinário por considerar a associação espacial entre as observações ao nível de município incorporando um termo auto-regressivo. Sua fórmula é:

$$y_i = \rho \sum_{j=1}^n w_{ij} y_j + \sum_{l=1}^k x_{il} \beta_l + \varepsilon_i$$

Onde  $y_i$  é a incidência de LV no município  $i$ ,  $\rho$  é o coeficiente espacial auto-regressivo,  $w_{ij}$  é um peso ponderando a proximidade entre os municípios  $i$  e  $j$ ,  $x_{il}$  é a incidência de

AIDS no município  $i$  e período  $j$ ,  $\beta_1$  é a associação entre LV e AIDS no período  $l$  e  $\varepsilon_i$  é o resíduo aleatório correspondente ao município  $i$ . A hipótese nula de que não existe autocorrelação (associação espacial) é  $H_0: \rho = 0$ , enquanto a hipótese nula de que não existe associação entre LV e AIDS no período  $l$  é  $H_0: \beta_1 = 0$ .

Gráficos estatísticos foram utilizados para uma visualização dos resultados, M-L-Chi-Square test foi aplicado para testar independência e homogeneidade de distribuições de variáveis categorizadas e ANOVA One Way test e teste de Tukey HSD foram aplicados na comparação de médias de variáveis contínuas entre grupos independentes (124).



## IV - RESULTADOS

### 1. Periurbanização de leishmaniose visceral no Rio Grande do Norte

#### 1.1. Características demográficas da leishmaniose visceral no Rio Grande do Norte

O Rio Grande do Norte registrou no período de 1990 a 2009, um total de 2836 casos de leishmaniose visceral (**Tabela 1**), com uma letalidade de 5,7%. Na mesma tabela verifica-se que o número de casos em 1990 foi o triplo ( $n = 97$ ) do número de casos do ano de 1989 ( $n = 36$ ) indicando surto. O padrão epidêmico foi mantido nos anos seguintes com variação sazonal. A análise dos dados demográficos demonstra que de um modo geral, a incidência em todo o período foi maior na faixa etária de 1 a 5 anos, com a maioria dos casos ocorrendo até os 10 anos de idade (**Figura 2**). Em relação ao sexo, no mesmo período, a maioria dos casos ocorreu no sexo masculino (**Figura 3**).

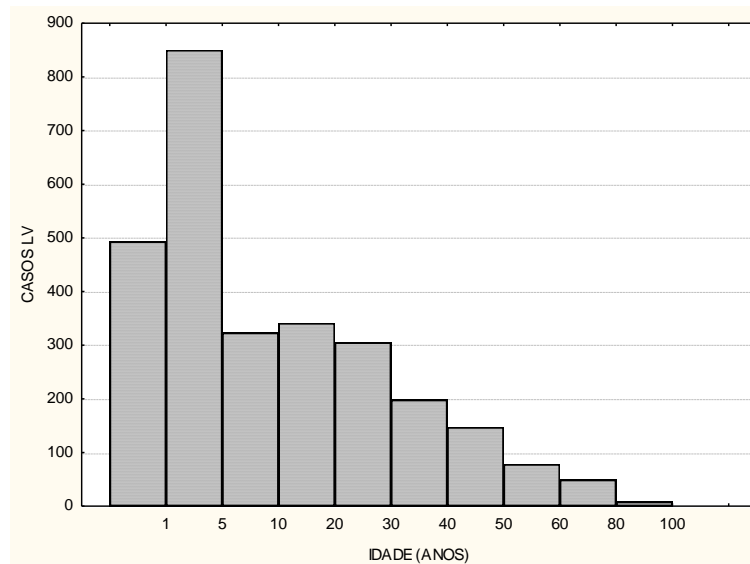
Entretanto, quando analisados o sexo e a idade dos pacientes com LV a cada ano observa-se que há variação temporal, no que se refere à faixa etária. A série de Box-Plots dos casos de LV mostrada na figura 4, considerando o período de 1990-2009 demonstra que os mesmos não mantêm, uniformemente no tempo, a distribuição por faixa etária ( $p < 0.0001$ ). As hastes ( $Média \pm 1,96SE$ ) dos Box-Plots representam o intervalo de confiança para a idade média em cada ano, indicando diferença significativa quando não se interceptam. Verifica-se que as médias nos últimos três anos são significativamente superiores às médias antes de 2001, ficando claro que a doença passou a acometer com maior intensidade pessoas adulta após o ano 2000. O contrário ocorre com a distribuição quanto ao sexo. A mesma é homogênea no tempo ( $p = 0,0722$ ) como demonstra o teste do qui-quadrado aplicado às referidas médias e, apresentado na **Tabela 2**. O percentual de pacientes do sexo masculino varia em torno de 64,84%.

A análise conjunta da distribuição do sexo e da idade no tempo demonstra que a distribuição do sexo depende da idade, ou seja, o percentual de pacientes do sexo masculino aumenta com a idade ( $p < 0,0001$ ), conforme mostrado na **Tabela 3 e Figura 5**.

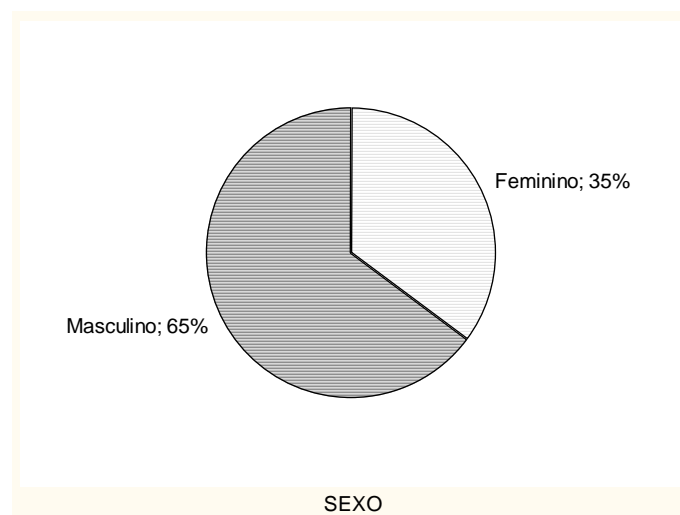
**Tabela 1:** Incidência anual de casos de LV no Rio Grande do Norte, no período de 1990 a 2009.

ANO	CASOS	INCID/100.000
1989	36	1,55
1990	97	4,10
1991	226	9,36
1992	268	10,98
1993	143	5,71
1994	144	5,66
1995	105	4,07
1996	87	3,40
1997	116	4,47
1998	135	5,14
1999	295	11,11
2000	375	13,50
2001	192	6,82
2002	125	4,38
2003	93	3,22
2004	67	2,29
2005	60	2,00
2006	91	2,99
2007	65	2,11
2008	80	2,58
2009	72	2,29

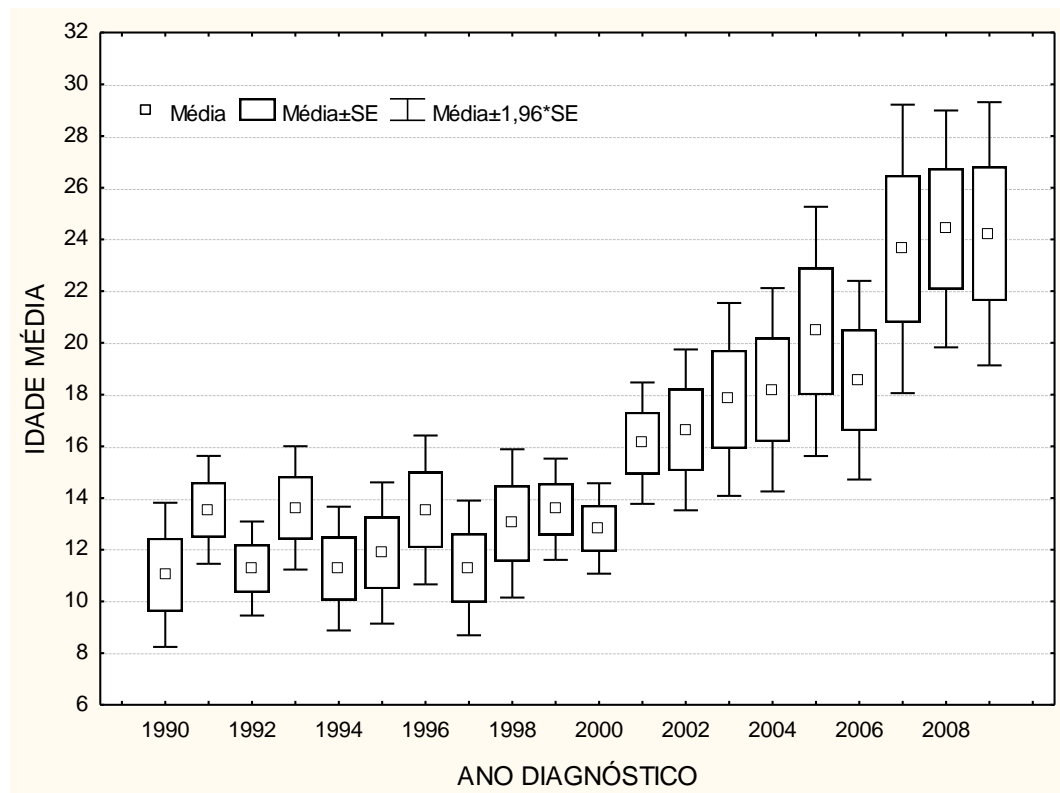
Fonte: SUVAM/CPS/SESAP/RN



**Figura 2.** Distribuição dos casos de LV no Rio Grande do Norte, no período de 1990-2009, de acordo com a faixa etária.



**Figura 3.** Distribuição dos casos de LV no Rio Grande do Norte, no período de 1990-2009, de acordo com a o sexo.



**Figura 4.** Distribuição temporal dos casos de LV do RN, por faixa etária, no período de 1990 a 2009.

**Tabela 2.** Distribuição temporal do percentual de casos de LV do RN, por sexo, no período de 1990 – 2009.

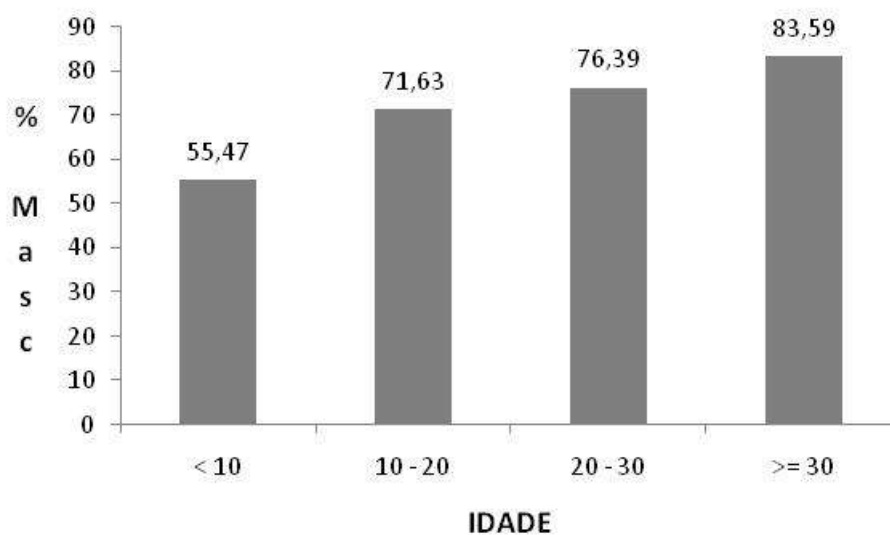
Ano	SEXO		Total (%)
	FEM (%)	MASC (%)	
1990	36,08	63,92	3,42
1991	38,94	61,06	7,97
1992	37,69	62,31	9,45
1993	37,76	62,24	5,04
1994	34,03	65,97	5,08
1995	38,10	61,90	3,70
1996	37,93	62,07	3,07
1997	49,14	50,86	4,09
1998	30,37	69,63	4,76
1999	36,95	63,05	10,40
2000	34,13	65,87	13,22
2001	27,08	72,92	6,77
2002	34,40	65,60	4,41
2003	27,96	72,04	3,28
2004	38,81	61,19	2,36
2005	23,33	76,67	2,12
2006	32,97	67,03	3,21
2007	36,92	63,08	2,29
2008	31,25	68,75	2,82
2009	30,56	69,44	2,54
Percentual	35,16	64,84	100,00

Fonte: SUVAM/CPS/SESAP/RN. Distribuição homogênea (P = 0.0722)

**Tabela 3.** Percentual de casos de LV do RN no período de 1990 a 2009, de acordo com o sexo e a faixa etária.

IDADE	FEM (%)	MAS (%)	Total (%)
< 10	44,53	55,47	57,99
10 – 20	28,37	71,63	12,75
20 – 30	23,61	76,39	10,92
>= 30	16,41	83,59	18,34
Total	35,03	64,97	100,00

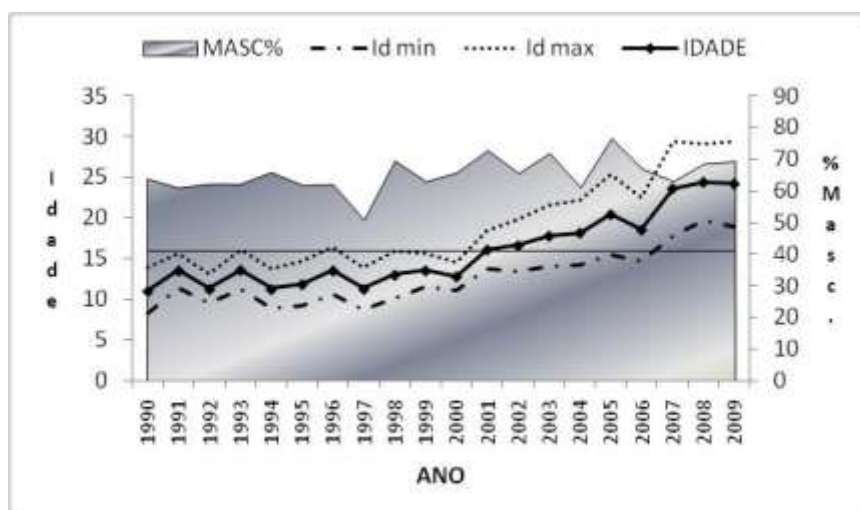
Fonte: SUVAM/CPS/SESAP/RN.  $p < 0.0001$



**Figura 5.** Percentual dos casos de LV do RN, no período de 1990 a 2009, de acordo com a faixa etária e sexo.

A análise da distribuição temporal dos casos de LV, no RN, entre 1990 a 2009, ocorridos no sexo masculino mostrou que o percentual de pacientes do sexo masculino evolui de forma estacionária no tempo. Por outro lado, constata-se que a idade do

paciente tem uma tendência crescente ao ponto da idade máxima, até o ano 2000, sendo a idade mínima superior ao referido ponto, a partir do ano 2007. Os dados acima são mostrados na figura 6 e revelam uma diferença estatisticamente significativa, ou seja, nos últimos 10 anos percebe-se mudança na demografia da LV.

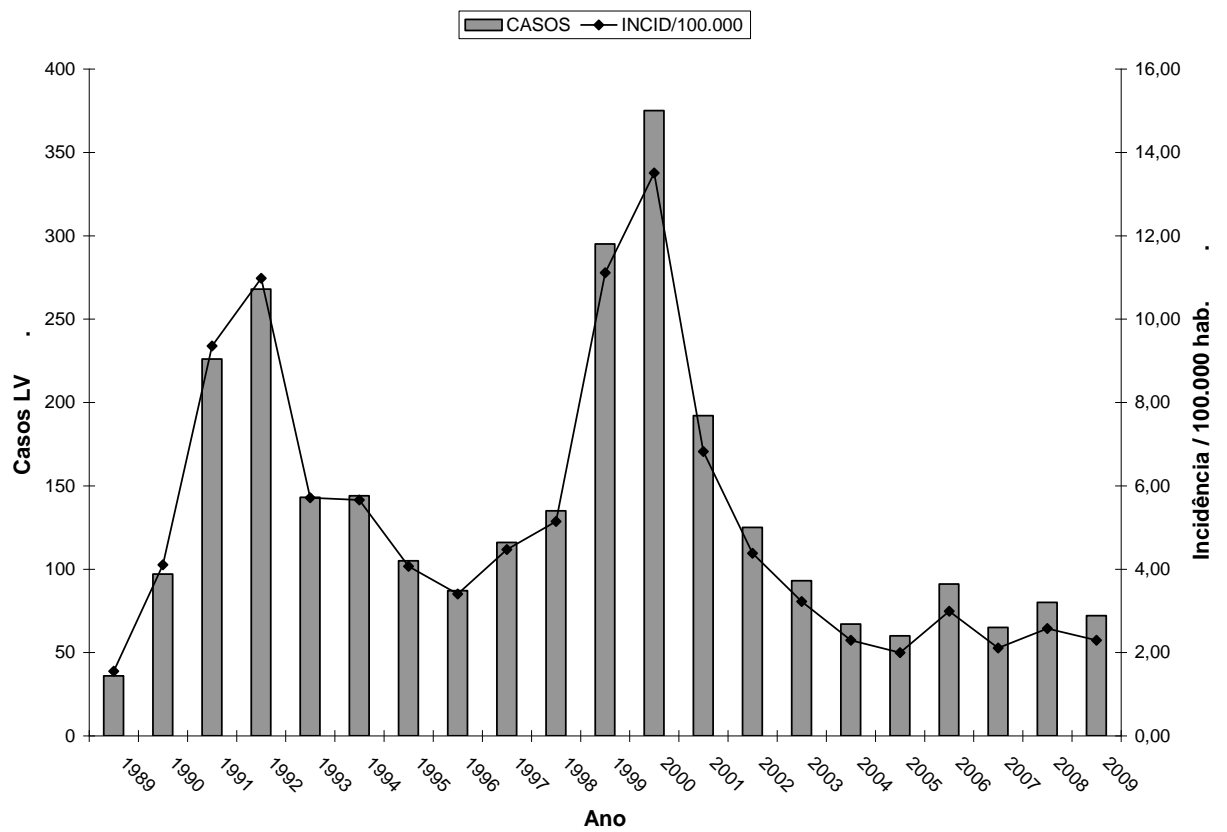


**Figura 6.** Distribuição temporal, no período de 1990 a 2009, do percentual de casos de LV do RN, no sexo masculino indicando linhas de idades média, mínima e máxima de todos os casos do estado, no mesmo período.

## 1.2. Características espaciais da LV no Rio Grande do Norte

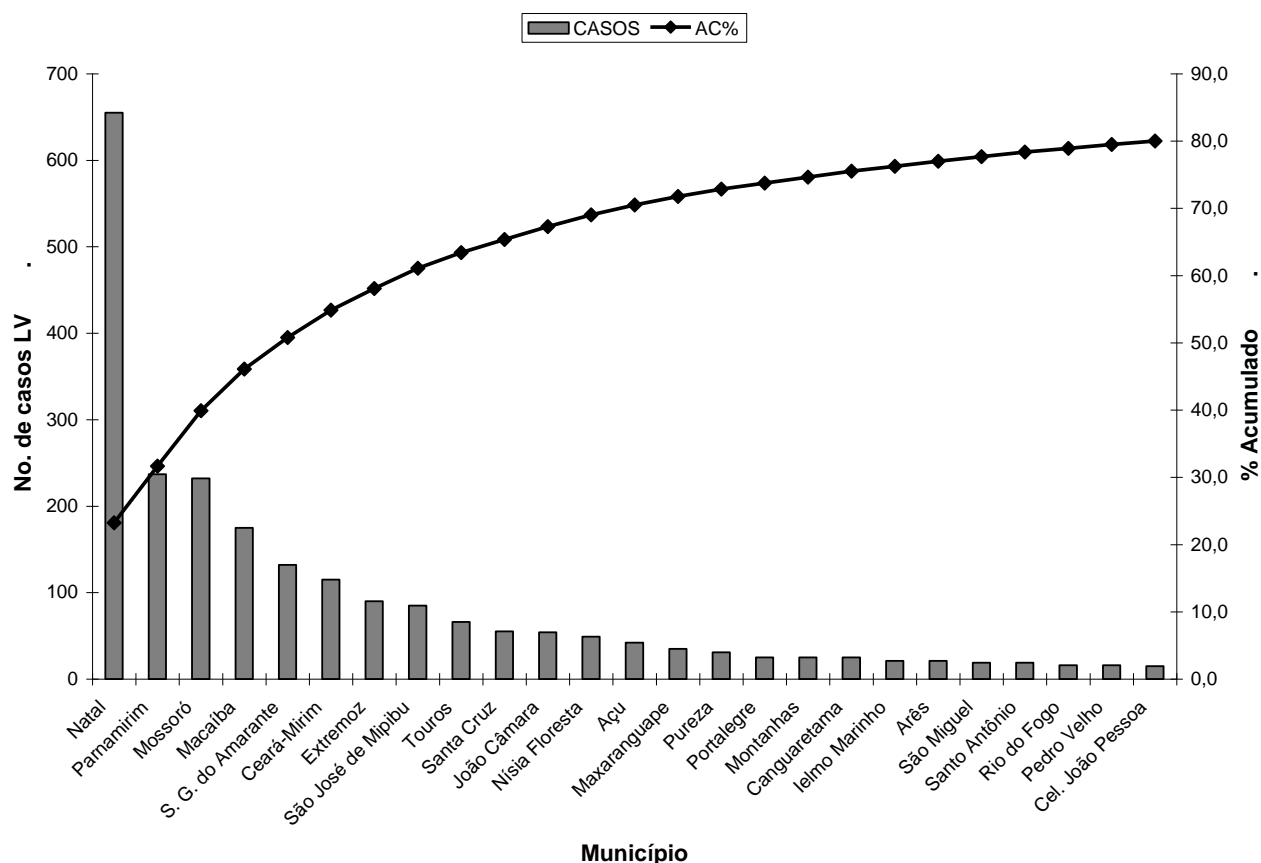
### 1.2.1. Evolução da LV no período de 1990-2009.

