

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

NATÁLIA OLIVEIRA ALVES

**ABORDAGENS GENÔMICA E EPIDEMIOLÓGICA
DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL**

CAMPO GRANDE
2024

NATÁLIA OLIVEIRA ALVES

**ABORDAGENS GENÔMICA E EPIDEMIOLÓGICA
DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL,
BRASIL**

Tese de Doutorado em Doenças
Infecciosas e Parasitárias, orientado pela
Professora Doutora Alessandra Gutierrez
de Oliveira e co-orientação da Professora
Doutora Carla Cardozo Pinto de Arruda.

CAMPO GRANDE
2024



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias
Doutorado

Aos vinte e oito dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e quatro, às treze horas, na sala de videoconferência do Inisa, Bloco 18, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Alessandra Gutierrez de Oliveira (UFMS), João Luís Reis Cunha (York) e Sílvia Naomi de Oliveira Uehara (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **NATÁLIA OLIVEIRA ALVES**, CPF ***.248.481-**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**ABORDAGENS GENÔMICA E EPIDEMIOLÓGICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**" e orientação de Alessandra Gutierrez de Oliveira. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira (Interno)
 Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira (Interno) (Suplente)
 Dr. João Luís Reis Cunha (Externo)
 Dra. Sílvia Naomi de Oliveira Uehara (Externo)
 Dr. Wagner de Souza Fernandes (Externo) (Suplente)

	ASSINATURA	AValiação
		<u>Aprovado</u>

		<u>APROVADO</u>

Documento assinado digitalmente
gov.br JOAO LUIS REIS CUNHA
 Data: 05/11/2024 10:38:15-0300
 verifique em <https://validar.itl.gov.br>

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

A Dra. Sílvia Naomi de Oliveira Uehara não pode comparecer devido à problemas de saúde e o membro suplente Dr. Wagner de Souza Fernandes assumiu a presidência.

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

Dedico esse trabalho a minha família:

A todos os meus mestres, em especial, a minha orientadora e coorientadora;

Aos meus queridos amigos;

Às equipes LAPAH-UFMS, Humap-UFMS/Ebserh e PANGENE-UNESP;

Aos pacientes do Humap-UFMS/Ebserh;

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul;

E a todos os meus colaboradores.

Agradecimentos

À Deus e Nossa Senhora por sempre me trilhar.

Ao meu querido marido Víctor, expresso minha profunda gratidão por seu inestimável companheirismo e dedicação. Agradeço pelos conselhos sábios, pela amizade sincera e pelo carinho constante. Sua presença diária não apenas me ensina e me faz crescer, mas também torna a vida mais bela. Sou imensamente grata por seu apoio incondicional nas minhas escolhas e por seu cuidado, tanto no âmbito intelectual quanto em nosso lar.

Às minhas queridas filhas Catarina e Olívia, expresso minha profunda gratidão por sua compreensão e apoio, permitindo-me dedicar tempo aos meus trabalhos e estudos. Agradeço pelo carinho, amor e pelos momentos de alegria e fofura que compartilhamos. Cada risada e gesto afetuoso de vocês torna minha jornada mais leve e gratificante.

Aos meus pais, Débora, Elias, Joari e Daniela, expresso minha sincera gratidão por todas as oportunidades de aprendizado que me proporcionaram, bem como pelo apoio, dedicação e amor incondicional. Agradeço profundamente por sempre acreditarem em minha capacidade e por me incentivarem a superar meus limites. Joari, sua ausência deixa uma saudade eterna em nossos corações.

Aos meus avós, José Jomer e Sebastiana, expresso minha profunda gratidão por todo o carinho, preocupação e orações constantes. Agradeço pelo apoio inabalável e pelo amor que sempre demonstraram, que foram fundamentais para meu crescimento e bem-estar.

Aos meus tios, Raquel, Harnoldo, Suse, Luís Antônio e José Jomer Júnior, expresso minha sincera gratidão por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem a cada passo. Agradeço profundamente por sua constante presença e suporte. José Jomer, sua memória vive em nossos corações com saudade eterna.