A leishmaniose visceral (LV) era uma doença de ocorrência rara no Rio Grande do Norte, restrita a áreas rurais. No entanto, a partir do final da década de 80 houve um aumento de notificação dos casos LV. No gráfico mostrado na **Figura 7** fica evidente que a distribuição dos casos do estado, no período de 1990 a 2009 ocorre de modo cíclico com picos de maior notificação a cada oito anos. Por outro lado, o gráfico mostrado na **Figura 8** mostra que a maioria destes casos é originária da área perimetropolitana de Natal, indicando as cidades que relataram 80% do total de casos de LV no Rio Grande do Norte, naquele período. Pode-se observar que apenas seis municípios (Natal, Parnamirim, Mossoró, Macaíba, São Gonçalo do Amarante e Ceará-Mirim) notificaram 60% do total dos casos de LV do estado.



**Figura 7.** Distribuição anual de casos de leishmaniose visceral do Rio Grande do Norte e incidência média anual por 100.000 hab. no período 1989-2009.

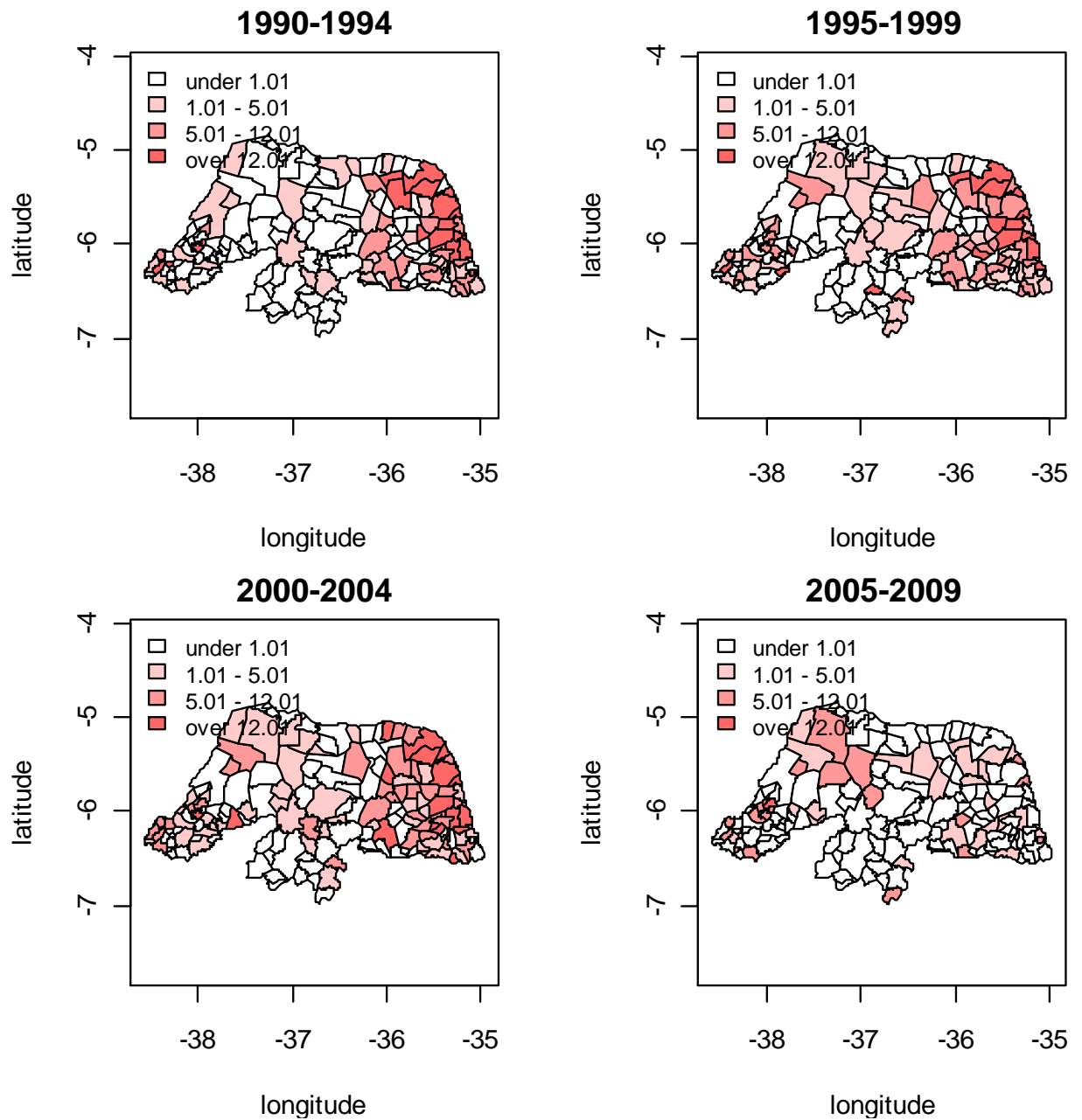




**Figura 8.** Distribuição dos casos de LV do RN, por município, em ordem decrescente de ocorrência e percentual acumulado, incluindo 80% da totalidade de casos do estado, no período de 1990 a 2009.

A Análise evolutiva da distribuição espacial da LV no RN, no período de 1990 a 2009 foi realizada com base na taxa média anual de incidência de LV, por 100.000 habitantes. A referida taxa foi calculada para os diversos municípios do estado, sendo os casos agregados temporalmente por quinquênios no período estudado. Mapas temáticos, um para cada quinquênio, da taxa de LV em todos os municípios são mostrados na **Figura 9** demonstrando sua variação espacial no tempo. No primeiro quinquênio, que corresponde aos anos de 1990 a 1994, percebem-se fortes manchas com taxas de LV acima de 12/100.000 nas regiões leste e oeste (“tromba do elefante”). Ao longo do tempo, nos dois quinquênios seguintes, as manchas da zona leste sofrem um aumento em seu raio de ação com variações na intensidade da doença e verifica-se maior concentração de casos na “tromba do elefante”, principalmente, no quinquênio 2000 – 2004, correspondendo ao pico da epidemia naquela área. No último quinquênio, 2005 – 2009,

as manchas da região leste tornaram-se mais suaves, contudo, observa-se um agravamento da situação na região Mossoró. A taxa de Mossoró é crescente aumentando bastante a partir do quarto quinquênio, sendo observado claramente pelo aumento da gradação da cor.



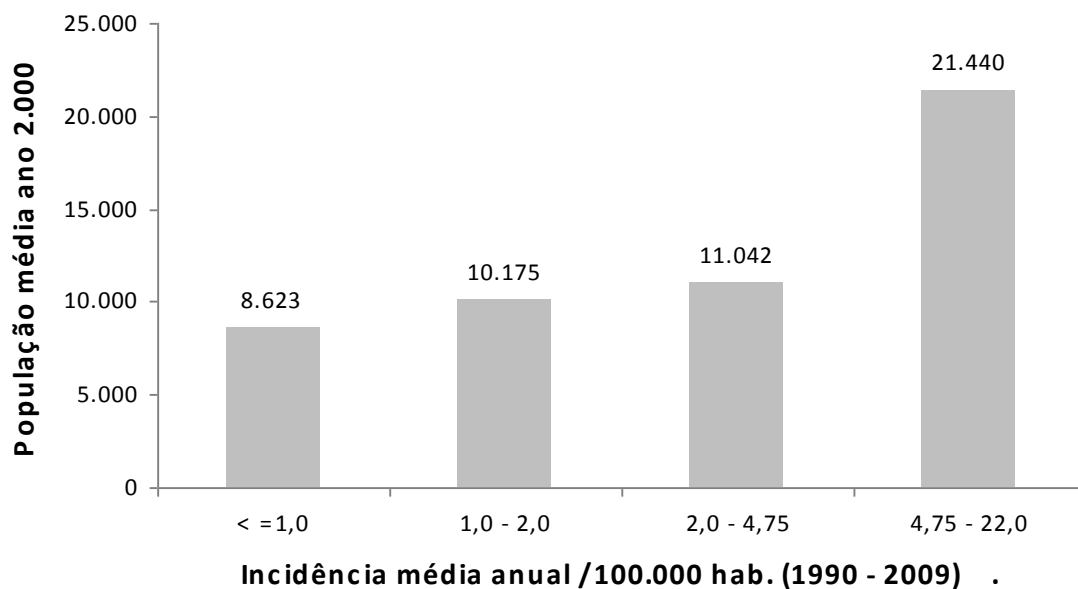
**Figura 9.** Mapas da taxa de incidência de LV, considerando o número total de casos notificados no estado do Rio Grande do Norte, por quinquênio (Box-plot).

### 1.2.2. Relação incidência de LV e tamanho do município

A análise da incidência média anual de LV no RN, no período de 1990 a 2009, nos diferentes municípios, classificados conforme a população média do ano de 2000 indica que a taxa de incidência cresce, claramente, com o aumento da população do município como pode ser visto na **Tabela 4** e **Figura 10**. Os dados sugerem que LV tende a se instalar nos municípios de maior porte e, portanto, nas áreas mais urbanas do estado. Nesta análise foi excluída a cidade de Natal que tem uma população bem superior às demais. Entretanto, para demonstrar a hipótese de alta incidência em áreas urbanas, a idéia é mais complexa, tornando-se necessária uma agregação dentro do município incluindo as zonas, rural e urbana, principalmente, considerando que a doença ocorre mais nas áreas periurbanas destas cidades, em áreas de ocupação recente.

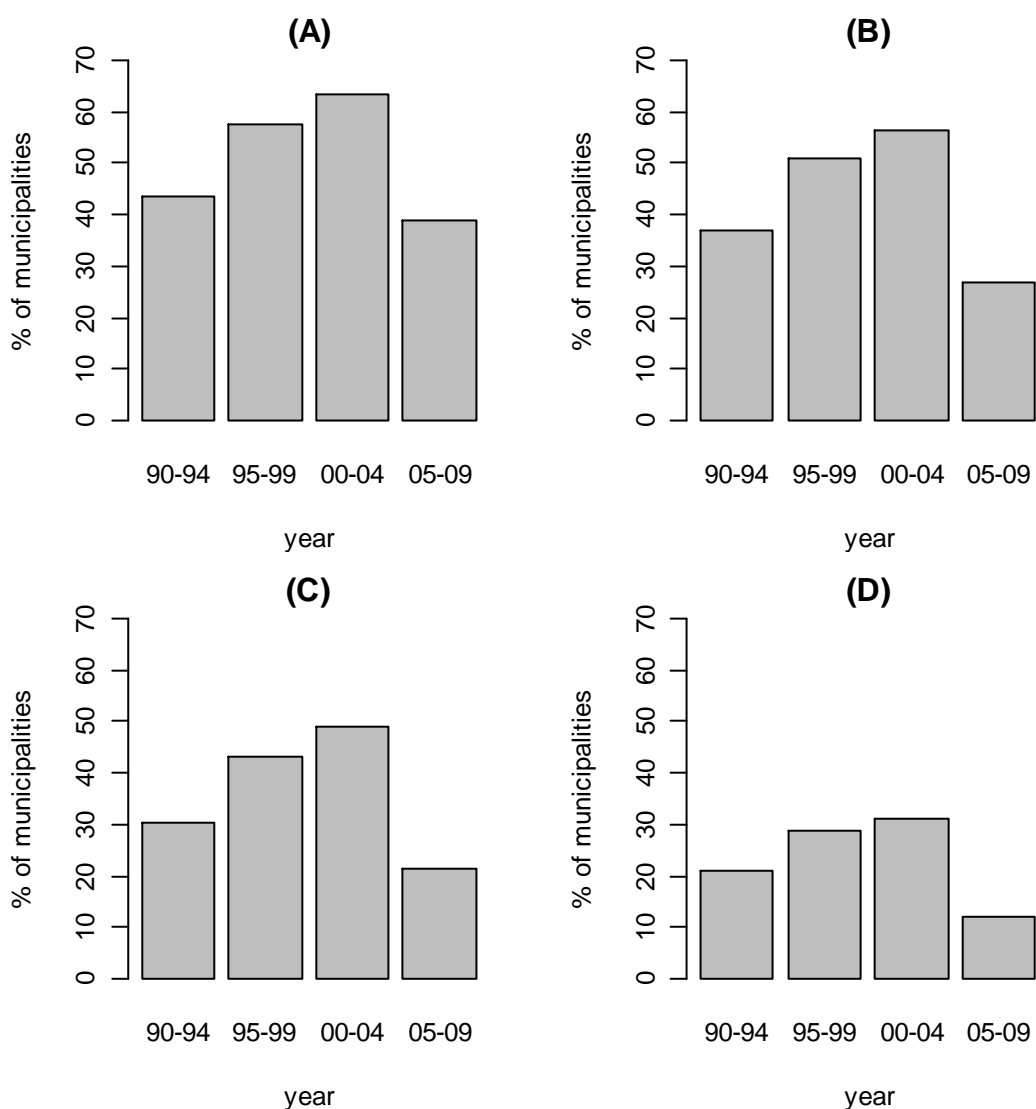
**Tabela 4.** Taxa de incidência de LV do RN, em municípios de diferentes portes, no período de 1990 a 2009.

Incidência Média Anual de LV no período 1990 – 2009	População média no ano 2000
< =1,0	8.623
1,0 - 2,0	10.175
2,0 - 4,75	11.042
4,75 - 22,0	21.440



**Figura 10.** Incidência média anual de LV, no período 1990 – 2009, de acordo com a população média do município no ano 2000.

A avaliação da evolução temporal, por quinquênios, do percentual de municípios do RN, divididos por taxas de incidência de LV (zero, 1, 2 e 5/100.000 hab) no período de 1990 a 2009 demonstrou que nos três primeiros quinquênios há aumento gradativo no percentual de municípios afetados, seguido de redução no último quinquênio. Como mostrado na **Figura 11**. Os dados refletem a diminuição de casos da região leste observada anteriormente podendo está relacionada apenas a sazonalidade natural da doença.



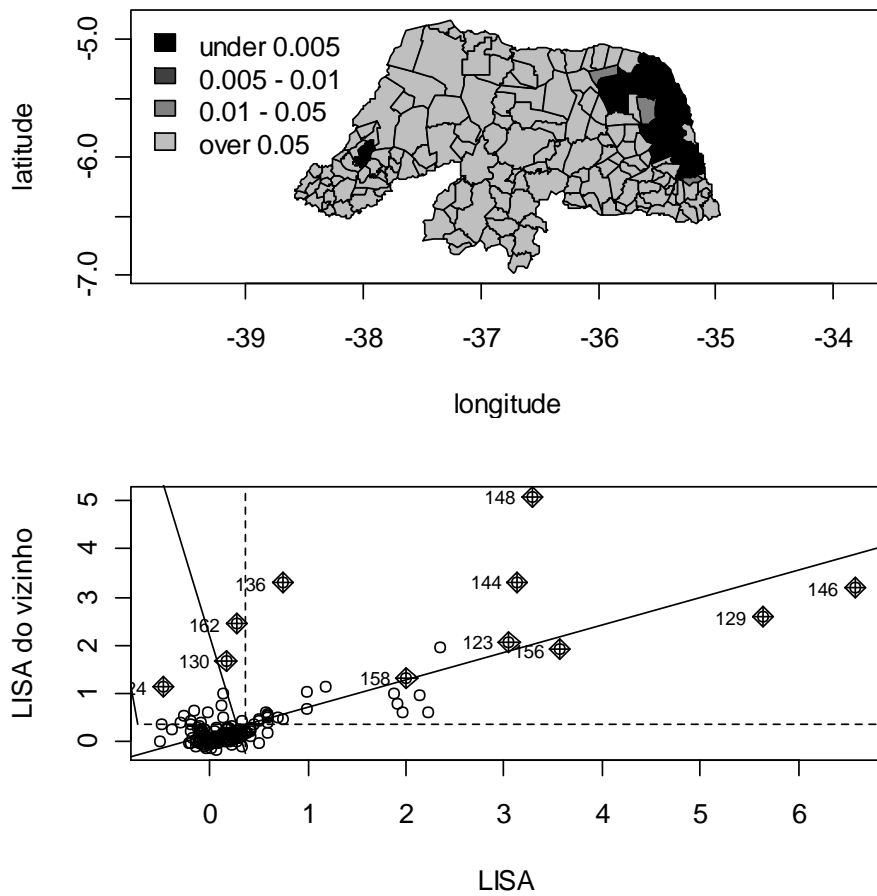
**Figura 11.** Percentual de municípios do RN com incidência de LV por/100.000 hab (A) maior que zero, (B) maior que 1, (C) maior que 2 e (D) maior que 5, segundo o quinquênio.

### 1.2.3. Detecção de conglomerados de Leishmaniose visceral (*clusters*).

Foi analisado o padrão de distribuição da LV no estado do Rio Grande do Norte considerando a influência que um município pode apresentar no seu vizinho mais próximo. Os municípios em preto ou cinza escuro, mostrados na **Figura 12**, são aqueles que apresentam uma associação significativa com os seus vizinhos, ou seja, demonstram similaridades. Estes podem ser de alto (*high-high*) ou baixo (*low-low*) risco, como também podem ser outliers (*high-low* ou *low-high*). Aqueles que estão, além de duas

unidades dos eixos x-y, no primeiro quadrante (high-high), fazem parte de clusters de alto risco.

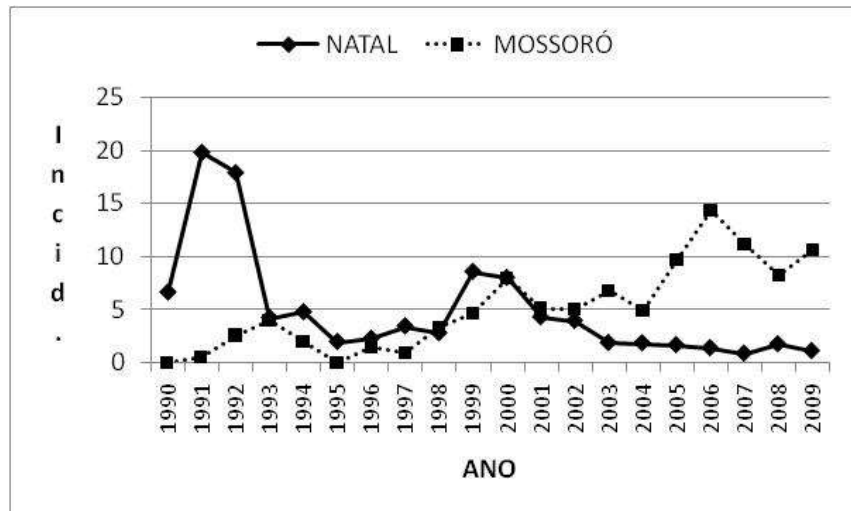
A **Tabela 5** mostra a lista dos municípios com as respectivas incidências de LV. Nesta análise foi excluído o município de Mossoró, em virtude de sua área geográfica ser grande e da inexistência de municípios nos arredores do mesmo notificando casos de LV, no entanto, é claro o aumento significativo dos casos de LV em Mossoró conforme mostrado na **Figura 13**.



**Figura 12.** Agregados (*clusters*) de municípios detectados pelo método de Indicadores de Associação Espacial Local – LISA e scatterplot de Moran indicando municípios com alta associação espacial.

**Tabela 5** – Municípios do RN com associação espacial local significativa ( $p < 0.01$ ), formando dois clusters de LV no estado (áreas pretas no mapa de p-valores).