Aos meus irmãos, Arthur, Giulia, Luisa, Diogo e Thiago, agradeço profundamente pela amizade, companheirismo e amor incondicional. O apoio que cada um de vocês oferece são fundamentais para minha vida, e cada momento compartilhado reforça o laço especial que temos.

À Profª. Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira, minha mãe científica, expresso minha profunda gratidão pela oportunidade e pela confiança que depositou em mim. Agradeço com carinho pela orientação, dedicação, paciência e atenção constante, além dos valiosos ensinamentos ao longo de toda a pós-graduação e na realização deste trabalho. Seu apoio e compromisso foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Profª. Carla Cardozo Pinto de Arruda, minha coorientadora e amiga, expresso minha sincera gratidão por suas sábias palavras e pela habilidade com que abordou cada situação. Agradeço profundamente pelo cuidado e apoio constante que me ofereceu, tanto no âmbito acadêmico quanto em minha vida pessoal. Sua orientação foi crucial para meu crescimento e seu compromisso teve um impacto significativo em minha trajetória.

À Profa. Eliane Mattos Piranda, minha estimada parceira e amiga, expresso minha profunda gratidão. Sua presença constante e apoio, tanto no âmbito profissional quanto pessoal, foram verdadeiramente valiosos. Agradeço pelo cuidado e atenção com que sempre me apoiou, seja por meio de palavras encorajadoras ou de gestos de gentileza. Seu carinho e compreensão foram fundamentais em minha trajetória.

Aline Etelvina Casaril Arrua e Jucelei de Oliveira Moura Infran, minhas queridas amigas e irmãs de coração, expresso minha profunda gratidão pelo apoio incondicional que vocês me ofereceram ao longo de minha trajetória. Sem o encorajamento e a confiança de vocês, eu talvez não tivesse iniciado o doutorado. Foram fundamentais, oferecendo apoio, ajuda e compreensão, sempre me ouvindo e me suportando. Seu companheirismo e amizade foram essenciais para meu crescimento.

Aos meus amigos Wagner, Fábio, Matheus, Mariana, Yasmin, Fernanda, Gabriela, Alda e Everton, expresso minha profunda gratidão pelo apoio constante e pela assistência fundamental, tanto intelectual quanto prática, ao longo desta jornada. Agradeço sinceramente pelas enriquecedoras conversas durante nossos cafés e almoços, pelas risadas compartilhadas e por trazer leveza e alegria aos meus dias. Sua amizade e colaboração foram cruciais para a realização deste trabalho e para meu desenvolvimento pessoal.

Aos queridos alunos de iniciação científica Jéssica, Emanuela, Giulia, Mariana (Xuxu), Victória e Yuna, expresso minha profunda gratidão pelo valioso apoio no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelo carinho, confiança e dedicação que demonstraram, tornando a jornada de pesquisa mais enriquecedora e colaborativa. Sua contribuição foi essencial para o sucesso do projeto e para o crescimento deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Parasitologia Humana do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa. Minha gratidão se estende a todos os membros da equipe do "Família Parasito", cujo acolhimento e espírito colaborativo tornaram este ambiente de trabalho não apenas produtivo, mas também cheio de carinho e apoio. Foi um privilégio ter estado em um local onde o trabalho foi realizado com tanto amor e dedicação.

À equipe do Humap-UFMS/Ebserh, em especial a Maina, Gláucia, Adriana, aos enfermeiros e técnicos, pelo auxílio essencial na coleta de dados e amostras. Sou profundamente grato pela prontidão e dedicação com que sempre estiveram disponíveis para ajudar.