Município	ORDEM	Pop_2000	Incidência média
Cluster litoral leste			
Pureza	129	6963	22
Extremoz	156	19572	22
Maxaranguape	146	8001	21
Macaíba	141	54883	15
São José de Mipibu	152	34912	12
Nísia Floresta	163	19040	12
Touros	123	27879	11
Ielmo Marinho	138	10249	10
Ceará-Mirim	144	62424	9
João Câmara	112	29248	9
São Gonçalo do Amarante	147	69435	9
Parnamirim	158	124690	9
Rio do Fogo	148	9217	8
Cluster região oeste			
Riacho da Cruz	27	2667	20
Portalegre	22	6746	18
Viçosa	29	1521	9



**Figura 13.** Incidência anual de LV nos municípios de Natal e Mossoró, no período 1990-2009.

## 2. Prevalência da infecção assintomática por Leishmania

Foram estudadas 380 famílias com LV de diversas localidades do estado do Rio Grande do Norte. Os dados coletados incluíram história clínica, dados sobre o parentesco e exame físico. Para detectar infecção por leishmania nesta população foi realizada avaliação da imunidade celular (DTH), em 2050 indivíduos e da imunidade humoral (sorologia) em 2035. Os indivíduos foram grupados em quatro categorias, aqui denominados de fenótipos 1, 2, 3 e 4, caracterizados conforme descrito em métodos e mostrado na **Tabela 6**.



**Tabela 6.** Distribuição dos fenótipos de infecção por *Leishmania* em áreas endêmicas do RN, de acordo com a presença de anticorpo anti-SLA e resposta ao teste de Montenegro (DTH).

	Fenótipo								Total	
	LV		DTH+		AC+		DTH-, AC-			
AC anti-SLA	n	%	n	%	n	%	N	%	N	%
Negativo	126	42,4	680	89,7	0	0	917	100	1723	84,0
Positivo	171	57,6	78	10,3	78	100	0	0	323	16,0
Total	297	14,5	758	37,0	78	3,8	917	44,7	2050	100

M-L-quisquare (qui-quadrado 892.0182, GL=3; p<0.0001)

Montenegro	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
Negativo	127	49,0	0	0	78	100	920	100	1125	55,3
Positivo	132	51,0	778	100	0	0	0	0	910	44,7
Total	259	12,7	778	38,2	78	3,8	920	45,2	2035	100

M-L-qui-quadrado (qui-quadrado 2439,398.0182, GL=3; p<0.0001)

### 2.1. Avaliação da Imunidade Celular – DTH.

Dos 2037 indivíduos com dados sobre a resposta DTH, o tamanho médio da enduração foi de 5,7 mm (SD  $\pm$ 7,9). Os indivíduos com LV, pós-tratamento, (fenótipo 1) apresentam uma média de 7,1 e aqueles com fenótipo 2 (DTH+) apresentam uma média de enduração de 13,3 mm, demonstrando uma assimetria positiva na resposta DTH. (Tabela 7). Estes resultados confirmam a classificação dos nossos grupos fenótipos. Os indivíduos que eram soropositivos (n=7) e que desenvolveram leishmaniose visceral, o

fizeram dentro de um período de 1 ano após a realização da avaliação inicial. Seguintes realizados subsequentemente mostraram que os indivíduos que apresentaram uma resposta DTH positiva não desenvolveram LV. Estes estudos de seguimento foram realizados em média 5 anos após a avaliação inicial (dados não mostrados), indicando, assim, que a resposta DTH positiva é um bom marcador de resistência a desenvolver LV.

**Tabela 7.** Média da enduração (mm) do DTH considerando os fenótipos.

Fenótipo	DTH mm							
	Média	n	SE	Min	Max	Q25	Median	Q75
LV	7,08	242	0,508	0,000	31,00	0,000	5,00	13,00
DTH+	13,34	742	0,272	5,000	45,00	7,000	11,50	18,00
DTH-Elisa+	0,24	76	0,106	0,000	4,00	0,000	0,00	0,00
DTH-Elisa-	0,37	977	0,034	0,000	4,00	0,000	0,00	0,00
Todos os grupos	5,89	2037	0,177	0,000	45,00			

Quando avaliado o DTH em famílias com e sem casos de LV nota-se, como mostrado na **Tabela 8**, que a média da enduração do DTH nas famílias com casos foi de 7,18 mm  $\pm$  0,37 mm, comparado com 4,46 mm  $\pm$  0,31 mm em famílias sem LV ( $p < 0,0001$ ; teste T). A significância dos resultados foi mantida quando se levou em consideração o número de familiares avaliados.

**Tabela 8.** Média da enduração (mm) do DTH, em famílias com e sem LV.

Teste de Montenegro	Famílias		p-valor
	LV	Sem LV	
mm ( $\geq 5$ mm)	7,26 $\pm$ 0,37 mm	4,46 $\pm$ 0,31 mm	$P < 0,0001$
Média (considerando o número de indivíduos por família)	7,65 $\pm$ 0,73 mm	4,84 $\pm$ 0,51 mm	$P < 0,005$

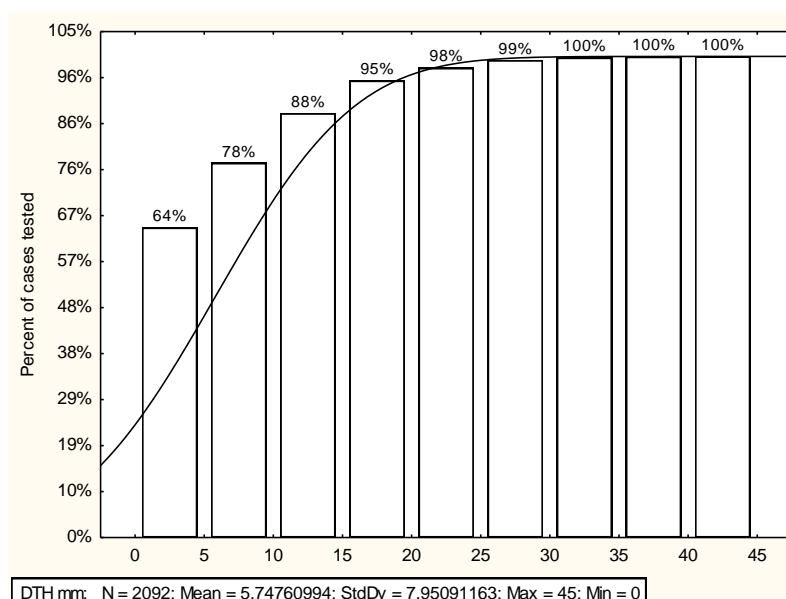
A avaliação do DTH em indivíduos de uma mesma família demonstrou que o teste correlaciona-se com o grau de parentesco, conforme mostrado na **Tabela 9**. Verifica-se que indivíduos com parentesco em primeiro grau tinham um coeficiente de

correlação maior (pais-filhos; irmãos, respectivamente 0,35 e 0,46) do que parentes mais distantes. Em indivíduos com parentesco em segundo grau, como avós-netos o coeficiente de correlação foi de 0,17 e parentes em terceiro grau, como primos tinham um coeficiente de correlação, ainda menor de 0,11. Estes achados são consistentes com um potencial controle genético deste fenótipo.

**Tabela 9.** Coeficiente de correlação observado quando considerado a concordância entre o teste de Montenegro (DTH) e o parentesco.

Fatores considerados	Parentesco					
	Esposos	Pai-Filho	Irmãos	Avós-netos	Tios-sobrinhos	Primos
Pares	140	691	524	257	399	319
Coeficiente de correlação	0,17	0,35	0,46	0,17	0,18	0,11

A distribuição % acumulada da variável DTH na população estudada é apresentada na **Figura 14**. Nela observa-se que 64% dos indivíduos têm DTH menor ou igual a 5 mm. À medida que se aumenta o DTH no eixo x, a proporção de indivíduos tende para 100%, por exemplo, observa-se que 99% dos indivíduos têm DTH menor ou igual a 30 mm. O percentual de indivíduos com DTH entre 10 e 20 mm pode ser estimado por  $95-78=13\%$ .



**Figura 14.** Distribuição percentual acumulada do DTH na população da área endêmica para LV no RN.

A análise estatística utilizando-se o teste ANOVA, do DTH em famílias da área endêmica, divididas em 4 grupos, considerando o percentual de membros da família com história de LV identificou que a média de enduração aumenta com a incidência de LV na família ( $p < 0,0001$ ), conforme apresentado na **Tabela 10**. O teste de comparação múltipla HSD de Tukey realizado para detalhar as diferenças existentes entre a enduração média dos quatro grupos dessas famílias revelou que o resultado quantitativo do teste de Montenegro (mm de enduração), é influenciado pela frequência de casos família LV, ( $p < 0,0001$ ) mostrando que a média em famílias sem LV (4.70) é significativamente menor que em famílias com 10 a 20% de incidência (6.99) ou em famílias com mais de 20% (7.15) de casos de LV. Por outro lado, a média em famílias com (0 a 10%) de casos de LV, (4.91) é significativamente menor que em famílias com mais de 10% (6.99 ou 7.15), (**Tabela 11, Figura 15**).

**Tabela 10.** Análise do DTH em famílias residentes em áreas do RN, endêmicas para LV, considerando o percentual de membros da família com história de LV.

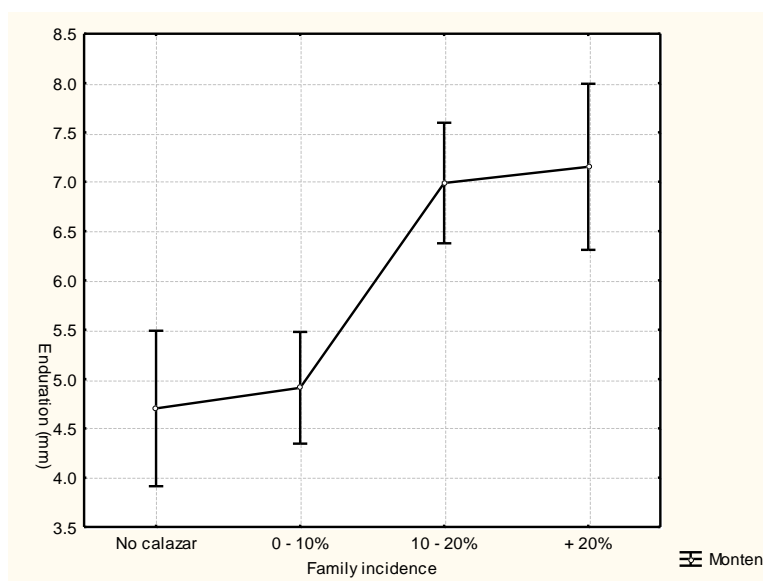
% dos membros da família com história de LV	Média do DTH (mm de endureção)	Desvio Padrão	N	%
0	4,7	7,7	372	18.0
0-10%	4,9	6,9	583	28.2
10-20 %	6,9	8,4	744	35.9
+ 20	7,1	8,2	371	17.9
Total	6,0	7,9	2070	100.0

p<0,0001

**Tabela 11.** Análise comparativa (\*) do DTH em famílias residentes em áreas endêmicas para LV do RN, considerando o percentual dos parentes com história de LV.

Percentual dos membros da família com história de LV	Grupos			
	1	2	3	4
Grupo 1 = 0 caso de LV		0,983910	<b>0,000490</b>	<b>0,000148</b>
Grupo 2 = 0-10% de LV	0,983910		<b>0,000050</b>	<b>0,000674</b>
Grupo 3 = 10-20 %	<b>0,000490</b>	<b>0,000050</b>		0,992079
Grupo 4 = + 20	<b>0,00148</b>	<b>0,000674</b>	0,992079	

(\*) Os valores do Teste T de comparação múltipla HSD de Tukey. Determina dois grupos distintos: {1, 2} e {3,4}.



**Figura 15.** Enduração média e intervalo de confiança segundo a taxa de incidência de LV na família.

## 2.2. Avaliação da imunidade humoral - Pesquisa de anticorpo anti-Leishmania

A análise da infecção por leishmania, detectada por sorologia, em 2264 indivíduos pertencentes às famílias residentes em área endêmica demonstrou que existe significativa associação entre o percentual de anticorpo positivo e a taxa de incidência de LV na família (**Tabela 12**).

**Tabela 12.** Prevalência de anticorpo segundo a incidência de LV na família.

Anticorpo SLA	Frequência de casos de LV em famílias									
	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Total	
	N	(%)	N	%	n	%	n	%	n	%
Negativo	332	(89,0)	562	(88,8)	696	85,3	324	73,3	1914	85,5
Positivo	41	(11,0)	71	11,2	120	14,7	118	26,7	350	15,5
Total	373	(16,5)	633	28,0	816	36,0	442	19,5	2264	100

M-L-qui-quadrado (qui-quadrado 52.6, df=3, p<0.0001)

Quando analisada a taxa de infecção considerando a positividade ao DTH e ao anticorpo anti-leishmania, verifica-se também que a positividade cresce com a incidência familiar (**Tabela 13**).

**Tabela 13.** Taxa de infecção por Leishmania, considerando DTH e Anticorpo, segundo a incidência de casos de LV na família.

Infecção por Leishmania*	Frequência de casos de LV em famílias									
	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Total	
	n	(%)	n	%	n	%	N	%	N	
Negativo	215	59,2	303	51,8	297	39,3	108	26,0	923	43,5
Positivo	148	40,8	282	48,2	459	60,7	308	74,0	1197	54,5
Total	363	17,1	585	27,6	756	35,7	416	19,6	2120	100

M-L Chi square (Chi square 112,9, df=3, p<0.0001)

Analisando-se a infecção por Leishmania, por sorologia, em relação ao sexo observa-se, conforme mostrado na **Tabela 14**, que existe associação entre presença de anticorpo e sexo, sendo maior no sexo masculino, possivelmente, devido ao maior número de casos de LV no sexo masculino. Por sua vez, não existe diferença com relação ao número de positividade ao teste de Montenegro quando o sexo é considerado.

A avaliação de infecção por leishmania, considerando-se a faixa etária, como mostrado na **Tabela 15**, demonstra que existe associação decrescente entre anticorpo e idade, observando-se maior número de indivíduos com presença de anticorpos abaixo de 10 anos, provavelmente, devido o número de casos de LV nesta faixa etária ser maior. Ao contrário, os dados indicam uma associação crescente entre DTH e idade, denotando um efeito cumulativo das re-exposições ao patógeno na resposta imune celular.

**Tabela 14.** Taxa de infecção por Leishmania, considerando DTH e Anticorpo, segundo o sexo dos indivíduos.

	Masculino		Feminino		Total	
Anticorpo anti-SLA	N	%	N	%	N	%
Negativo	851	82,8	1063	86,0	1914	85,5
Positivo	177	17,2	173	14,0	350	15,5
Total	1028	45,4	1236	54,6	2264	100
M-L-chi square (chi-square 4,439166, df=1; p=0,03513)						
Montenegro	N	%	N	%	N	%
Negativo	514	54,6	646	57,2	1160	56,0
Positivo	427	45,4	483	42,8	910	44,0
Total	941	45,5	1129	54,5	2070	100
M-L-chi square (chi-square 1,403661, df=1; p=0,23611)						

Estudos de associação entre a resposta ao anticorpo e ao DTH, não revelaram associação no que se refere ao sexo. Por sua vez, conforme mostrado na **Tabela 16**, os mesmos estudos quando realizados em relação a idade demonstram que acima dos 40 anos, a taxa de indivíduos anticorpo positivo e o dobro naqueles DTH negativos.. Este dado pode significar um risco potencial desses indivíduos desenvolverem doença.



**Tabela 15.** Taxa de infecção por leishmania considerando-se Ac e DTH segundo a faixa etária.

Infecção por Leishmania	Faixa etária (anos)								Total
	0-9		10-19		20-39		+ 40		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
AC anti-SLA									
Negativo	527	78,2	444	87,6	590	86,8	349	87,7	1910
Positivo	147	21,8	63	12,4	90	13,2	49	12,3	349
Total	674	29,8	507	22,4	680	30,1	398	17,6	2249
Montenegro									
Negativo	466	73,7	261	55,2	282	47,3	150	40,9	1159
Positivo	166	26,3	212	44,8	314	56,7	217	59,1	909
Total	632	30,6	473	22,9	596	28,8	367	17,6	2068

**Tabela 16.** Comparação entre positividade ao anticorpo e ao DTH em indivíduos acima de 40 anos residentes na área endêmica para LV no RN.

Anticorpo anti-Leishmania	DTH Negativo		DTH Positivo		Total	
	N	%	N	%	N	%
AC Negativo	123	83,11	195	91,12	318	87,85
AC positivo	25	16,89	19	8,88	44	12,15
Total	148	40,88	214	59,12	362	100

M-L-Chi square (Chi-square 5,1641 df=1; p=0,00001)

### 3. A emergência de co-infecção HIV/AIDS e LV no Rio Grande do Norte

#### 3.1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais da co-infecção HIV/leishmania no Rio Grande do Norte.

Dezessete casos de co-infecção HIV/leishmania foram notificados no Rio Grande do Norte entre 1990 e 2008. Todos os 17 pacientes apresentavam os critérios de AIDS do Ministério da Saúde, conforme descrito em metodologia. O primeiro caso ocorreu em 1990 e os demais entre 1995 e 2008. Infecção por HIV foi atribuída à transmissão sexual em todos os casos, mas, uso de drogas ilícitas via intravenosa não pode ser descartado. Dados demográficos, achados clínicos e laboratoriais, bem como, dados da evolução clínica estão apresentados nas **Tabelas 17 e 18** e descritos abaixo.

A média de idade dos pacientes com co-infecção HIV/leishmania foi de 37.3 ( $\pm 6.6$ ) anos; 15 de 17 eram homens (**Tabela 17**). Febre, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia e leucopenia foram os achados clínicos e do hemograma, à admissão, na maioria dos pacientes (**Tabela 18**). O diagnóstico de HIV/AIDS e de LV foi feito simultaneamente em 7 casos; o diagnóstico de HIV precedeu o de LV em 7 casos; e o diagnóstico de LV precedeu o de HIV em 3 casos (Tabela 18). Em pessoas que foram diagnosticadas inicialmente com LV, o diagnóstico de infecção por HIV ocorreu em  $1.6 \pm 0.5$  (S.D.) anos. Aqueles com diagnóstico inicial de HIV/AIDS desenvolveram LV em  $3.4 \text{ anos} \pm 1.7$  (S.D.).

Para demonstrar o risco potencial de sobreposição de LV e HIV/AIDS no estado foram avaliadas a incidência anual, por 100.000 habitantes, de LV e AIDS, no período de 2000 a 2007, bem como, a prevalência, no mesmo período, de HIV, em doadores testados em dois principais bancos de sangue do estado, totalizando 37,000 doadores. A **Figura 15** demonstra que a prevalência de HIV em doadores de sangue e a incidência de AIDS foram relativamente estáveis naquele período. A mesma figura revela que a incidência global de LV diminuiu após o ano 2000. A distribuição quanto ao sexo e idade, de todos os casos de LV no Rio Grande do Norte, foi mostrada anteriormente (**Figuras 2 a 5**). Aproximadamente 60% dos casos ocorreram em crianças abaixo de 10 anos. Nesta faixa etária, homens e mulheres foram igualmente afetados. Nas demais faixas etárias a proporção homem/mulher foi de 5 para 1.

**Tabela 17:** Dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de evolução clínica de pacientes com co-infecção HIV/leishmania.

Paciente	Idade	Sexo	Aspirado de medula óssea	Ac Anti-SLA	Ac Anti-K39	HAART	Células CD4	Carga viral	LV prévia	óbito	Recorrência
1	43	M	+	+	+	+	61	480	+	-	+
2	29	M	+	-	-	-	14	4,300,000	-	-	-
3	41	M	-	+	+	+	179	30,0000	-	-	-
4	53	M	+	+	+	+	14	300,0000	+	-	-
5	32	M	+	+	+	-	NA <sup>3</sup>	Nd	+	+	-
6	42	M	+	-	+	-	31	151,236	-	+	-
7	46	M	NA	+	+	+	60	<Min Limit <sup>1</sup>	+	-	+
8	32	F	+	-	+	-	38	>Max Limit <sup>2</sup>	-	-	-
9	33	M	+	+	+	-	140	NA	-	-	-
10	32	M	-	+	+	-	249	69	+	-	+
11	32	M	+	+	+	+	96	>Max Limit <sup>2</sup>	+	+	+
12	35	M	+	-	-	+	31	Nd	+	-	-
13	33	M	Sugestivo	+	+	-	297	52,000	-	-	+
14	32	M	+	+	+	-	NA <sup>3</sup>	NA	-	+	-
15	35	M	+	-	-	-	58	99,000	-	-	-
16	43	M	+	+	+	+	2	NA	-	-	-
17	41	F	+	-	+	-	25	NA	-	-	+

NA = Dados não disponíveis.