Aos colaboradores Dra. Silvia, Dra. Anamaria, Diego, Prof. Paulo, João, Daniel Jeffares, Prof. Everton e Dra. Claudia pelo valioso auxílio, assistência e ensinamentos no desenvolvimento

desta pesquisa. Sou especialmente grato pelas ideias inovadoras e pela disposição constante em oferecer ajuda, que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Ao Laboratório de Pesquisa em Análises Genéticas-PANGENE-UNESP pelo acolhimento e pela oportunidade de realizar parte dos meus experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela valiosa oportunidade de realizar o doutorado, pelo suporte contínuo e pela infraestrutura oferecida ao longo do curso. Agradeço também aos colegas de pós-graduação, cuja amizade e colaboração, além da generosidade em compartilhar conhecimentos, enriqueceram significativamente minha experiência e contribuíram para o desenvolvimento das disciplinas realizadas em conjunto.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDEC) pelo suporte financeiro indispensável, que possibilitou a realização e o desenvolvimento deste trabalho. Seu apoio foi fundamental para o sucesso do projeto.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade concedida a um servidor técnico de realizar o doutorado e desenvolver a pesquisa. Este apoio foi essencial para o avanço acadêmico e a realização deste projeto.

“A sabedoria dos homens é proporcional não à sua experiência, mas à sua capacidade de adquirir experiência.”

George Bernard Shaw

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças infectoparasitárias vetoriais negligenciadas que figura entre as seis endemias prioritárias globalmente. A leishmaniose visceral (LV) destaca-se como a forma mais grave, caracterizada pelo comprometimento sistêmico e crônico com alta letalidade em pacientes imunossuprimidos e em não tratados. Complicações como a Leishmaniose Dérmica Pós-kalazar (PKDL) e a Leishmaniose Dérmica Para-kalazar (Para-KDL) também podem surgir. As regiões tropicais e subtropicais são as mais afetadas, e o Brasil está entre os sete países responsáveis por mais de 90% dos casos de LV, reconhecido como endêmico. Mato Grosso do Sul é uma área endêmica para essa enfermidade, com sua capital, Campo Grande, registrando intensa transmissão. O objetivo deste estudo foi analisar os aspectos epidemiológicos e genéticos de *Leishmania* spp. em pacientes diagnosticados com LV no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Humap-UFMS/Ebserh), bem como relatar casos atípicos de pacientes com LV, incluindo leishmaniose dérmica para-kala-azar (Para-KDL). O estudo foi conduzido entre agosto de 2021 e junho de 2023, em que 127 pacientes foram admitidos no Humap-UFMS/Ebserh com suspeita de LV. Amostras de aspirado de medula óssea (AMO) coletadas na rotina diagnóstica do hospital foram submetidas a exames complementares no Laboratório de Parasitologia Humana do Instituto de Biociências da UFMS (LPH/INBIO/UFMS), incluindo o diagnóstico parasitológico indireto (cultura) e o molecular (reação em cadeia da polimerase - PCR). Dezoito culturas de dezessete pacientes foram estabelecidas e o material genético dos parasitos foi extraído e encaminhado ao laboratório de Pesquisa e Análises Genéticas da Universidade Estadual de São Paulo (PANGENE/UNESP) para sequenciamento de próxima geração (NGS) por meio da plataforma *Miseq Illumina*, seguido de análise dos dados. Além disso, foram coletados dados clínicos e epidemiológicos dos prontuários médicos. O estudo constatou que dentre os 127 pacientes incluídos na pesquisa, 40 foram diagnosticados com LV. Houve uma prevalência significativa de casos entre homens não brancos, com uma média de idade de 39,7 anos. Verificou-se que pancitopenia, tabagismo e lesões cutâneas estão diretamente associadas à doença, sugerindo um aumento potencial no risco de adoecimento por LV. A coinfeção com HIV foi identificada em 33 dos 40 pacientes com LV, e a profilaxia secundária foi mais prevalente entre os casos positivos. Além disso, observou-se uma associação significativa entre a gravidade da doença e a presença de anemia, lesões cutâneas, doenças pulmonares e renais. Três casos se destacaram devido às características clínicas sugestivas de Para-KDL, incluindo febre, hepatomegaliaesplenomegalia, pancitopenia e lesões cutâneas disseminadas. A presença do parasito foi identificada nas lesões cutâneas e no aspirado de medula óssea, confirmando como agente *L. infantum*. As comorbidades, recidiva de LV e regime terapêutico foram descritos e relacionados aos desfechos desses três casos. As análises de NGS das 18 amostras revelaram a presença de *L. infantum* identificada em nove casos, *L. amazonensis* em um caso e a coexistência de *L. amazonensis* e *L. infantum* em oito casos. A gravidade e a presença de comorbidades como o HIV foram mais pronunciadas no grupo com infecção mista. A caracterização do perfil epidemiológico da LV e a identificação das espécies de *Leishmania* e cepas circulantes são elementos fundamentais para a compreensão, monitoramento e capacitação de profissionais de saúde, possibilitando o reconhecimento precoce de sintomas, melhorando o acompanhamento dos pacientes e embasando políticas públicas de combate à doença. Além disso, essas informações também fornecem subsídios para a identificação e intervenção em casos atípicos, como os associados à Para-KDL.