HAART: Terapia Antiretroviral altamente Ativa na admissão;

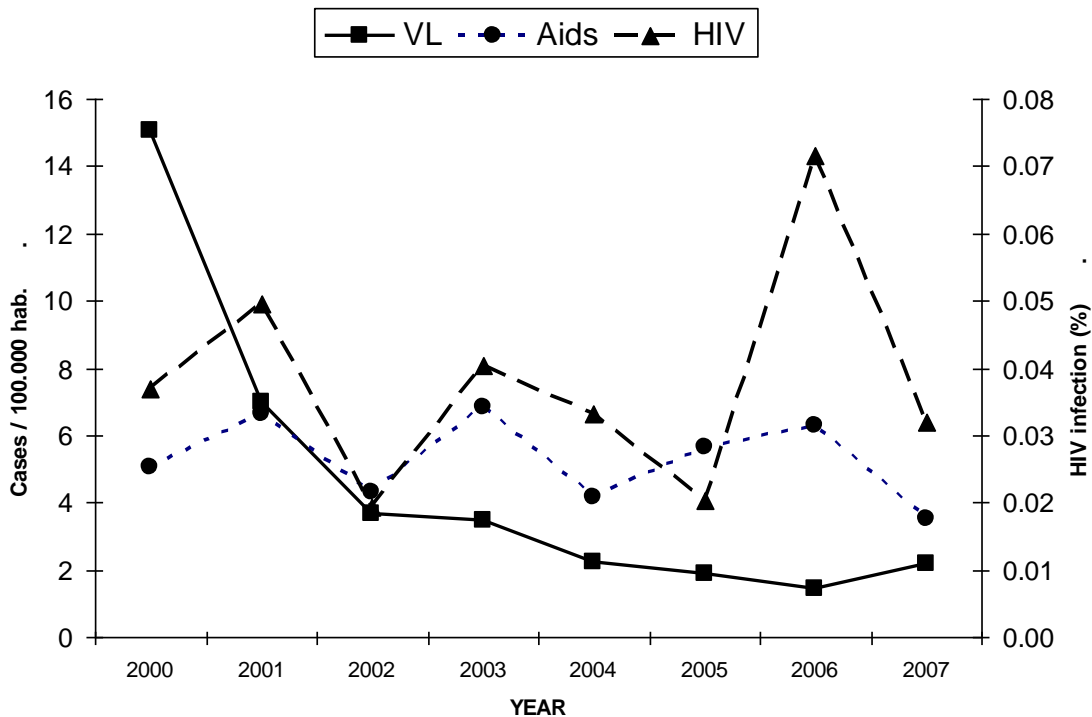
Ac Anti-SLA: anticorpo anti-antígeno solúvel de Leishmania; Ac Anti-rK39 anticorpo Anti- antígeno recombinante rk39: .

<sup>1</sup>Menos que 50 cópias; <sup>2</sup>Mais que 5,000,000 copias. <sup>3</sup> Morte ocorreu em poucos dias.

**Tabela 18:** Apresentação clínica de pacientes com co-infecção HIV/leishmania à admissão.

Paciente	Febre	Perda de peso	Icterícia	Diagnóstico de LV/HIV	Sangramento	Diarréia	Fígado (cm)	Baço (cm)	Hb (g/dL)	Leuco ( $\times 10^3$ )	Plaquetas ( $\times 10^3$ )	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)
1	+	+	-	concomitante	-	+	6	15	7.9	1.6	177	2,71	7.21
2	+	+	-	concomitante	-	-	0	0	11.5	3.1	130	2.67	4.83
3	+	-	-	concomitante	-	-	7	5.5	11.9	2.5	132	NA	NA
4	-	+	-	LV após HIV	-	+	8	0	7.3	1.2	122	2.1	6.9
5	+	+	-	LV antes HIV	+	+	10	15	7.1	2.2	55	2	5.4
6	-	+	+	concomitante	-	+	6	6	10,8	6.2	277	NA	NA
7	+	+	-	LV após HIV	-	+	9	6	7,9	1.6	97	NA	NA
8	+	+	-	LV após HIV	+	-	7	- *	6.4	3.8	374	2,5	3.3
9	+	+	-	concomitant	-	+	3	4	8.7	3.5	137	3	6.8
10	-	+	-	LV antes HIV	+	+	6	8	8.4	1.4	213	1.5	6.4
11	+	+	-	LV antes HIV	-	-	12	12	10.1	1.0	88	4.3	2.5
12	+	+	-	LV após HIV	-	-	4	5	8.3	1.5	220	4	1.5
13	+	+	-	concomitante	+	-	5	7	10.2	2.7	91	3.4	4.6
14	+	+	+	LV após HIV	-	-	10	5	8.3	1.7	139	1.7	5.6
15	+	+	-	LV após HIV	-	-	0	0	11.8	7.8	245	NA	NA
16	+	+	-	LV após HIV	-	-	3	5	7.5	1.4	118	NA	NA
17	+	-	-	concomitante	+	-	0	2	9	3.7	199	3.6	4.9

NA = dados não disponíveis



**Figura 16.** Incidência de LV (quadrados) e de AIDS (pontos), por 100.000 habitantes, no RN, no período de 2000 a 2007. Os triângulos mostram o percentual de doadores de sangue HIV positivos testados no mesmo período.

### 3.1.2. Análise comparativa entre casos de LV em pacientes HIV positivos e negativos

Dois grupos, cada um deles com 17 pacientes com diagnóstico de LV, sendo um grupo de pacientes HIV positivos e o outro de pacientes HIV negativos, pareados por sexo e idade foram comparados quanto aos aspectos demográficos, clínicos e laboratoriais. Os achados clínicos à admissão foram semelhantes entre os dois grupos (**Tabela 19**), mas, os achados laboratoriais em pacientes com co-infecção HIV-leishmania diferiram em vários aspectos, daqueles observados para pacientes adultos de mesma idade com LV apenas (Tabela 20). Pacientes com co-infecção HIV/leishmania tiveram uma média de contagem de células CD4 de 86 células/mm<sup>3</sup> (variando de 2 a 297 células/mm<sup>3</sup>) comparado com a

**Tabela 19:** Alterações clínicas e laboratoriais à admissão, de pacientes HIV positivos e de pacientes HIV negativos, com LV, pareados por sexo e faixa etária.

Sintomas de LV e alterações laborat.	Presença ou ausência	HIV + (n=17, %)	HIV – (n=17)	Valor p
Febre	Presente	14 (82,4)	16 (94,1)	0,301
	Ausente	3 (17,6)	1 (5,9)	
	NA	0 (0)	0 (0)	
Perda de peso	Presente	15 (88,2)	14 (82,3)	0,742
	Ausente	1 (5,9)	1 (5,9)	
	NA	1 (5,9)	2 (11,8)	
Palidez	Presente	15 (88,2)	17 (100)	0,242
	Ausente	2 (11,8)	0 (0)	
	NA	0 (0)	0 (0)	
Aumento de abdomen	Presente	10 (58,8)	8 (47,06)	0,347
	Ausente	4 (35,3)	6 (35,29)	
	NA	1 (5,9)	3 (17,65)	
Dor abdominal	Presente	7 (43,8)	12 (70,58)	0,074
	Ausente	9 (56,3)	4 (23,53)	
	NA	1 (5,9)	1 (5,9)	
Icterícia	Presente	2 (11,8)	3 (17,65)	0,470
	Ausente	15 (88,2)	13 (76,47)	
	NA	0 (0)	1 (5,9)	
Sangramento	Presente	5 (29,4)	3 (17,6)	0,344
	Ausente	12 (70,6)	14 (82,4)	
	NA	0 (0)	0	
Diarreia	Presente	7 (41,2)	5 (29,41)	0,360
	Ausente	10 (58,8)	12 (70,59)	
	NA	0 (0)	0 (0)	
Hepatomegalia	Presente	14 (82,4)	17 (94,4)	0,114
	Ausente	3 (17,6)	0 (0)	
	NA	0 (0)	0 (0)	
Esplenomegalia	Presente	13 (76,5)	15 (88,2)	0,125
	Ausente	3 (17,6)	0 (0)	
	NA	1 (5,9)	2 (11,8)	
Anemia	Presente	16 (94,1)	17 (100)	-
	Ausente	0 (0)	0 (0)	
	NA	1 (5,9)	0 (0)	
Leucopenia	Presente	15 (88,2)	15 (88,2)	0,274
	Ausente	2 (11,8)	0 (0)	
	NA	0 (0)	2 (11,8)	
Plaquetopenia	Presente	10 (58,8)	10 (58,82)	0,556
	Ausente	7 (41,2)	6 (35,29)	
	NA	0 (0)	1 (5,9)	
Pancitopenia	Presente	9 (52,9)	10 (58,82)	0,500
	Ausente	7 (41,2)	6 (35,29)	
	NA	1 (5,9)	1 (5,9)	

média de 1.257 células/mm<sup>3</sup> naqueles com LV apenas (dados não mostrados). Pacientes co-infectados tinham títulos de anticorpos anti-leishmania mais baixos do que aqueles com LV somente, conforme mensurado por ELISA usando extrato solúvel de leishmania (SLA) ( $p < 0.01$ ) e antígeno recombinante rK39 ( $p = 0.03$ ). Seis pacientes co-infectados não tinham títulos detectáveis de anticorpos. Nestes casos o diagnóstico de LV foi confirmado por positividade no exame direto, em aspirado de medula óssea.

Pacientes co-infectados receberam profilaxia com anfotericina B mensalmente, mas, recaídas ocorreram a despeito da mesma. O percentual de recaídas foi mais alto no grupo de co-infectados, seis de 17 pacientes recaíram após terapêutica bem sucedida para LV (Tabela 20). A média de anos de ocorrência de recaídas de LV foi de  $1.42 \pm 1.16$  anos (variando de 4 meses a 5 anos) após último tratamento para LV. Todos os pacientes com HIV/AIDS receberam HAART, mas a adesão ao tratamento variou. A mortalidade entre os co-infectados foi de 23.4% (4 de 17). Os sinais clínicos associados com morte foram icterícia em 50% versus 0% naqueles que sobreviveram ( $p = 0.044$ ) e aumento do tamanho do fígado foi de  $9.5 \pm 2.5$  cm abaixo do gradil costal direito naqueles que morreram versus  $4.5 \pm 4.8$  cm nos que sobreviveram ( $p = 0.01$ ) (**Tabela 20**).

**Tabela 20:** Características demográficas e laboratoriais, de pacientes HIV positivos e negativos, com LV, pareados por sexo e faixa etária.

	HIV + (n = 17) (%)	HIV – (n = 17) (%)	p value (M-L-chi square)
Idade (mean and SD)	37.3 (±6.6)	38.2 (±16.5)	0.840
Sexo			
Masculino	15 (88.2)	16 (94.1)	0.5419
Feminino	2 (11.8)	1 (5.9)	
Passado de LV			
Sim	7 (41.9)	2 (11.8)	0.0469
Não	10 (58.8)	15 (88.2)	
Aspirado de medula óssea			
Positivo	15 (88.2)	13 (76.5)	0.0364
Negativo	2 (11.8)	4 (23.5)	
AC Anti-SLA			
Positivo	11 (64.7)	17 (100)	0.0019
Negativo	6 (35.3)	0 (0)	
AC Anti-rk39			
Positivo	14 (82.4.9)	17 (100)	0.0349
Negativo	3 (17.6)	0 (0)	
Óbito			
Sim	4 (23.5)	0 (0)	0.01367
Não	13 (76.5)	17 (100)	
Recaída			
Sim	9 (52.9)	2 (11.8)	0.0082
Não	8 (47.1)	15 (88.2)	



### **3.2. Distribuição espacial da co-infecção HIV/leishmania no Rio Grande do Norte**

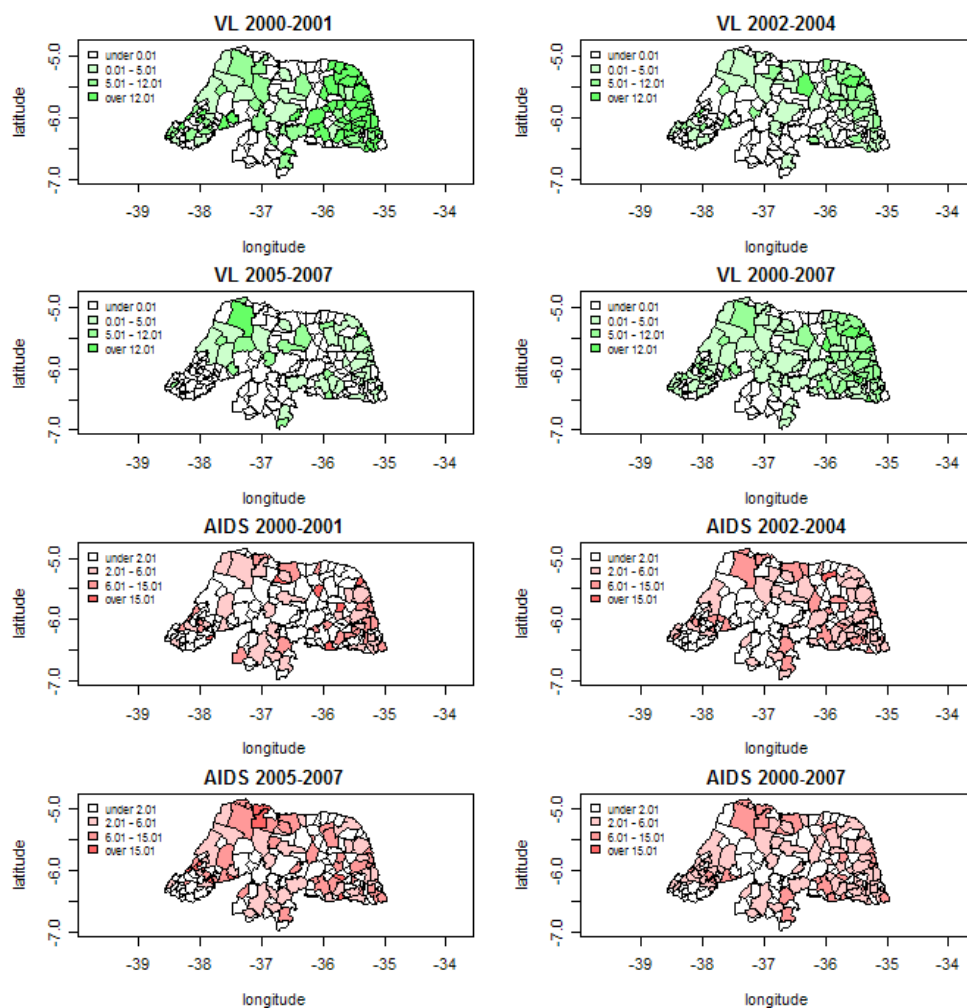
As taxas de incidência de LV e HIV/ AIDS no Rio Grande do Norte entre 2000 e 2007 são mostrados na **Figura 16**. As áreas geográficas reportando sobreposição de HIV/AIDS e VL são mostradas na mesma figura. Ambas as doenças ocorreram, mais freqüentemente, em municípios maiores. A incidência de LV foi >12 casos por 100.000 habitantes no litoral leste e na região oeste do estado. No mesmo período, a prevalência de AIDS foi de 15 casos por 100.000 habitantes nas mesmas regiões.

Os mapas apresentados na **Figura 16** revelam que as distribuições espaciais de LV e de AIDS, no período de 2000 a 2007, apresentam certa similaridade no estado (ver mapa abaixo). Entretanto, um modelo de regressão espacial simples entre as duas doenças, entre 2000 e 2007, não revelou associação entre elas ( $p=0.3168$ ), provavelmente, devido o pequeno número de indivíduos com co-infecção. Um modelo de regressão múltipla também não mostrou associação significativa entre a incidência de LV no período 2000-2007 e a incidência de AIDS nos três triênios, **Tabela 21**. Contudo, ambos os modelos confirmam associação espacial de LV no estado (coeficiente de  $W_{ILV\_00\_07}$  com  $p < 0,0001$ ), conforme apresentado anteriormente para o período de 1990 a 2009 (**Tabela 5 e Figura 12**).

**Tabela 21.** Estimativas dos parâmetros dos modelos de regressão espacial simples e múltipla

Modelo	VARIÁVEL	COEFICIENTE	p-valor
Simples	W_ILV_00_07 <sup>(*)</sup>	0,503	<b>0,0001</b>
	INTERSEPTO	1,423	<b>0,0050</b>
	IAI_00_07	0,083	0,3168
Múltipla	W_ILV_00_07 <sup>(*)</sup>	0,503	<b>0,0001</b>
	INTERSEPTO	1,427	<b>0,0049</b>
	IAI_00_01	0,067	0,2062
	IAI_02_04	0,017	0,8146
	IAI_05_07	0,009	0,8738

(\*) Mede a associação espacial da incidência de LV



**Figura 17.** Distribuição geográfica do total de casos de LV (A, mapas de cor verde) e AIDS (B, mapas de cor vermelha) notificados a Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Norte no período de 2000 a 2009.

Os mapas mostram isoladamente a distribuição dos casos de LV e de HIV/AIDS por municípios. As cores mais escuras indicam maior incidência de casos. Municípios maiores aonde periurbanização de LV vêm ocorrendo nos últimos 20 anos, também tiveram aumento de casos de HIV/AIDS. Os dados apontam para um risco aumentado da nova entidade clinica devido à co-infecção de HIV/leishmania no Rio Grande do Norte.

## V - DISCUSSÃO

O padrão epidemiológico da LV está em transformação no Brasil como em outras regiões do mundo (125). Até os anos 80, LV era uma doença de ocorrência rural, do Nordeste brasileiro acometendo, sobretudo, crianças. A doença hoje é encontrada principalmente nas áreas periurbanas das capitais nordestinas, com extensão gradativa para as regiões norte, sudeste e centro-oeste, já se reconhecendo notificação autóctone de LV em 20 estados brasileiros (126; 127).

No Rio Grande do Norte como demonstrado neste estudo, modificações do padrão epidemiológico iniciaram-se no final da década de 80, quando surto epidêmico ocorreu na área perimetropolitana de Natal (128). A partir de então, LV vem mantendo um padrão endemo-epidêmico, em áreas periurbanas, evoluindo de modo cíclico, com picos epidêmicos a cada oito anos. Padrão semelhante vem ocorrendo em áreas periurbanas de outras grandes cidades como Teresina (PI), São Luis (MA), Fortaleza (CE), Belo Horizonte (MG), entre outras (129-132). Padrão diferente, tipo epidêmico, também foi descrito em área central urbana de Campo-Grande.

O novo padrão epidemiológico da LV no RN se caracteriza por tendência de instalação da doença nos municípios maiores do estado, com maior incidência na população adulta, caracterizando assim franco processo de periurbanização. A identificação de dois conglomerados da doença no RN (nas regiões leste e oeste), aponta para maior definição desse novo padrão da LV no estado. Visto que, o processo de periurbanização iniciou-se pela capital (Natal), subseqüentemente, espalhando-se por toda a área primetropolitana, situada na região leste e, nos últimos anos maior número de casos passou a ocorrer em Mossoró, situada na região oeste e segunda maior cidade do estado. Repercussões no perfil clínico e no controle da doença já são observadas no RN e outras mudanças epidemiológicas e clínicas são esperadas considerando a expansão da doença no estado, a exemplo do que vem acontecendo mundialmente, nas áreas de ocorrência da doença. Expansão da LV pode ser observada, também, para países de clima mais temperado, como a Argentina e Paraguai (135-137).

No RN, em Natal, fatores como êxodo rural e crescimento desordenado da área periurbana da cidade, são fatores importantes na periurbanização da LV. Em Mossoró, os fatores envolvidos ainda estão sendo avaliados. Por outro lado, sazonalidade vetorial

demonstrada em diversas localidades (133; 134) pode explicar em parte a sazonalidade de casos humanos no estado. Ao mesmo tempo, a facilidade de domiciliação de *Lutzomya longipalpis*, pela sua alta plasticidade alimentar, justifica as epidemias centrais urbanas já descritas e apontam para a possibilidade de sua ocorrência em nosso estado.

A elevada taxa de infecção por *Leishmania*, em humanos, em áreas endêmicas para LV, como a aqui demonstrada para o Rio Grande do Norte, mostra que a LV é apenas o componente menor, sendo a infecção assintomática mais freqüente. A magnitude da infecção assintomática por *Leishmania* possivelmente está influenciando a mudança do perfil da LV, no Brasil e em nosso estado. Reconhece-se que fatores relacionados ao parasito e à imunidade do hospedeiro, bem como, fatores ambientais influenciam sobremaneira o espectro clínico da LV (119). Assim, pode-se antever a ocorrência de um maior número de casos de LV associados à imunossupressão, com maior gravidade e de manejo terapêutico mais complexo, conforme observado na Europa (92; 138) e no RN, descrito aqui com HIV/AIDS. È possível que LV se torne cada vez mais, uma complicação adicional em portadores de neoplasias, transplantados de órgãos, submetidos à imunossupressão por drogas, entre outras situações clínicas.

Fatores genéticos do hospedeiro vertebrado parecem também contribuir na resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (139). O seqüenciamento dos diversos genomas, inclusive o humano, permitiu o estudo de polimorfismos genéticos que podem influenciar o grau de susceptibilidade ou resistência a desenvolver doenças. Assim, variabilidade em genes codificadores de produtos da resposta imune pode influenciar o desenvolvimento de doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose e doenças auto-imunes (140-146). Agregação familiar de infecção por *Leishmania* foi observada, neste estudo, no Rio Grande do Norte, que não explicado unicamente por fatores ambientais. Os estudos conduzidos subseqüentemente demonstraram que a agregação familiar parece ser, em parte, devido a um componente genético do hospedeiro. Foram observados, por estudos de varredura completa do genoma, realizado com amostras de DNA isoladas dos mesmos indivíduos, a presença de uma área de *linkage* no cromossomo 9 associado com LV e duas áreas de *linkage* presentes nos cromossomos 15 e 19 associados à resposta DTH (147). Estes resultados indicam que a expressão da infecção por *Leishmania chagasi* pode, em parte, depender do repertório genético do indivíduo.

No que se refere à cadeia epidemiológica, a LV canina geralmente precede a doença humana, sendo o cão considerado o principal reservatório de *Leishmania chagasi* nas áreas periurbanas do Brasil. Entretanto, o papel do homem como reservatório nesta cadeia não está claro. Estudos conduzidos no Espírito Santo mostraram que a remoção de cães, aparentemente, não tem impacto na infecção em humanos (148). No entanto, estudo realizado numa área do Rio Grande do Norte, endêmica para LV, mostrou uma associação entre a infecção por leishmania em caninos e humanos (Duarte, manuscrito submetido). Estes estudos mostraram que 24,6% das pessoas residentes na área endêmica para LV apresentavam anticorpo anti-leishmania e 38,6% apresentavam uma resposta de hipersensibilidade cutânea retardada a antígenos de *Leishmania* (DTH) positiva. Ao mesmo tempo, a presença de anticorpo anti-leishmania em cães foi de 32,6%, com uma taxa de soroconversão em 6 meses de 30%. DNA de leishmania foi detectado em amostras de sangue periférico de cães e de humanos dessas áreas, com também da pele de indivíduos com LV, indicando, a possibilidade de tanto humanos quanto caninos contribuírem para infecção de flebotomíneos (Nascimento et al, dados não publicados). Portanto, o papel da infecção assintomática por leishmania, no homem, não pode ser totalmente desconsiderado na cadeia epidemiológica da LV.

Por outro lado, o monitoramento da densidade de flebotomíneos, aliado a determinação da taxa de infecção por *Leishmania* em caninos, numa determinada localidade de risco de LV, talvez seja uma forma de avaliar o risco de transmissão de *Leishmania*. Estudo do comportamento de *Lutzomyia longipalpis* no Rio Grande do Norte demonstrou que *L. longipalpis* apresenta maior atividade entre o período das 19 às 23 horas(149), horário em que normalmente a maioria dos residentes encontra-se no domicílio ou nos arredores dos mesmos, reforçando a hipótese de que, provavelmente, a infecção está ocorrendo no interior das residências ou no peridomicílio. Estudos sobre a preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis*, capturados em áreas endêmicas para LV do RN demonstraram que alto percentual de fêmeas alimentam-se de sangue humano. De importância foi o achado de que um percentual elevado dessas fêmeas estava infectado por *Leishmania*. Os dados sugerem, fortemente, a possibilidade de que o ciclo antroponótico, no qual o homem é o reservatório, também está ocorrendo nas áreas periurbanas do estado (Da Silva VP, manuscrito submetido).

No Brasil, por várias décadas, as medidas de controle da LV tiveram como ação principal, a eliminação dos cães infectados por leishmania em áreas endêmicas. Entretanto, estudos mostraram que a remoção desses de uma área segue-se à rápida substituição por animais jovens. No passado, as medidas de controle da LV estiveram associadas ao controle vetorial de outras doenças, como a malária, quando o uso de DDT residual resultou em queda significativa dos casos de LV (150-152). Atualmente, essas medidas são focais e, geralmente, defasadas da ocorrência dos casos de LV.

O controle de flebotômíneos com borrifamento e/ou uso de coleiras impregnadas com deltametrina em cães (153; 154) poderiam ser medidas rotineiras nas áreas de maior risco de infecção por leishmania, mas o elevado custo impede sua aplicação em todas as áreas endêmicas. A definição dos agregados espaciais de LV no RN, resultando em determinação das áreas de risco de infecção, como também demonstrado em Teresina (PI) poderia ser uma forma de auxiliar a implantação destas estratégias de controle (155; 156). No entanto, não é possível prever o uso desta ferramenta na área endêmica do RN, em virtude das deficiências de infra-estrutura dos municípios.

É evidente que a dificuldade no controle da leishmaniose está na complexidade da sua cadeia epidemiológica, principalmente no que concerne ao controle vetorial e dos reservatórios. As medidas de intervenção no Brasil, geralmente, são realizadas após a identificação dos casos humanos, quando a situação epidemiológica pode ser distinta de quando ocorreu à infecção primária, considerando que o período de incubação entre infecção e doença em humanos pode ser longo (60; 118; 157). Desta forma, a periurbanização da LV no Rio Grande do Norte sinaliza que esta doença poderá ser um problema de saúde pública muito maior que o atual.

Do ponto de vista clínico, no Rio Grande do Norte, a LV também apresenta evidentes transformações. Observa-se no hospital Giselda Trigueiro, referência para doenças infecciosas do estado, que pacientes com doença insidiosa, de mais de oito meses de evolução, provenientes do sertão do estado são hoje menos frequentes em relação aos casos subagudos, iniciados há apenas 2 ou 3 meses, residentes na área perimetropolitana de Natal. Adicionalmente, associação com outras doenças como tuberculose, hanseníase, hepatite C e HIV/AIDS vêm ocorrendo (manuscritos em preparação).

A incidência de infecção por HIV é, classicamente, descrita em centros urbanos e, no Brasil, a epidemia de HIV/AIDS teve início nos estados das regiões sul e sudeste, mas, atualmente predomina no nordeste (158). A emergência de co-infecção HIV/Leishmania no Rio Grande do Norte coincidiu com a periurbanização de LV em Natal, visto que, o primeiro caso de LV em paciente com AIDS aconteceu em 1990, ocasião em que LV estava em franca expansão na periferia de Natal. Esta nova entidade clínica foi descrita inicialmente na Espanha, em 1985 (159) estendendo-se por toda a bacia do mediterrâneo e agora já é descrita em 34 países, incluindo o Brasil.

O padrão clínico da LV em pacientes HIV positivos, no RN é semelhante ao europeu com a maioria dos casos (80%) ocorrendo em homens entre 20 e 50 anos; com tendência da LV ocorrer tardiamente no curso da infecção por HIV, quando a contagem de linfócitos CD4+ está  $<200/\text{mm}^3$  e com os achados de apresentação clínica (febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e citopenias) idêntica aos casos de LV não associados a HIV (160). Da mesma forma, no RN e no Sul da Europa, alguns pacientes com co-infecção HIV/leishmania não tinham esplenomegalia, os títulos de anticorpos anti-leishmania eram mais baixos ou indetectáveis e, recaídas de LV e óbito foram mais frequentes em pacientes com LV co-infectados com HIV. Apresentações atípicas de LV com achados pulmonares têm sido relatadas em pacientes com co-infecção HIV/Leishmania, mas, estes casos são relativamente infrequentes na Europa (92) e também não foram identificados em nossa casuística. Subnotificação, bem como, dificuldades no diagnóstico diferencial com outros microrganismos que causam infecção oportunista em pacientes com AIDS podem ter influenciado neste resultado, no RN.

Diferença importante entre as duas áreas se refere à transmissão de Leishmania e HIV. No RN, admite-se que infecção por HIV foi adquirida por transmissão sexual, conforme dados da Secretaria de Estado da Saúde e que, infecção por *Leishmania infantum/chagasi* foi adquirida por via vetorial, visto que mais de 40% dos co-infectados tinham história prévia de LV. Na Espanha, transmissão de ambos os patógenos se dá por via parenteral, por compartilhamento de seringas para uso de drogas ilícitas (161).

Quanto à evolução clínica, no RN, recaídas foram comuns em pacientes co-infectados quando comparados com pacientes com LV somente, a despeito da introdução do esquema HAART em todos os casos de co-infecção. Embora, a adesão à terapêutica



não tenha sido avaliada. Recaídas em co-infectados recebendo terapia HAART também foi descrita na Europa. Entretanto, resistência às drogas usadas no tratamento da LV (glucantime e anfotericina B) não foi avaliada neste estudo.

A sobreposição das áreas de ocorrência de HIV/ AIDS e de leishmaniose visceral no Rio Grande do Norte prenuncia forte impacto no perfil clínico e epidemiológico nas duas doenças no estado, como demonstrado neste estudo. AIDS, em todo o Brasil, vem acometendo com maior intensidade, que anteriormente, a faixa etária infantil, as mulheres e os idosos. LV, no RN, vem acometendo gradativamente uma população maior de adultos do sexo masculino. Contudo a incidência de AIDS ainda é maior em homens, na faixa etária dos 20 aos 50 anos e, LV é ainda altamente prevalente em crianças. Adicionalmente, a proporção de infecção assintomática versus sintomática por *L. chagasi* é de 6 a 8:1 em crianças (42;43) e muito mais alto (18:1) em adultos (162), com maior risco de desenvolver LV acima dos 40 anos de idade, como observado neste estudo. A atual situação é preocupante, uma vez que, parece não haver imunidade estéril na infecção por *Leishmania* (163; 164) e que a infecção por HIV provoca disfunção significativa da imunidade celular por perda de linfócitos T CD4. O que amplia, em muito, a população sob risco de adoecer da nova entidade clínica.

A problemática da co-infecção HIV/leishmania demonstrada neste estudo deixa claro que vigilância epidemiológica para co-infecção HIV/Leishmania deve ser adotada em todas as áreas de risco. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda que todos os indivíduos com LV sejam testados para HIV, mas, LV ainda não é considerada definidora de AIDS, diferentemente dos países europeus. Resistência às drogas utilizadas atualmente, no tratamento para LV é um problema a ser avaliado, bem como, transmissão parenteral de *L. infantum/chagasi*, nos estados onde dependência de droga é fator de risco para aquisição de HIV.

Finalmente, os dados revelam um problema de saúde pública, potencialmente, grave no Rio Grande do Norte, com risco de importante morbidade e mortalidade para a população urbana e conseqüente dano social e econômico para o estado.

## VI – CONCLUSÕES

1. Nos últimos 20 anos, nota-se uma tendência da LV instalar-se em municípios de maior porte e, portanto, mais urbanizados do Rio Grande do Norte.
2. As regiões leste e oeste do estado constituem-se nas de maior risco para leishmaniose visceral.
3. Nos últimos 10 anos, observa-se mudança no padrão demográfico da LV no RN que passou a acometer mais intensamente indivíduos na idade adulta, do sexo masculino.
4. A positividade ao Teste de Hipersensibilidade Tardia (DTH) a antígenos de Leishmania é um bom marcador de resistência à LV e, possivelmente, está sob controle genético.
5. 64% da população do RN está sob risco de ter LV, o qual é maior acima de 40 anos de idade.
6. Co-infecção HIV/ Leishmania no RN acomete, principalmente, indivíduos adultos do sexo masculino que adquirem HIV por transmissão sexual.
7. No RN, apresentação clínica inicial de LV é semelhante em indivíduos HIV positivos e HIV negativos, entretanto, contagem de linfócitos TCD4 e títulos de anticorpos anti-leishmania são significativamente mais baixos naqueles co-infectados.
8. Recaídas e óbitos, por LV, são mais frequentes em indivíduos HIV positivos do que naqueles HIV negativos.
9. A identificação da sobreposição de áreas de ocorrência de HIV/AIDS e LV no RN apontam para risco aumentado da nova entidade clínica, a co-infecção HIV/Leishmania, no estado.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q* 1992;45(2-3):267-75.
- (2) Pearson RD, Lareau SM, Jeronimo SM. Leishmaniasis at the End of the Millennium. *Curr Infect Dis Rep* 1999 Dec;1(5):448-52.
- (3) Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996 Sep;14(5):417-23.
- (4) Ponce C, Ponce E, Morrison A, Cruz A, Kreutzer R, Mahon-Pratt D, et al. *Leishmania donovani* chagasi: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras *Lancet* 1991 Jan 12;337(8733):67-70.
- (5) Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME, et al. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006 Jan;100(1):79-82.
- (6) Barral A, Badaro R, Barral-Netto M, Grimaldi G, Jr., Momem H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986 Jul;35(4):732-4.
- (7) Sachs D.L. Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet* 345, 959-961. 1995.
- (8) Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review 1. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Dec;100(8):811-27.
- (9) Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000 May;16(5):188-9.
- (10) Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 May 29;104(22):9375-80.

- (11) Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review 2. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005 Dec;100(8):811-27.
- (12) Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review 2. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005 Dec;100(8):811-27.
- (13) Deane LM. [Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil.]. Rev Assoc Med Bras 1961 Jun;7:161-9.
- (14) Travi BL, Arteaga LT, Leon AP, Adler GH. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002 Sep;97(6):887-92.
- (15) Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. Vet Parasitol 2004 Mar 25;120(3):229-33.
- (16) Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clin Infect Dis 1997 Nov;25(5):1240-2.
- (17) Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. J Infect Dis 1992 Nov;166(5):1124-32.
- (18) Camargo-Neves VL, Katz FG, Rodas LAC, Poletto DW, Spinola RMP, et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana -Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cadernos de Saúde Pública 15, 1263-1267. 2001.
- (19) Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. Parasitol Today 1992 Mar;8(3):104-5.
- (20) Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review 1. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005 Dec;100(8):811-27.

- (21) Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Vélez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), vector of visceral leishmaniasis in Northern Colombia. *J Med Entomol* 33, 278-285. 1996.
- (22) dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva HM, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998 Jul;12(3):315-7.
- (23) Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 Sep;27(5):305-18.
- (24) Young DG, Arias JR. Phlebotomine sandflies in the Americas. Pan American Health Organization. 33. 1991.
- (25) Ximenes MF, Silva VP, Queiroz PV, Rego MM, Cortez AM, Batista LM, et al. [Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses]. *Neotrop Entomol* 2007 Jan;36(1):128-37.
- (26) Rosenthal PJ, Chaisson RE, Hadley WK, Leech JH. Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrom. *Am J Med* 1988 Feb;84(2):307-9.
- (27) Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):357-88.
- (28) Mosser DM, Brittingham A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 1997;115 Suppl:S9-23.
- (29) Fearon DT, Locksley RM. Elements of Immunity - The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-53. 2009.  
Ref Type: Generic
- (30) Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):245-66.
- (31) Rezai HR, Ardehali SM, Amirhakimi G, Kharazmi A. Immunological features of kala-azar. *Am J Trop Med Hyg* 1978 Nov;27(6):1079-83.
- (32) Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 2005 Mar 7;201(5):747-54.

- (33) Fatma Ben Moussa RGHKHHSBHBM. **GLOMERULONEPHRITIS IN PATIENTS WITH HYDATID DISEASE (HD)**. *Nephrol.Dial.Transplant* 18, 59-80. 2009.
- (34) V Chaigne YKRLJBBMGDFJS. A patient with visceral **leishmaniasis and** acute renal failure in necrotizing glomerulonephritis. *Nephrologie* 25 (5), 179-183. 1-1-2004.
- (35) Brittingham A, Miller MA, Donelson JE, Wilson ME. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 2001 Jan 15;112(1):51-9.
- (36) Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 2001 Jul 15;167(2):893-901.
- (37) Gazzinelli RT, Talvani A, Camargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, Vieira LQ, et al. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Braz J Med Biol Res* 1998 Jan;31(1):89-104.
- (38) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
- (39) Rodrigues OR, Marques C, Soares-Clemente M, Ferronha MH, Santos-Gomes GM. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology* 2009;214(2):101-11.
- (40) Belkaid Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther* 2003 Sep;3(6):875-85.
- (41) Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 2002 Dec 5;420(6915):502-7.
- (42) Bogdan C, Gessner A, Rollinghoff M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiology* 1993 Nov;189(3-4):356-96.
- (43) Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 2005 Apr;38(4):147-60.

- (44) Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD, Jr. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun* 1981 Aug;33(2):498-500.
- (45) Atta AM, D'Oliveira, Correa J, Atta ML, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1998 Sep;59(3):426-30.
- (46) Zwingenberger K, Harms G, Pedrosa C, Omena S, Sandkamp B, Neifer S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production 5. *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Nov;57(2):242-9.
- (47) Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaro R, Rocha H, et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis* 1992 Mar;165(3):535-40.
- (48) Bacellar O, Barral-Netto M, Badaro R, Carvalho EM. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. *Braz J Med Biol Res* 1991;24(8):791-5.
- (49) Carvalho EM, Bacellar OA, Reed S, Barral A, Rocha H. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. *Braz J Med Biol Res* 1988;21(1):85-92.
- (50) Pearson RD, Cox G, Jeronimo SM, Castracane J, Drew JS, Evans T, et al. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *Am J Trop Med Hyg* 1992 Jul;47(1 Pt 2):8-15.
- (51) Ximenes MF, Castellon EG, De Souza MF, Menezes AA, Queiroz JW, Macedo e Silva VP, et al. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. *J Med Entomol* 2006 Sep;43(5):990-5.
- (52) Ximenes MF, Silva VP, Queiroz PV, Rego MM, Cortez AM, Batista LM, et al. [Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses] 1. *Neotrop Entomol* 2007 Jan;36(1):128-37.

- (53) Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol* 2009 May;31(5):254-66.
- (54) Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun* 2007 Oct;8(7):539-51.
- (55) Leishmaniose visceral no Brasil: Situação atual, principais aspectos epidemiológicos e medidas de controle. *Boletim Epidemiológico Eletrônico* 06. 13-12-2002. Ministério da saúde (MS)/Fundação Nacional de saúde (FUNASA). Ref Type: Generic
- (56) Badaro R, Jones TC, Lorenci R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986 Oct;154(4):639-49.
- (57) Holaday BJ, Pompeu MM, Evans T, Braga DN, Teixeira MJ, Sousa AQ, et al. Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 1993 Feb;167(2):411-7.
- (58) Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis* 2004;36(6-7):443-9.
- (59) Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986 Dec;154(6):1003-11.
- (60) Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992 Nov;166(5):1124-32.
- (61) Desjeux P. *Leishmania* / HIV co-infections. *Afr Health* 1995 Nov;18(1):20-2.
- (62) Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996 Sep;14(5):471-8.



- (63) Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983 May;32(3):475-9.
- (64) Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986 Dec;154(6):1003-11.
- (65) Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996 Sep;14(5):471-8.
- (66) Burns JM, Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jan 15;90(2):775-9.
- (67) Burns JM, Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jan 15;90(2):775-9.
- (68) Qu JQ, Zhong L, Masoom-Yasinzai M, bdur-Rab M, Aksu HS, Reed SG, et al. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994 Sep;88(5):543-5.
- (69) Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Oct;67(4):344-8.
- (70) Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Oct;67(4):344-8.
- (71) Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, Basu D, De Bruijn MH, Adhya S, et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology* 1992 Oct;105 ( Pt 2):183-92.

- (72) Adhya S. Detection of *Leishmania* in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans.R.Soc.Trop Med Hyg.* 59, 622-624. 1995.
- (73) Ibrahim ME, Lambson B, Yousif AO, Deifalla NS, Alnaiem DA, Ismail A, et al. Kala-azar in a high transmission focus: an ethnic and geographic dimension. *Am J Trop Med Hyg* 1999 Dec;61(6):941-4.
- (74) Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis *J Clin Microbiol* 1997 Oct;35(10):2454-7.
- (75) Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2003 Nov;41(11):5080-4.
- (76) Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004 Nov;42(11):5249-55.
- (77) Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983 May;32(3):475-9.
- (78) Balzan M, Fenech F. Acute renal failure in visceral leishmaniasis treated with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 Sep;86(5):515-6.
- (79) Freire M, Badaro F, Avelar ME, Luz K, Nakatani MS, Teixeira R, et al. Efficacy and Tolerability of Liposomal Amphotericin B (Ambisome) in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Braz J Infect Dis* 1997 Oct;1(5):230-40.
- (80) de LF, Pellizzer G, Gradoni L, Vespignani M, Franzetti M, Stecca C. Acute pancreatitis associated with the administration of meglumine antimonate for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1993 May;16(5):730-1.
- (81) Torrus D, Massa B, Boix V, Portilla J, Perez-Mateo M. Meglumine antimoniate-induced pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1996 Apr;91(4):820-1.
- (82) Valencia ME, Laguna F, Gonzalez LJ. [Nephrotic syndrome and acute pancreatitis related to glucantime administration]. *An Med Interna* 2000 Jan;17(1):54.