Palavras-Chave: Caso clínico. Leishmaniose Dérmica Para-kalazar. *Leishmania amazonensis*. *Leishmania infantum*. Sequenciamento de próxima geração.

ABSTRACT

Leishmaniasis constitute a group of neglected vector-borne parasitic diseases that are among the six global priorities for endemic diseases. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease, characterized by systemic involvement and high mortality rates in immunosuppressed and untreated patients. Complications such as post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) and para-kala-azar dermal leishmaniasis (para-KDL) may also occur. The majority of cases are concentrated in tropical and subtropical regions, with Brazil being one of the seven countries responsible for over 90% of VL cases and recognized as endemic. Mato Grosso do Sul is an endemic area for this disease, with its capital, Campo Grande, experiencing intense transmission. The aim of this study was to analyze the epidemiological and genetic aspects of *Leishmania* spp. in patients diagnosed with VL at the Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian of the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Humap-UFMS/Ebserh), and to report atypical cases of VL, including Para-KDL. The study was conducted between August 2021 and June 2023, and included 127 patients admitted to Humap-UFMS/Ebserh with suspected VL. Bone marrow aspirate samples collected as part of routine diagnostic procedures at the hospital were subjected to additional tests at the Laboratório de Parasitologia Humana of the Instituto de Biociências da UFMS (LPH/INBIO/UFMS), including indirect parasitological diagnosis (culture) and molecular diagnosis (polymerase chain reaction, PCR). A total of 18 cultures from 17 patients were established, and the genetic material of the parasites was extracted and sent to the Laboratório de Pesquisa e Análises Genéticas da Universidade Estadual de São Paulo (PANGENE/UNESP) for next-generation sequencing (NGS) using the MiSeq Illumina platform, followed by data analysis. Additionally, clinical and epidemiological data were gathered from medical records. The study identified 40 cases of VL among the 127 patients included in the analysis. A notable prevalence of cases was observed among non-white males, with an average age of 39.7 years. Pancytopenia, smoking, and cutaneous lesions were directly associated with the disease, suggesting a potential increase in the risk of VL. Coinfection with HIV was identified in 33 of the 40 VL patients, and secondary prophylaxis was more common among those with a positive HIV status. Moreover, a notable correlation was identified between disease severity and the presence of anemia, cutaneous lesions, and pulmonary and renal diseases. Three cases were of particular interest due to the presence of clinical characteristics suggestive of para-KDL, including fever, hepatomegaly/splenomegaly, pancytopenia, and disseminated cutaneous lesions. The presence of the parasite was confirmed in cutaneous lesions and bone marrow aspirates, with *L. infantum* identified as the causative agent. Comorbidities, VL recurrence, and treatment regimens were described and related to the outcomes of these three cases. NGS analysis of the 18 samples revealed the presence of *Leishmania* species, with *L. infantum* identified in nine cases, *L. amazonensis* in one case, and the coexistence of *L. amazonensis* and *L. infantum* in eight cases. Severity and the presence of comorbidities such as HIV were more pronounced in the mixed infection group. It is of paramount importance to characterize the epidemiological profile of VL and to identify the *Leishmania* species and circulating strains in order to facilitate a comprehensive understanding of the disease, to enable effective monitoring, and to provide training for healthcare professionals. This enables early recognition of symptoms, improved patient follow-up, and supports public health policies to combat the disease. Additionally, this information provides a basis for identifying and intervening in atypical cases, such as those associated with para-KDL.