- (83) Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ* 1998;76(1):25-32.
- (84) Pearson RD, Jeronimo SM, Lareau SM. US Food and Drug Administration Approval of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Visceral Leishmaniasis: A Model for Orphan Drug Development. *Curr Infect Dis Rep* 1999 Dec;1(5):415-6.
- (85) Soto-Mancipe J, Grogl M, Berman JD. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Clin Infect Dis* 1993 Mar;16(3):417-25.
- (86) Berman J. Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. *Curr Opin Infect Dis* 1998 Dec;11(6):707-10.
- (87) Berman J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 2005 Jan;7(1):33-8.
- (88) Sundar S, Jha TK, Sindermann H, Junge K, Bachmann P, Berman J. Oral miltefosine treatment in children with mild to moderate Indian visceral leishmaniasis. *Pediatr Infect Dis J* 2003 May;22(5):434-8.
- (89) Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag* 2007 Oct;3(5):733-40.
- (90) Sundar S, Rai M, Chakravarty J, Agarwal D, Agrawal N, Vaillant M, et al. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. *Clin Infect Dis* 2008 Oct 15;47(8):1000-6.
- (91) Laguna F. Treatment of leishmaniasis in HIV-positive patients. *Ann Trop Med Parasitol* 2003 Oct;97 Suppl 1:135-42.
- (92) Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den BM, Canavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008 Apr;21(2):334-59, table.

- (93) Bern C, dler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, Den BM, Davidson RN, et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2006 Oct 1;43(7):917-24.
- (94) Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 Sep;27(5):305-18.
- (95) Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2006. Normas e Manuais Técnicos. Série A. 2006.
- (96) Desjeux P, Piot B, O'Neill K, Meert JP. [Co-infections of leishmania/HIV in south Europe]. *Med Trop (Mars )* 2001;61(2):187-93.
- (97) Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997 Apr;10(2):298-319.
- (98) Magill AJ. Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatol Clin* 1995 Jul;13(3):505-23.
- (99) Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002 Aug;2(8):494-501.
- (100) de la LA, Alvar J, Martinez GE, Blazquez J, Alcala MA, Najera R. Leishmaniasis or AIDS? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985;79(3):421-2.
- (101) Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 Sep;27(5):305-18.
- (102) Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 Sep;27(5):305-18.
- (103) Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemo-Epidemias C-AMdSyAdlBAA. ***Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina.** *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 100(5), 475-476. 2005. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- (104) Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) Associated with the Appearance of Urban Leishmaniasis in the City

- of Sincelejo, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol 97(5), 645-647. 2002.
- (105) Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, et al. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis* 2006 Mar;12(3):440-6.
- (106) Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, et al. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis* 2006 Mar;12(3):440-6.
- (107) Martín-Sánchez J, Navarro-Mari JM, Pasquau-Liaño J, Salomón OD, Morillas-Márquez F. **Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in a Spanish patient in Argentina: What is the origin of the infection? Case report.** *Emerg Infect Dis* 2007;13(4):20. 2007.
- (108) Parkas V, Godwin J, Murray HW. Kala-azar comes to New York. *Arch Intern Med* 1997 Apr 28;157(8):921-3.
- (109) Costa CH, Pereira HF, Araujo MV. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986] *Rev Saude Publica* 1990 Oct;24(5):361-72.
- (110) Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994 Jul;88(4):386-8.
- (111) Tavares MLSA, Tavares ED. Incidência, Distribuição Geográfica e Aspectos Ambientais das Áreas Endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. *Informe Epidemiológico do SUS* 8(1), 47-52. 1999.
- (112) Franke CR, Ziller M, Staubach C, Latif M. Impact of the El Niño/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002 Sep;8(9):914-7.
- (113) Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994 Jul;88(4):386-8.
- (114) Ximenes MF, Castellon EG, De Souza MF, Menezes AA, Queiroz JW, Macedo e Silva VP, et al. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of

- Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. *J Med Entomol* 2006 Sep;43(5):990-5.
- (115) MOURA ML, SAMPAIO GA, NOBRE PF, REGO EF, MONTEIRO GRG, PONTES NNC, et al. Perfil clínico e laboratorial de pacientes com co-infecção HIV/leishmania em Natal. *Anais do XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40, 119. 200.
- (116) Evans TG, Krug EC, Wilson ME, Vasconcelos AW, de Alencar JE, Pearson RD. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989 Apr;84(2):157-66.
- (117) Burns JM, Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jan 15;90(2):775-9.
- (118) Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 2000 Mar;30(3):608-9.
- (119) Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis* 2004;36(6-7):443-9.
- (120) Anselin L, Sridharan S, Gholston S. Using exploratory spatial data analysis to leverage social indicator databases: The discovery of interesting patterns. *Social Indicators Research* 2007 Jun;82(2):287-309.
- (121) Anselin A. Local Indicators of Spatial Association – LISA. *Geographical Analysis*, 1995;27:97-115.
- (122) Kulldorff M, Nagarwalla N. Spatial disease clusters: detection and inference. *Stat Med* 1995 Apr 30;14(8):799-810.
- (123) Bailey TC, Carvalho MS, Lapa TM, Souza WV, Brewer MJ. Modeling of under-detection of cases in disease surveillance. *Ann Epidemiol* 2005 May;15(5):335-43.

- (124) Tukey JW. Data Analysis and the Frontiers of Geophysics: More can be learned from data by wise use of spectrum analysis, choice of expression, and straggling values. *Science* 1965 Jun 4;148(3675):1283-9.
- (125) Shaw J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007 Aug;102(5):541-7.
- (126) Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 2008 Dec;24(12):2959-63.
- (127) Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 2008 Dec;24(12):2941-7.
- (128) Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994 Jul;88(4):386-8.
- (129) Costa CH, Pereira HF, Araujo MV. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piaui, Brazil, 1980-1986]. *Rev Saude Publica* 1990 Oct;24(5):361-72.
- (130) ntas-Torres F, Brandao-Filho SP. [Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006 Jul;39(4):352-6.
- (131) Yarzon RM, Dorval ME, de Freitas HG, Oshiro ET. [American leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36 Suppl 2:41-2.
- (132) Andrade AM, Queiroz LH, Perri SH, Nunes CM. [A descriptive profile of the canine population in Aracatuba, Sao Paulo State, Brazil, from 1994 to 2004]. *Cad Saude Publica* 2008 Apr;24(4):927-32.
- (133) Souza NA, ndrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002 Sep;97(6):759-65.
- (134) Ximenes MF, Castellon EG, De Souza MF, Menezes AA, Queiroz JW, Macedo e Silva VP, et al. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. *J Med Entomol* 2006 Sep;43(5):990-5.

- (135) Salomon O, Sinagra A, Nevot M, Barberian G, Paulin P, Estevez J, et al. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008 Feb;103(1):109-11.
- (136) Salomon OD, Acardi SA, Liotta DJ, Fernandez MS, Lestani E, Lopez D, et al. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazu falls area of Argentina. *Acta Trop* 2009 Jan;109(1):5-11.
- (137) Hashiguchi Y, Arias O, Maciel D, Mansur J, Furuya M, Kawabata M. Cutaneous leishmaniasis in south-eastern Paraguay: a study of an endemic area at Limoy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991 Sep;85(5):592-4.
- (138) Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003 Oct;97 Suppl 1:3-15.
- (139) Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol* 2009 May;31(5):254-66.
- (140) Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun* 2007 Oct;8(7):539-51.
- (141) Salih MA, Ibrahim ME, Blackwell JM, Miller EN, Khalil EA, ElHassan AM, et al. IFNG and IFNGR1 gene polymorphisms and susceptibility to post-kala-azar dermal leishmaniasis in Sudan. *Genes Immun* 2007 Jan;8(1):75-8.
- (142) Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A, et al. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun* 2007 Jan;8(1):84-90.
- (143) Blackwell JM, Mohamed HS, Ibrahim ME. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. *Trends Parasitol* 2004 Jun;20(6):268-74.
- (144) Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, White JK, Cordell HJ, Howson JM, et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *Eur J Hum Genet* 2004 Jan;12(1):66-74.
- (145) Settin A, Ismail A, El-Magd MA, El-Baz R, Kazamel A. Gene polymorphisms of TNF-alpha-308 (G/A), IL-10(-1082) (G/A), IL-6(-174) (G/C) and IL-1Ra (VNTR)



- in Egyptian cases with type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity* 2009 Jan;42(1):50-5.
- (146) Namjou B, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of clinical expression in SLE. *Autoimmunity* 2007 Dec;40(8):602-12.
- (147) Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis* 2007 Oct 15;196(8):1261-9.
- (148) Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997 Nov;25(5):1240-2.
- (149) Ximenes MF, Castellon EG, de Souza MF, Freitas RA, Pearson RD, Wilson ME, et al. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *J Med Entomol* 2000 Jan;37(1):162-9.
- (150) Vieira ED, Torres JP, Malm O. DDT environmental persistence from its use in a vector control program: a case study. *Environ Res* 2001 Jun;86(2):174-82.
- (151) Singh R, Das RK, Sharma SK. Resistance of sandflies to DDT in Kala-azar endemic districts of Bihar, India. *Bull World Health Organ* 2001;79(8):793.
- (152) Mukhopadhyay AK, Hati AK, Chakraborty S, Saxena NB. Effect of DDT on *Phlebotomus* sandflies in Kala-Azar endemic foci in West Bengal. *J Commun Dis* 1996 Sep;28(3):171-5.
- (153) Aoun K, Chouih E, Boufaden I, Mahmoud R, Bouratbine A, Bedoui K. [Efficacy of Deltamethrine-impregnated collars Scalibor in the prevention of canine leishmaniasis in the area of Tunis]. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2008;85(1-4):63-8.
- (154) Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1997 Apr;11(2):105-11.
- (155) Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 2007 Feb;135(2):195-201.

- (156) Cerbino NJ, Werneck GL, Costa CH. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad Saude Publica* 2009 Jul;25(7):1543-51.
- (157) Evans TG, Teixeira MJ, Sousa AQ, Pearson RD. Short report: extended follow-up of the natural history of persons infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1995 Oct;53(4):360-1.
- (158) Hacker MA, Leite I, Friedman SR, Carrijo RG, Bastos FI. Poverty, bridging between injecting drug users and the general population, and "interiorization" may explain the spread of HIV in southern Brazil. *Health Place* 2009 Jun;15(2):514-9.
- (159) Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2003 Oct;97:3-15.
- (160) Montalban C, Calleja JL, Erice A, Laguna F, Clotet B, Podzamczar D, et al. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the Study of Leishmaniasis in AIDS. *J Infect* 1990 Nov;21(3):261-70.
- (161) Amela C, Lopez-Gay D, Alberdi JC, Castilla J. Injecting drug use as risk factor for visceral leishmaniasis in AIDS patients. *Eur J Epidemiol* 1996 Feb;12(1):91-2.
- (162) Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986 Dec;154(6):1003-11.
- (163) Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 1998 Jun;58(6):824-7.
- (164) Mendonca MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004 Mar 15;189(6):1018-23.

I

## **VIII - ANEXOS**

## Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection

Fórum: expansão geográfica e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. Posfácio: novos desafios na epidemiologia da infecção por *Leishmania chagasi*

Eliana L. T. Nascimento <sup>1</sup>  
 Daniella R. Martins <sup>2</sup>  
 Glória R. Monteiro <sup>2</sup>  
 James D. Barbosa <sup>2</sup>  
 Maria F. F. M. Ximenes <sup>2</sup>  
 Bruna L. Maciel <sup>2</sup>  
 Iraci Duarte <sup>3</sup>  
 Selma M. B. Jerônimo <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

<sup>3</sup> Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Natal, Brasil.

### Correspondence

S. M. B. Jerônimo  
 Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

C. P. 1524, Natal, RN  
 59072-970, Brasil.  
 smbj@cb.ufrn.br

Visceral leishmaniasis is a disease that reemerged in various locations in Brazil in the 1980s and spread to new areas, including the Southeast and Central-West of the country. Previously, visceral leishmaniasis was a disease that occurred in rural areas of the Northeast, mainly affecting children <sup>1</sup>. However, most cases of visceral leishmaniasis now come from periurban areas of cities in Northeast, Central-West, and Southeast Brazil <sup>2,3,4</sup>.

The articles in this Forum <sup>5,6,7,8</sup> discuss key aspects related to the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil, including new approaches to deal with the disease and conditioning factors for the vector's capacity to transmit *Leishmania*. The complexity of vector and reservoir control is identified as a factor that hinders the management of visceral leishmaniasis in the country. The Forum proposes a new discussion and reassessment of current intervention measures. The latter focus on culling dogs infected with *Leishmania* and residual-action pesticide spraying, but these measures are normally implemented after human cases of visceral leishmaniasis have already been identified, often long after the occurrence of *Leishmania* infection, due mainly to its long incubation period <sup>9,10</sup>. Still, as commented in the article by Maia-Elkhoury et al. <sup>5</sup>, the regularity of these intervention measures can have an impact with a reduction of up to 39% in *Leishmania* infection in humans, according to studies by the Brazilian Ministry of Health.

The peri-urbanization of visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, presented by Oliveira et al. <sup>6</sup> as an example of this process in Brazil, was similar to that observed in the Northeast, with subsequent spread to other cities in the Southeast and Central-West. It is worrisome that these endemic areas have a high population density, thus placing the population at increased risk of infection.

Dogs have traditionally been considered the principal reservoirs of *Leishmania chagasi* in periurban areas <sup>11</sup>. Canine visceral leishmaniasis generally precedes human disease in these new areas <sup>4</sup>. This was demonstrated in the visceral leishmaniasis epidemic in Araçatuba, São Paulo State <sup>12,13</sup>. Studies in the State of Rio Grande do Norte show a 32.6% *Leishmania* infection rate in dogs in an endemic area on the outskirts of the State capital Natal, with a 30% six-month seroconversion rate in these animals. Asymptomatic *Leishmania* infection in humans is also high, with 24.6% of individuals presenting anti-*Leishmania* antibodies and 38.6% of these showing a positive delayed hypersensitivity skin test to *Leishmania* antigens <sup>14</sup>.

The high asymptomatic *Leishmania* infection rate in humans, as observed in Rio Grande do Norte, shows that visceral leishmaniasis is only the lesser component in the process, and that asymptomatic infection is more frequent. The role of asymptomatic *Leishmania* infection in humans and canines has still not been fully

elucidated within the *Leishmania* transmission chain, and further studies are needed to better document and evaluate the impact of silent infection in maintaining the endemicity. This fact is a cause for concern, especially considering the endemization of visceral leishmaniasis in major peri-metropolitan areas of Brazil. Thus, studies are also needed to assess the role of asymptomatic *Leishmania* infection on blood and organ donations, since these procedures are currently widespread in cities that are endemic for visceral leishmaniasis and that present a high asymptomatic *Leishmania* infection rate. The development of post-transplantation visceral leishmaniasis has been documented in Europe, although the numbers are not high<sup>15</sup>. The magnitude of asymptomatic *Leishmania* infection in Brazil may also result in a change in the epidemiological profile of visceral leishmaniasis. Given the panorama presented here, one can predict that more cases of visceral leishmaniasis associated with immune suppression will occur, involving greater severity and more complex treatment management, as observed in Europe<sup>16,17,18</sup>.

The control of dogs infected with *Leishmania* is difficult, as discussed in the article by Oliveira et al.<sup>6</sup>. When dogs are culled, they are promptly replaced with others, and the act of culling is controversial and not always readily accepted by the population<sup>19</sup>. It has been demonstrated in various places around the world<sup>20</sup> that cypermethrin-impregnated dog collars are effective repellants against the visceral leishmaniasis vector, but the strategy is costly given that only a small portion of the population can afford this control method.

*Lutzomyia longipalpis* is the principal vector for *L. chagasi* in Brazil and elsewhere in Latin America<sup>21</sup>. Rangel et al.<sup>7</sup> reviewed the conditioning factors for the vectorial competence of *Lu. longipalpis* in transmitting *L. chagasi* in Brazil and its adaptation to periurban areas. This vector has highly eclectic eating habits and adapts easily to peridomiciliary conditions<sup>22,23</sup>. *Lu. longipalpis* is most active from 7:00 to 11:00 PM<sup>22</sup>, when most residents are normally inside or around their homes. These observations back the hy-

pothesis that infections normally occur indoors or in the peridomicile. Meanwhile, we demonstrate that *Leishmania* infection in humans is found in all age brackets and equally in both sexes, although men develop visceral leishmaniasis more frequently than women<sup>24</sup>, thus reinforcing the hypothesis that *Leishmania* infection occurs in the domestic environment.

The adaptation of *Leishmania* vectors to periurban areas and their spread to new areas in Latin America expand the endemic leishmaniasis regions, with increased risk of infection. *Leishmania* infection is now found in northern Argentina and Paraguay<sup>25,26</sup>. Visceral leishmaniasis control measures in other countries have also been associated with vector control. The use of residual DDT in India to control malaria vectors resulted in a significant decrease in cases of visceral leishmaniasis<sup>27,28</sup>, indicating that effective vector control can be achieved. However, it is necessary to develop new insecticides and control the spraying areas with monitoring and evaluation of their efficacy, as discussed in the article by Costa<sup>8</sup>.

Visceral leishmaniasis control also involves community education in risk areas, teaching measures to avoid producing areas that favor the development of phlebotomine sand flies in backyards and in the vicinity of homes. The identification of spatial clusters of human and canine visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, led to the identification of focal areas at risk of *Leishmania* infection, thereby facilitating the definition of areas to undergo specific interventions<sup>29,30</sup>. However, the decentralization of epidemiological surveillance and visceral leishmaniasis control activities to the municipalities could be an additional complicating factor, due to deficiencies in infrastructure at the local level for dealing with the problem's complexity. On-going joint work between the Ministry of Health and the Brazilian scientific community can assist in the understanding and development of new strategies to deal with visceral leishmaniasis, including educational measures, especially considering that no anti-*Leishmania* vaccine will be available in the short term.

## Contributors

All the authors contributed equally to the article.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Prof. Dulce Almeida (Department of Microbiology and Parasitology, Federal University in Rio Grande do Norte), for reviewing the manuscript.

## References

- Jeronimo SM, Souza AQ, Pearson RD. Leishmaniasis. In: Goldman L, Ausiello D, editors. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia: W. B. Saunders; 2004. p. 2082-8.
- Costa CH, Pereira HF, Araujo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. Rev Saúde Pública 1990; 24:361-72.
- Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88:386-8.
- Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96:285-91.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad Saúde Pública 2008; 24:2941-7.
- Oliveira CDL, Morais MHF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. Cad Saúde Pública 2008; 24:2953-8.
- Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saúde Pública 2008; 24:2948-52.
- Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saúde Pública 2008; 24:2959-63.
- Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. J Infect Dis 1992; 166:1124-32.
- Evans TG, Teixeira MJ, Sousa AQ, Pearson RD. Short report: extended follow-up of the natural history of persons infected with *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg 1995; 53:360-1.
- Moreira Jr. ED, Souza VM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, Carvalho LP. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. Am J Trop Med Hyg 2003; 69:393-7.
- Andrade AM, Queiroz LH, Perri SHV, Nunes CM. Estudo descritivo da estrutura populacional canina da área urbana de Araçatuba, São Paulo, Brasil, no período de 1994 a 2004. Cad Saúde Pública 2008; 24:927-32.
- Barão SC, Camargo-Neves VLF, Resende MR, Silva LJ. Human asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: a seroprevalence study in an urban area of low endemicity. Preliminary results. Am J Trop Med Hyg 2007; 77:1051-3.
- Duarte I, Queiroz JW, Pontes NN, Cabral A, Maciel BL, Araujo SF, et al. Changing natural history of *Leishmania chagasi* infection in Brazil: the magnitude of the asymptomatic infection and potential for cyclic epidemic of visceral leishmaniasis. Emerg Infect Dis; Submitted.
- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. Lancet Infect Dis 2008; 8:191-9.
- Weisser M, Khanlari B, Terracciano L, Arber C, Gratwohl A, Bassetti S, et al. Visceral leishmaniasis: a threat to immunocompromised patients in non-endemic areas? Clin Microbiol Infect 2007; 13: 751-3.
- Mannonci A, La Torre G, Chiaradia G, De Waure C, Mainelli MT, Cernigliaro A, et al. Epidemiology and direct medical costs of human leishmaniasis in Italy. J Prev Med Hyg 2007; 48:27-36.
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. Indian J Med Res 2006; 123:357-88.
- Nunes CM, Lima VM, Paula HN, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol 2008; 153:19-23.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Med Vet Entomol 1997; 11:105-11.
- Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100:811-27.
- Ximenes MF, Castellón EG, Souza MF, Menezes AA, Queiroz JW, Silva VP, et al. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. J Med Entomol 2006; 43:990-5.
- Ximenes MF, Silva VP, Queiroz PV, Rego MM, Cortez AM, Batista LM, et al. Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses. Neotrop Entomol 2007; 36:128-37.

24. Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in north-east Brazil. *Scand J Infect Dis* 2004; 36:443-9.
25. Córdoba-Lanús E, De Grosso ML, Piñero JE, Valadares B, Salomón OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop* 2006; 98:1-5.
26. Salomon OD, Orellano PW. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:475-6.
27. Birley MH. An historical review of malaria, kala-azar and filariasis in Bangladesh in relation to the Flood Action Plan. *Ann Trop Med Parasitol* 1993; 87:319-34.
28. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:494-501.
29. Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiology* 2002; 13:364-7.
30. Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 2007; 135:195-201.

---

Submitted on 06/Mar/2008

Final version resubmitted on 12/Jun/2008

Approved on 16/Jun/2008

Elsevier Editorial System(tm) for Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine  
and Hygiene

Manuscript Draft

Manuscript Number: TRSTMH-D-10-00176

Title: The Emergence of Concurrent HIV-1/AIDS and Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil

Article Type: Full Length Article

Keywords: Visceral leishmaniasis; Leishmania; HIV; AIDS; Brazil

Corresponding Author: Dr. Selma M Jeronimo, M.D., PhD.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Norte

First Author: Eliana T Nascimento, M.D, PhD

Order of Authors: Eliana T Nascimento, M.D, PhD; Maria L Moura, M.D; Jose W Queiroz, PhD; Antonio F Araujo, MD; Eugenio F Rego, MD; Mary E Wilson, MD; Richard D Pearson, MD; Selma M Jeronimo, M.D., PhD.

Abstract: Endemic areas for *Leishmania infantum chagasi* (Lic) have widened in Brazil with increased number of people at risk of infection. Since Leishmaniasis can be an opportunistic infection, we hypothesized that the prevalence of visceral leishmaniasis (VL) would increase in immunocompromised states such as HIV infection. The objective of this study was to document the emergence of concurrent HIV/AIDS and VL, and to discern the effect of HIV co-infection on the course of Lic infection in northeast Brazil. Patients from Natal, Brazil with concurrent HIV/AIDS and VL or with Lic infection alone were assessed. The average age of HIV-VL co-infected persons was 37.3 (range 29-53) years, compared to 12 years in individuals with VL alone. Males accounted for 88% of co-infection cases. Anti-leishmanial antibodies were lower in HIV-infected than in non-infected patients with VL. In families residing in the leishmania-endemic area, 40.8% of members had evidence of asymptomatic *Leishmania* infection, which could potentially activate during immunocompromise. The concurrence of HIV/AIDS and VL constitutes a change in the epidemiology of disease caused by Lic. Considering the high prevalence of *Leishmania* infection in the region, this may herald the emergence of an important public health problem in Brazil.

Suggested Reviewers: Warren Johnson MD

Professor, Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, Cornell University

wdjohnso@med.cornell.edu

He works with leishmaniasis and AIDS.

Barbara L Herwaldt MD

Center for Disease Control

bhx4@cdc.gov

She is an expert in leishmaniasis



The Emergence of Concurrent HIV-1/AIDS and Visceral Leishmaniasis in Northeast  
Brazil

Nascimento ET<sup>1,2</sup>, Moura MLN<sup>3</sup>, Queiroz JW<sup>2</sup>, Araujo AF<sup>4</sup>, Rego EF<sup>4</sup>, Wilson ME<sup>5</sup>,  
Pearson RD<sup>6</sup>, and Jeronimo SM<sup>2,3</sup>

Department of Infectious Disease<sup>1</sup>, Health Post-Graduate Program<sup>2</sup>, Health Sciences  
Center; Department of Biochemistry<sup>3</sup>, Biosciences Center, Universidade Federal do Rio  
Grande do Norte, Natal, RN, Brazil; Hospital Giselda Trigueiro<sup>4</sup>, Departments of Internal  
Medicine, Microbiology and Epidemiology, University of Iowa and the VA Medical  
Center<sup>5</sup>, Iowa City, IA; Departments of Medicine and Pathology, Division of Infectious  
Diseases and International Health, University of Virginia<sup>6</sup>, Charlottesville, VA, USA.

Corresponding author:

Selma M.B. Jeronimo, MD, PhD

Department of Biochemistry

Bioscience Center, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

CP 1624, Natal, RN, Brazil

Phone-fax: 55-84-3215-3428

Email: [smbj@cb.ufrn.br](mailto:smbj@cb.ufrn.br)

Key words: visceral leishmaniasis, HIV, AIDS, Leishmania chagasi infection, Brazil

Running Head: Concurrent visceral leishmaniasis and AIDS

## **Abstract**

Endemic areas for *Leishmania infantum chagasi* (*Lic*) have widened in Brazil with increased number of people at risk of infection. Since Leishmaniasis can be an opportunistic infection, we hypothesized that the prevalence of visceral leishmaniasis (VL) would increase in immunocompromised states such as HIV infection. The objective of this study was to document the emergence of concurrent HIV/AIDS and VL, and to discern the effect of HIV co-infection on the course of *Lic* infection in northeast Brazil. Patients from Natal, Brazil with concurrent HIV/AIDS and VL or with *Lic* infection alone were assessed. The average age of HIV-VL co-infected persons was 37.3 (range 29-53) years, compared to 12 years in individuals with VL alone. Males accounted for 88% of co-infection cases. Anti-leishmanial antibodies were lower in HIV-infected than in non-infected patients with VL. In families residing in the leishmania-endemic area, 40.8% of members had evidence of asymptomatic *Leishmania* infection, which could potentially activate during immunocompromise. The concurrence of HIV/AIDS and VL constitutes a change in the epidemiology of disease caused by *Lic*. Considering the high prevalence of Leishmania infection in the region, this may herald the emergence of an important public health problem in Brazil.

Keywords. Visceral leishmaniasis, Leishmania, HIV, AIDS, Brazil

## Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) was first recognized as an opportunistic infection in individuals with HIV/AIDS in southern European countries bordering the Mediterranean Sea (1;2). *Leishmania infantum* was isolated in the majority of instances. VL and HIV/AIDS are also endemic in Brazil, but to date a limited number of co-infections have been reported (3). *L. chagasi*, the predominant cause of VL in Latin America, and *L. infantum* appear to be the same species (4;5), henceforth, we named *Lic* and the emergency of concurrent infection has been predicted.

Historically, VL in Brazil occurred primarily among children living in rural areas of the northeastern states (6). Over the past two decades, VL has emerged as a focally epidemic disease in the outskirts of rapidly expanding Brazilian cities, including Natal in the state of Rio Grande do Norte (7-9). The majority of cases of VL have been in children less than 10 years of age (8). Recent reports indicate that canine infection with *Lic* has become prevalent in major cities in the Central and Southeast regions of Brazil (10) as well as in adjacent areas of Argentina and Paraguay (11). Because canine infection often precedes human cases, this creates the potential for future occurrence of human VL throughout these more populated regions (12).

The outcome of *Lic* infection varies from self-resolving asymptomatic infection to progressive life-threatening VL (13). Control of infection and resistance to re-infection requires leishmania-specific Type 1 CD4+ T cell responses. Protective immunity is often signified by a delayed type hypersensitivity skin test response (DTH) to leishmania antigens and by the production of interferon-gamma by peripheral blood mononuclear

cells in response to leishmanial antigens *in vitro* (14). The ratio of asymptomatic to symptomatic human infections with *Lic* varies with age (15), from approximately 6-8:1 in children to 18:1 in adults. Sterile immunity is not thought to occur after either self-resolving infection or after treatment (16;17). It is therefore not surprising that T cell abnormalities, such as those associated with HIV/AIDS, neoplasia or chemotherapy, can result in the development of clinically apparent VL years after the initial infection (18).

Whereas VL has historically been concentrated in northeastern Brazil, HIV/AIDS was initially reported in major population centers in the Southeast region. Over the years HIV infection has spread widely throughout the country (19) even though universal access to HAART is available (20). The goals of this study were to document and characterize VL and HIV-1 co-infections in the northeastern Brazilian state of Rio Grande do Norte, and to determine whether they were similar to *Leishmania infantum*-HIV co-infections in southern Europe. We also sought to assess the prevalence of asymptomatic Leishmania infection in families residing in the *L. chagasi* endemic area, since this region also has a rising incidence of HIV infection. The cases presented in this paper plus those reported earlier (1) suggest that HIV/AIDS and VL co-infection is now emerging as an important medical problem in Brazil, principally considering the high rate of *Lic* asymptomatic infection in this region.

## **Material and Methods**

### **Study area**

The study was conducted in the state of Rio Grande do Norte, in the northeast of Brazil. The state has a population of 2.6 million people and its capital city, Natal, has a population of 800,000. Rio Grande do Norte has become increasingly urbanized in the past 20 years, transforming from a primarily rural state to one with over 70% of its population residing in cities.

### **Visceral leishmaniasis and AIDS case definitions.**

Patients with VL were identified from hospital records during routine weekly visits to the ward by the study team. The diagnosis of VL was based on the identification of amastigotes in bone marrow aspirates and on serological studies. In some cases, bone marrow aspirates were used to inoculate Schneider parasite growth medium. Parasites converted from amastigote to promastigote form when cultivated for 3-5 days at 26° C and were shown to be *Leishmania infantum chagasi* by isoenzyme typing (kindly typed by Dr. Elisa Cupullilo, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil). Human sera were screened for the presence of anti-leishmanial antibodies using a soluble lysate of *Lic* (SLA) or recombinant K39 antigen (kindly provided by Steven G. Reed, Ph.D., Infectious Diseases Research Institute, Seattle, WA) as previously described (22).

The diagnosis of HIV infection was based on the detection of anti-HIV antibodies by ELISA with confirmation by Western blot. The HIV viral load was measured in some cases, and CD4 and CD8 counts were determined. These studies were done in the state clinical laboratory. The diagnosis of AIDS was based on the modified CDC and Rio de

Janeiro-Caracas criteria. In the latter classification a case of AIDS is defined as a subject  $\geq 13$  years of age with HIV antibodies and  $\geq 10$  points in accordance with a scale of signs, symptoms and concurrent conditions associated with AIDS ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)).

Kaposi's sarcoma or disseminated tuberculosis are each graded as 10 points; oral candidiasis or pulmonary tuberculosis or dysfunction of the central neural system are each graded as 5 points; and diarrhea or fever or cachexia or asthenia or anemia are each graded as 2 points. These latter symptoms are also common in symptomatic VL. The term "HIV/AIDS" used in this manuscript refers to subjects who were HIV positive, all of whom met these criteria for AIDS. The Brazilian Ministry of Health currently recommends that all persons suspected of having VL be tested for HIV.

A standardized protocol was developed to record the symptoms, physical findings and diagnostic and other laboratory data as presented in Tables 1-3. The same parameters were assessed whether or not the subjects with VL had concurrent HIV infection. An age-matched group of individuals with VL, made up of subjects with VL and negative HIV who were hospitalized during the study period and subjects followed in a family cohort since 1996 (23), was used for comparison.

### **Prevalence of Leishmania infection in families residing in endemic areas for VL**

We studied members of families residing in the perimetropolitan area of Natal, Brazil, (N=2,224) to estimate the prevalence of Leishmania infection. Family members who consented underwent a physical examination and blood drawing for cell counts and determination of anti-leishmanial antibodies. Leishmania infection status was assessed by quantification of anti-leishmania antibodies and by LST response. Serum antibodies

were quantified by ELISA using a soluble lysate of a local strain of *Lic* (*MHOM/2004/RN02*), (22). The LST test was performed by intradermal injection of 25 µg of *Leishmania* protein provided by the Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, CPPI, (Curitiba, Paraná, Brazil). Skin tests were read after 48 hr and recorded as size of reaction. In addition, the Leishmanin skin test (LST), which assesses delayed type hypersensitivity response to *Leishmania* antigens. Complete information was obtained for 2,120 subjects.

### **Treatment**

The treatment and follow-up for VL and HIV/AIDS were prescribed by the attending physicians. In general patients with HIV/AIDS and VL or VL alone were treated initially with meglumine antimony (Glucantime), 20 mg/kg body weight per day for 28 days administered intravenously. Patients with HIV/AIDS and VL who did not respond to the first course of antimony treatment by symptomatic improvement were treated either with amphotericin B deoxycholate (0.5 mg/kg body weight daily, total dose of 2-3 g) or liposomal amphotericin B (4.0 mg/kg body weight on days 1-5, 10, 17 and 24). Free access to HAART is available in Brazil and was used in the treatment of persons who had HIV infection. Patients with HIV/AIDS and VL who responded clinically with amelioration of symptoms were discharged, evaluated monthly, and received prophylactic amphotericin B deoxycholate (0.5mg/kg body weight per month). They were asked to return earlier if they developed symptoms.

### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed using STATISTICA release 6.1 (StatSoft, USA). Box-Plot analysis was performed to determine the presence of outliers. *One Way* ANOVA was used to assess differences in anti-leishmanial antibody titers between groups. Chi-square was used to test for a relationship between qualitative variables in contingency tables. Spatial regression analysis was performed to compare sites of reported cases of VL and AIDS. The nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA test was used to compare the median age among the different groups.

### **Ethical considerations**

The protocol was reviewed and approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP-UFRN 19-01 and CEP-UFRN 172-06) and by the National Committee of Ethical in Research (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, CONEP 4572 and CONEP 13745, CAAE 0139.0.051.069-06). All participants or their legal guardian read and signed the informed consent.



## Results

### 1. Characteristics of VL-HIV positive cases

Seventeen cases of concurrent VL and HIV/AIDS were documented in Rio Grande do Norte between 1990 and 2008. All 17 patients met the modified AIDS criteria summarized above. Since VL alone can be associated with fever, weight loss and asthenia and could affect the clinical diagnosis of AIDS, we elected to report these patients as “HIV/AIDS”. HIV infection was attributed to sexual transmission in all cases, but the illicit use of intravenous drugs could not be excluded. Tables 1 and 2 summarize the clinical and laboratory findings and outcomes.

The diagnoses of HIV/AIDS and VL were made concurrently in 7 cases; the diagnosis of HIV preceded that of VL in 7 cases; and the diagnosis of VL preceded HIV in 3 cases (Table 2). In persons who were diagnosed initially with VL, the recognition of HIV infection occurred within  $1.6 \pm 0.5$  (S.D.) years. Those with an initial diagnosis of HIV/AIDS developed VL within  $3.4 \text{ year} \pm 1.7$  (S.D.). The mean age of patients with combined diseases was  $37.3 (\pm 6.6)$  years; 15 of 17 were males (Table 1). This is in contrast with the lower mean age of subjects with VL but without concurrent HIV infection, that although age has increased in the last 8 years, is still significantly lower ( $p < 0.0001$ ). Patients with concurrent HIV/AIDS and VL had a mean CD4 count of 86 cells/mm<sup>3</sup> (range 2 to 297 cells/mm<sup>3</sup>) compared to a mean 1,257 cells/mm<sup>3</sup> in those with VL alone (data not shown). The symptoms and laboratory findings (Tables 1 and 2) in patients with concurrent disease differed in several ways from age-matched adult patients with VL alone (Table 3). Co-infected persons had lower anti-leishmanial antibody titers

than those with VL alone, as measured by ELISA using soluble leishmania antigen (SLA) ( $p < 0.01$ ) and rK39 ( $p = 0.03$ ). Only one of the two assays was positive in three persons. Three other co-infected persons lacked detectable anti-leishmanial antibodies in both assays; the diagnosis of VL was based on a positive bone marrow aspirate in those cases. At the end of treatment, the hemoglobin, total WBC count and platelets were lower in the HIV/AIDS and VL group than in the VL alone group. Patients with HIV/AIDS co-infection received monthly amphotericin B prophylaxis, but relapses occurred even in the setting of prophylactic therapy. The relapse rate was high in the HIV-co-infected group; 6 of 17 patients relapsed after clinically successful treatment for VL. VL relapse occurred in a mean of  $1.42 \pm 1.16$  years (range 4 months to 5 years) after the last treatment for VL. All subjects with HIV/AIDS were discharged on HAART, but compliance varied. The mortality of co-infected persons was 23.4% (4 out of 17). Physical findings that associated with progression to death were jaundice, present in 50% of those who died versus 0% in those that lived ( $p = 0.044$ ), and increased liver size,  $9.5 \pm 2.5$  cm below the right costal margin in those that died versus  $4.5 \pm 4.8$  cm in subjects who lived ( $p = 0.01$ ).

## **2. Distribution of Visceral Leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil.**

Once predominantly a sporadic rural disease in Rio Grande do Norte and elsewhere in northeast Brazil, VL now occurs predominantly in periurban areas of major cities. The number of municipalities reporting VL in the state of Rio Grande do Norte has increased as shown in Figure 1. The number of VL cases is greater in more populated cities. Approximately 60% of the cases have occurred in children below age 10 years. Males and females have been equally affected below age 10. Thereafter, the ratio of males to females has been 5 to 1, this relationship has been stable over the years

( $p=0.07$ ). However, the mean and median age of VL has significantly increased over the past 9 years ( $p<0.0001$ ), Figure 2. This was confirmed by nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA test comparing the median age among the different years, ( $p<0.0001$ ).

### **3. Leishmania asymptomatic infection in endemic area for VL**

A total of 2,120 subjects from families residing in endemic area were studied with respect to leishmania infection. Of the studied subjects, 779 (36.7%) were LST positive and 78 (3.7%) were anti-leishmania antibody positive. Of the LST positive subjects, 79 (10.1%) were also antibody positive. An inverse association between the presence of anti-leishmania antibodies and LST was observed ( $p<0.0120$ ).

## Discussion

The data presented in this manuscript indicate that VL and HIV/AIDS co-infection has emerged in northeastern Brazil. Individuals with co-infection differed substantially from those with VL alone. Co-infected persons were adults with an average age of 37.3 years whereas American VL typically occurs in children. Of note, 41% of co-infected persons had a previous history of clinically apparent VL, suggesting that their current VL symptoms may have been due to relapse in the setting of HIV/AIDS. However, re-infection by sand fly bite or by occult intravenous drug use could not be excluded. The mean CD4 count in co-infected patients was very low (mean of 86 cells/mm<sup>3</sup>) consistent with advanced HIV infection. Diarrhea was common (41%). In contrast splenomegaly was less frequent (82%) than in persons with VL alone. Anemia, leukopenia, thrombocytopenia, hypoalbuminemia and hypergammaglobulinemia were prevalent in both co-infected individuals and patients with VL alone. Anti-leishmanial antibody titers were lower in co-infected than in persons with VL alone. Indeed, anti-leishmanial antibodies were undetectable using two conventional assays in three co-infected persons. The rates of relapse and death were higher in co-infected persons than in those with VL alone.

Since the mid-1980s, VL has been recognized as a complication of HIV/AIDS in southern Europe (24). The epicenter of the epidemic has been Spain, but cases have been reported from Portugal, southern France, Italy and sporadically from other countries in the Mediterranean littoral. *L. infantum* has been the etiology. The predominant zymodeme has been MON-1, but there has been an array of isolates including some zymodemes associated with cutaneous disease and others that were not previously known

to be human pathogens (25;26). Studies of the parasite genomes have indicate that *Lic*, which has been isolated from persons with VL in northeastern Brazil, is nearly or exactly identical to *L. infantum* (4;27) Although a full assessment of the responsible zymodemes in Brazil awaits further study, it was logical to hypothesize that HIV/AIDS would predispose persons infected with *Lic* in Brazil to develop symptomatic VL.

There are similarities between the characteristics of VL in co-infected persons with HIV/AIDS in southern Europe and those in Brazil. More than 80% of those with dual infection are males between 20 and 50 years in both areas (1). VL tends to occur late in HIV infection with CD4+ cells frequently  $<200/\text{mm}^3$ . The findings at presentation include fever, weight loss, hepatomegaly, splenomegaly and cytopenias as is the case with VL unassociated with HIV. In our study and in southern Europe, a subset of persons with combined infection lacked splenomegaly; anti-leishmanial antibody titers were lower or undetectable; and relapses of VL and death were more common than in patients with VL in the absence of HIV. Atypical presentations of VL with pulmonary findings have been reported in persons with concurrent HIV/AIDS, but such cases have been relatively infrequent in Europe (1) and were not encountered in the 17 Brazilian cases reported herein.

There is an important difference between the sites. In northeastern Brazil, more than 40% of co-infected persons had a previous history of VL, whereas in Spain, intravenous drug use appears to be a common route of transmission of both HIV and *L. infantum* (25). In this series sexual exposure seems to be the most likely explanation for acquisition of HIV and sand flies for *Lic*.

Liposomal amphotericin is the US FDA-approved treatment for VL (28). The pentavalent antimonials, glucantime and stibogluconate, are alternatives in areas such as northeastern Brazil where pentavalent antimony resistance is still uncommon. Relapses of visceral leishmaniasis were common in our study of HIV/AIDS co-infected individuals, but were uncommon in those with VL alone. HAART was initiated in all of the patients with co-infection, but data on compliance were not available. Recurrent VL has been documented in persons with co-infection who were receiving HAART in Europe. Intermittent therapy with amphotericin B or pentavalent antimony has been proposed as a means of reducing relapses in this population. The value of intermittent therapy for Brazilian patients has not yet been assessed in a controlled manner.

Before the introduction of HIV, American VL due to *Lic* was predominantly a disease of children. Prospective studies in Natal indicated that 60% of cases occurred in children < 10 years of age; only 10% of cases were reported in persons over the age of 30 years. However, more recently in the state of Rio Grande do Norte, where Natal is located, an increase in the age of VL cases has been observed, even in the non-HIV subjects, even in the absence of HIV/AIDS co-infection. This increase in age of VL cases has also been noted in newly endemic areas of the state (unpublished data).

Asymptomatic infections due to *Lic* are common with a reported ratio of asymptomatic to symptomatic cases of 6 - 8:1 in children (13;15), and even higher ratio of 18:1 in adults (15). In those infected with *Lic* but not HIV/AIDS, male and female children develop VL at comparable rates. After age 10 years, however, VL is predominant in males.

The documentation of concurrent HIV/AIDS and VL in Rio Grande do Norte suggests that the epidemiology of Brazilian *Lic* infection is once again evolving. Initially,

VL was encountered as a sporadic disease in rural areas of northeastern Brazil. Since the mid-1980s, a number of major peri-urban outbreaks have been reported from Natal and other cities in the northeast (7;8). Concurrently, the highest incidence of HIV infection has typically been in urban centers, beginning in the south of Brazil and extending to the northeast (29). The two infections have come to overlap. The finding that the prevalence of Leishmania infection is high in endemic areas of VL is of worry, considering that there does not appear to be sterile immunity with *Lic* infection (17;18). Therefore people with asymptomatic, self resolving *Lic* infection may be at risk of developing VL later if there is a loss of T cell function due to HIV/AIDS. The high rate of asymptomatic Leishmania infection in periurban areas of Northeast Brazil, illustrated by the findings described herein, indicates that a large number of people might at risk of developing VL if there is immunosuppression. In addition, *Lic* appears to be spreading to new areas of Brazil, indicating the potential that more cases of VL might evolve with co-morbidities, such as AIDS, neoplasia or in persons who undergo transplant. Whereas 20 years ago VL was primarily a disease of the northeast, now only 60% of human cases are reported in the Northeast whereas the remaining 40% are occurring in other regions of the country (30).

Continued surveillance in Natal and elsewhere in Brazil will be important to assess the evolving impact of concurrent HIV/AIDS and VL, as the number of people with asymptomatic infection residing in areas with HIV is wide. Furthermore, as health care becomes more accessible there are increased numbers of subjects receiving treatments that lead to suppressed cellular immunity. For instance, the numbers of solid organ transplants and the numbers of patients with malignancy requiring chemotherapy are increasing. All adult patients diagnosed with VL should be tested for concurrent

HIV. Conversely, individuals with either HIV infection or another cause of immunocompromise should be considered at risk for VL, if they reside in the Northeast or another region with endemic *Lic*. HIV infection is spreading in northeast Brazil where *Lic* has been endemic for years. Conversely, *Lic* infections are spreading to southern and central regions of Brazil where HIV is well established and IV drug use more common. We suggest that concurrent HIV/AIDS and VL is likely to emerge with increasing frequency in the future. It would be wise to anticipate VL may infect individuals with immunocompromise of any etiology, if they reside in regions of Brazil with established or emerging endemic *Lic* infections



## Acknowledgements

We thank the staff of the Hospital Giselda Trigueiro for the availability and review of patients' diagnosis and Sr. Manoel G. Fernandes (FUNASA) for his help in the field work studies.

**Funding:** This work was funded in part by grants from the US National Institutes of Health [AI030639 (SMBJ, MEW) and AI076233 (MEW, JMB)] and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Conflicts of interest:** None of authors present any conflict of interest.

**Ethical approval:** The protocol was reviewed and approved by Universidade Federal do Rio Grande do Norte Ethical Committee. All participants or legal guardian read and signed the informed consent.

## Legends to the figures

Figure 1. Box plot analysis of the cumulative incidence of VL per 100,000 people in the state of Rio Grande do Norte grouping the cases of VL per 5 year period indicating a spread of areas reporting VL.

Figure 2. The mean age of VL in Rio Grande do Norte, a total of 2,724 cases of VL diagnosed between 1990 and 2009 is shown. An increase in age is observed after the year 2000.

## References

1. Montalban C, Calleja JL, Erice A, Laguna F, Clotet B, Podzameczer D, et al. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the Study of Leishmaniasis in AIDS. *J Infect* 1990, 21:261-70.
2. Alvar J, Gutierrez-Solar B, Pachon I, Calbacho E, Ramirez M, Valles R, et al. AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clin Dermatol* 1996, 14:541-6.
3. Daher EF, Fonseca PP, Gerhard ES, Silva Leitao TM, Silva Junior GB. Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and hiv co-infection in fifteen patients from Brazil. *J Parasitol* 2009, 95:652-5.
4. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 1999, 119:237-46.
5. Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000, 95:583-8.
6. Momen H, Grimaldi JG, Deane LM. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987, 82:447-8.
7. Costa CH, Pereira HF, Araujo MV. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piaui, Brazil, 1980-1986]. *Rev Saude Publica* 1990, 24:361-72.
8. Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:386-8.
9. Genaro O, da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, et al. Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990, 23:121.
10. Camargo-Neves VL, Katz G, Rodas LA, Poletto DW, Lage LC, Spinola RM, et al. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Aracatuba, Sao Paulo, Brazil, 1998-1999. *Cad Saude Publica* 2001, 17:1263-7.

11. Salomon O, Sinagra A, Nevot M, Barberian G, Paulin P, Estevez J, et al. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103:109-11.
12. Andrade AM, Queiroz LH, Perri SH, Nunes CM. A descriptive profile of the canine population in Aracatuba, Sao Paulo State, Brazil, from 1994 to 2004. *Cad Saude Publica* 2008, 24:927-32.
13. Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992, 166:1124-32.
14. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1994, 152:5949-56.
15. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986, 154:1003-11.
16. Dereure J, Duong TH, Lavabre-Bertrand T, Cartron G, Bastides F, Richard-Lenoble D, et al. Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure. *J Infect* 2003, 47:77-81.
17. Mendonca MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004, 189:1018-23.
18. Badaro R, Carvalho EM, Rocha H, Queiroz AC, Jones TC. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet* 1986, 1:647-9.
19. Moreira Junior ED, Silva N, Brites C, Carvalho EM, Bina JC, Badaro R, et al. Characteristics of the acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 48:687-92.
20. Silva MT, Araujo A. Highly active antiretroviral therapy access and neurological complications of human immunodeficiency virus infection: impact versus resources in Brazil. *J Neurovirol* 2005, 11 Suppl 3:11-5.
21. Daher ED, Fonseca PP, Gerhard ES, Silva Leitao TD, Silva Junior GB. Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in 15 patients from Brazil. *J Parasitol* 2008, 2:1.

22. Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002, 67:344-8.
23. Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis* 2004, 36:443-9.
24. Laguna F, Adrados M, Alvar J, Soriano V, Valencia ME, Moreno V, et al. Visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997, 16:898-903.
25. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den BM, Canavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008, 21:334-59
26. Pintado V, Lopez-Velez R. Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001, 19:353-7.
27. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G, Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, 93:663-8.
28. Pearson RD, Jeronimo SM, Lareau SM. US Food and Drug Administration Approval of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Visceral Leishmaniasis: A Model for Orphan Drug Development. *Curr Infect Dis Rep* 1999, 1:415-6.
29. Garrison J. AIDS and the impoverished population in Brazil *Desarro Base* 1988, 12:43.
30. Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 2008, 24:2959-63.

Table 1: General aspects and clinical outcome of patients with HIV/AIDS and VL co-infection.

Patient	Year diagnosis	Age	Gender	Bone-marrow aspirate	Anti-SLA Ab	Anti-rK39 Ab	HAART	CD4 cells count	Viral load	Previous VL	Death	Relapse
1	1990	32	M	+	+	+	-	NA <sup>3</sup>	NA	-	+	-
2	1995	43	M	+	+	+	+	61	480	+	-	+
3	1998	53	M	+	+	+	+	14	300,000	+	-	-
4	1998	43	M	+	+	+	+	2	NA	-	-	-
5	1999	32	M	+	+	+	+	96	>Max Limit <sup>2</sup>	+	+	+
6	1999	35	M	+	-	-	+	31	nd	+	-	-
7	1999	33	M	suggestive	+	+	-	297	52,000	-	-	+
8	2000	35	M	+	-	-	-	58	99,000	-	-	-
9	2003	41	F	+	-	+	-	25	NA	-	-	+
10	2004	32	F	+	-	+	-	38	>Max Limit <sup>2</sup>	-	-	-
11	2005	32	M	+	+	+	-	NA <sup>3</sup>	nd	+	+	-
12	2006	29	M	+	-	-	-	14	4,300,000	-	-	-
13	2006	41	M	-	+	+	+	179	300,000	-	-	-
14	2006	46	M	NA	+	+	+	60	<Min Limit <sup>1</sup>	+	-	+
15	2007	42	M	+	-	+	-	31	151,236	-	+	-
16	2008	33	M	+	+	+	-	140	NA	-	-	-
17	2008	32	M	-	+	+	-	249	69	+	-	+

NA = data not available

HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy on admission;  
Anti-SLA Ab: antibody anti Soluble Leishmania Antigen; Anti-rk39 Ab: antibody anti-rk39 antigen.  
<sup>1</sup>Less than 50 copies; <sup>2</sup>More than 5,000,000 copies. <sup>3</sup>Death occurred within in few days

Table 2: Clinical presentation of patients with HIV/AIDS AND VL co-infection at admission

Patient	Fever	Weight loss	Jaundice	HIV diagnosis with respect to VL diagnosis	Bleeding	Diarrhea	Liver (cm)	Spleen (cm)	Hb (g/dL)	Leuco ( $\times 10^3$ )	Platelets ( $\times 10^3$ )	Albumin (g/dL)	Globulin (g/dL)
1	+	+	+	Post HIV	-	-	10	5	8.3	1.7	139	1.7	5.6
2	+	+	-	concomitant	-	+	6	15	7.9	1.6	177	2.71	7.21
3	-	+	-	Post-HIV	-	+	8	0	7.3	1.2	122	2.1	6.9
4	+	+	-	Post HIV	-	-	3	5	7.5	1.4	118	NA	NA
5	+	+	-	Prior to HIV	-	-	12	12	10.1	1	88	4.3	2.5
6	+	+	-	Post HIV	-	-	4	5	8.3	1.5	220	4	1.5
7	+	+	-	concomitant	+	-	5	7	10.2	2.7	91	3.4	4.6
8	+	+	-	Post HIV	-	-	0	0	11.8	7.8	245	NA	NA
9	+	-	-	concomitant	+	-	0	2	9	3.7	199	3.6	4.9
10	+	+	-	Post HIV	+	-	7	- *	6.4	3.8	374	2.5	3.3
11	+	+	-	Prior to HIV	+	+	10	15	7.1	2.2	55	2	5.4
12	+	+	-	concomitant	-	-	0	0	11.5	3.1	130	2.67	4.83
13	+	-	-	concomitant	-	-	7	5.5	11.9	2.5	132	NA	NA
14	+	+	-	Post HIV	-	+	9	6	7,9	1.6	97	NA	NA
15	-	+	+	concomitant	-	+	6	6	10,8	6.2	277	NA	NA
16	+	+	-	concomitant	-	+	3	4	8.7	3.5	137	3	6.8
17	-	+	-	Prior to HIV	+	+	6	8	8.4	1.4	213	1.5	6.4

NA = data not available



**Table 3:** Characteristics of HIV positive or negative patients with VL, matched by age.

	HIV + (n = 17) (%)	HIV – (n = 17) (%)	p value (M-L-chi square)
Age (mean and SD)	37.3 (±6.6)	38.2 (±16.5)	0.8400
Gender			
Male	15 (88.2)	16 (94.1)	0.5419
Female	2 (11.8)	1 (5.9)	
Previous VL			
Yes	7 (41.9)	2 (11.8)	0.0469
No	10 (58.8)	15 (88.2)	
Bone-marrow aspirate			
Positive	15 (88.2)	13 (76.5)	0.0364
Negative	2 (11.8)	4 (23.5)	
Anti-SLA			
TPositive	11 (64.7)	17 (100)	0.0019
Negative	6 (35.3)	0 (0)	
Anti-rk39			
Positive	14 (82.4.9)	17 (100)	0.0349
Negative	3 (17.6)	0 (0)	
Death			
Yes	4 (23.5)	0 (0)	0.0136
No	13 (76.5)	17 (100)	
Relapse			
Yes	9 (52.9)	2 (11.8)	0.0082
No	8 (47.1)	15 (88.2)	

Figure 1

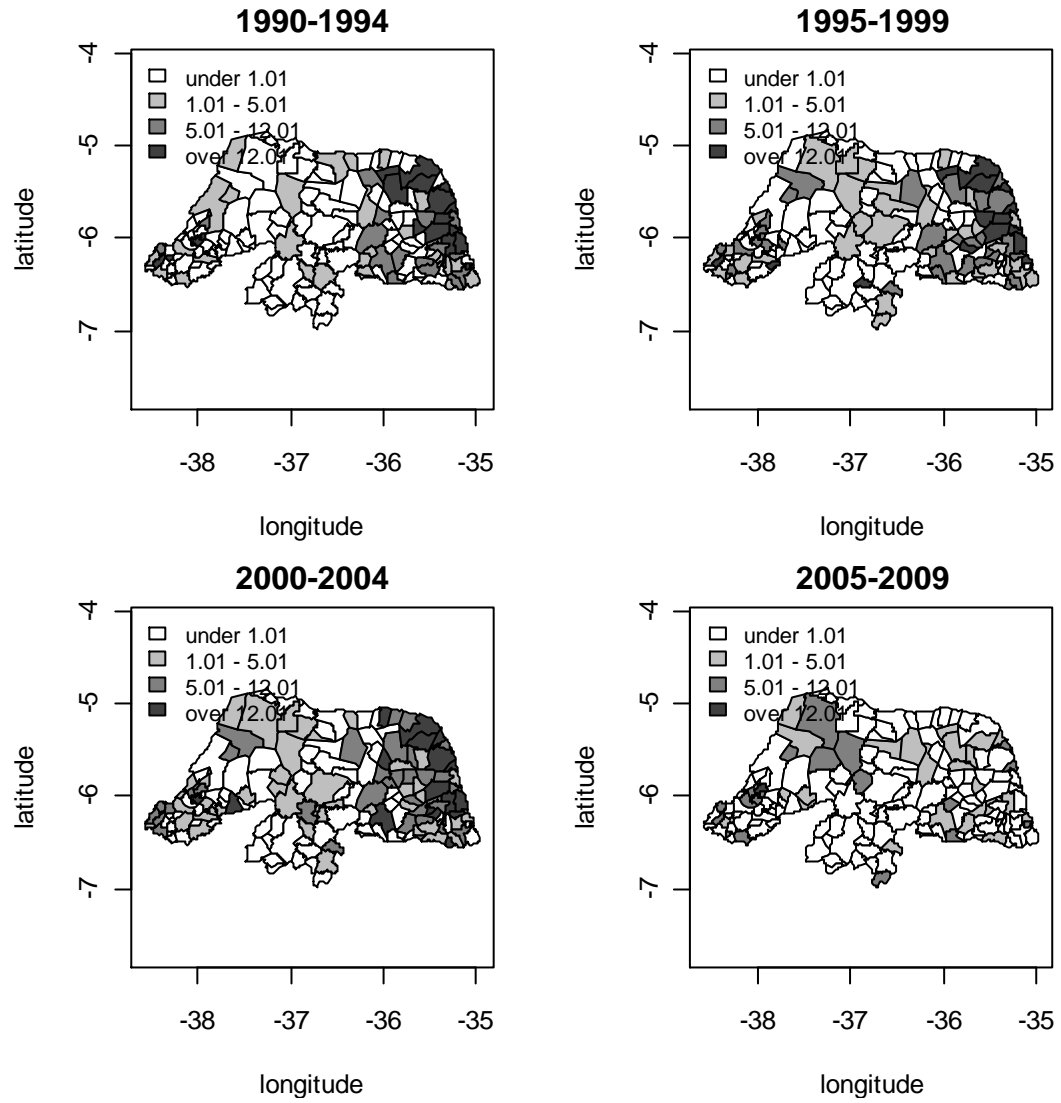
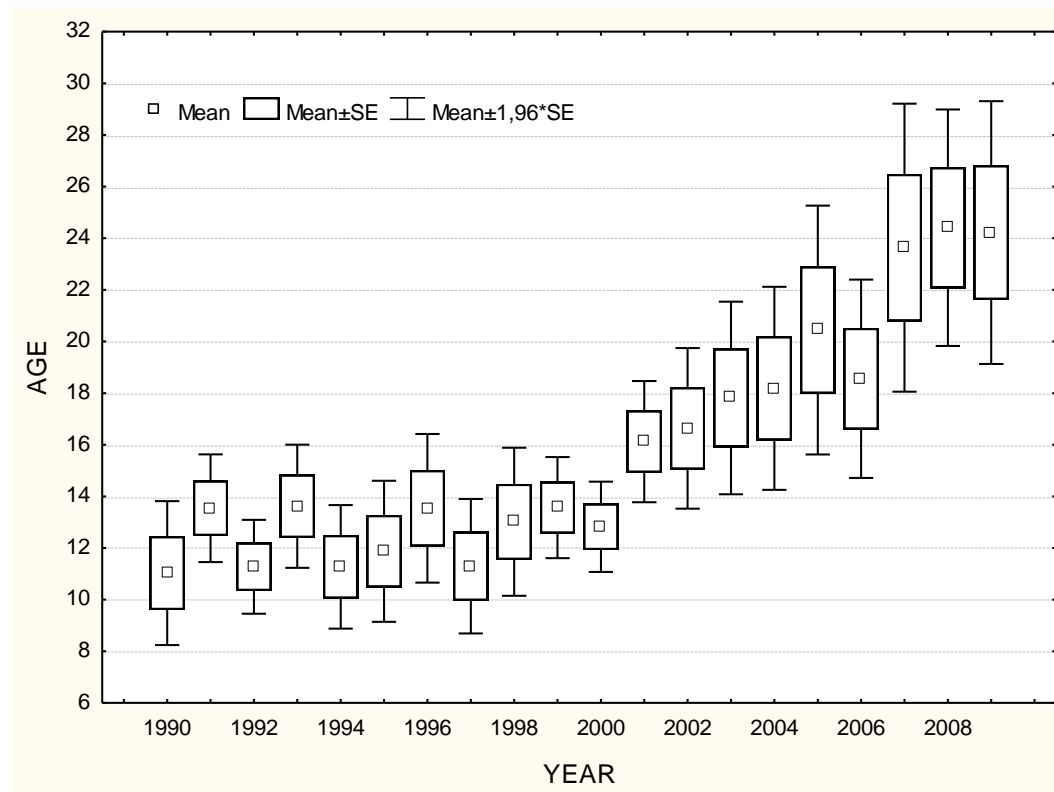




Figure 2





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

May 13, 2010

Transactions of the Royal Society

Dear Editor,

Please find attached the manuscript entitled "The Emergence of Concurrent HIV-1/AIDS and Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil" by Nascimento et al. This manuscript reports the recognition that concomitant to increase in areas reporting visceral leishmaniasis in Brazil, there has been an increase in association with co-morbidity as HIV infection. The concurrence of HIV/AIDS and VL constitutes a change in the epidemiology of disease caused by *Leishmania*. Considering the high prevalence of *Leishmania* infection in the region, this may herald the emergence of an important public health problem in Brazil.

We acknowledge that the enclosed manuscript will not be submitted for publication elsewhere and that there is no conflict of interest by any of the authors. All the authors have read the final version of the manuscript and accept jointly the responsibility for its content. They agreed with this submission and will review any subsequent revisions that might be submitted by the corresponding author.

We are the corresponding author and can be reached at the Departamento de Bioquímica, Centro de Bociências, Universidade Federal do Rio Grande Norte, CP 1624, Natal, RN, 59078-970, Brazil. E-mail: [smbj@cb.ufrn.br](mailto:smbj@cb.ufrn.br). Phone/fax: (55)-84-215-3428.

Selma M.B. Jeronimo, MD, PhD  
Professor,  
Department of Biochemistry

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)