Keywords: Clinical case. Para-Kala-azar Dermal Leishmaniasis. *Leishmania amazonensis*. *Leishmania infantum*. Next generation sequencing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Doenças Negligenciadas	12
2.2	Leishmanioses	14
2.2.1	Aspectos Gerais.	14
2.2.2	Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> spp.	15
2.2.3	Histórico	19
2.3	Leishmaniose Visceral	19
2.3.1	Aspectos Gerais	19
2.3.2	Epidemiologia	20
2.3.3	Agentes Etiológicos da Leishmaniose Visceral	22
2.3.4	Hospedeiros, Reservatórios e Vetores	23
2.3.5	Diagnóstico	23
2.3.5.1	Diagnóstico Clínico-Epidemiológico	24
2.3.5.2	Diagnóstico Parasitológico	24
2.3.5.3	Diagnóstico Sorológico	25
2.3.5.4	Diagnóstico Molecular	26
2.3.5.4.1	Ensaio Baseado em PCR	26
2.3.5.4.2	Sequenciamento	26
2.3.6	Tratamento	27
2.3.6.1	Profilaxia Secundária Para LV	29
2.3.6.2	Refratariedade ao Tratamento de LV	30
2.4	Caracterização Genética de <i>Leishmania</i> spp.	31
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS	34

4.1	Objetivo Geral	34
4.2	Objetivos Específicos	34
	CAPÍTULO 1	35
	VL-HIV co-infection with <i>Leishmania</i> containing skin lesions resembling para-kala-azar dermal leishmaniasis	36
	CAPÍTULO 2	52
	Perfil Clínico-Epidemiológico de Adultos com suspeita de Leishmaniose Visceral Atendidos no Hospital Referência de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil	53
	CAPÍTULO 3	88
	Análise genômica da coinfeção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmani amazonensis</i> em pacientes humanos com diagnóstico de leishmaniose visceral	89
5	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças infectoparasitárias vetoriais negligenciadas, que se encontra entre as seis endemias prioritárias globalmente. A leishmaniose visceral (LV) é a manifestação clínica mais grave, caracterizada pelo comprometimento sistêmico e crônico, com alta letalidade em pacientes imunossuprimidos e não tratados. Podem ocorrer complicações, como a Leishmaniose Dérmica Pós-calazar (PKDL) e a Leishmaniose Dérmica Para-Calazar (Para-KDL).

A LV é uma enfermidade negligenciada de grande importância em saúde pública por estar associada à desnutrição, ao deslocamento populacional, às alterações antrópicas, às condições precárias de habitação, ao sistema imunológico deficiente e à falta de recursos médicos e preventivos eficazes. Além desses fatores, os fármacos recomendados para o seu tratamento apresentam toxicidade, podendo gerar reações adversas, e o insucesso da cura clínica acarreta altos gastos para os cofres públicos e ao próprio indivíduo. Sendo assim, trabalhos que contribuam para aumentar a eficiência no diagnóstico, na prática clínica e no tratamento da LV, se mostram de grande valia.

A persistência dos casos de LV em focos endêmicos podem ser atribuídos tanto à resistência aos tratamentos atuais quanto às variações genéticas ocorridas no parasito. Estas variações genéticas podem ocorrer devido ao intenso estresse imposto pelo uso prolongado de drogas durante os tratamentos.

Assim, torna-se essencial realizar estudos que visem ampliar a compreensão do perfil epidemiológico da LV, bem como identificar e caracterizar molecularmente as cepas de *Leishmania* spp. circulantes em pacientes diagnosticados com LV, especialmente aqueles atendidos em serviços de referência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Negligenciadas

As doenças têm estado presentes desde os primórdios, moldando sociedades, influenciando o curso da história da humanidade, o desenvolvimento e a evolução da ciência, as práticas de saúde pública, bem como a interação entre humanos, animais e o ambiente (BACKES et al., 2009; SHAHEEN, 2022).

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um conjunto de doenças infecciosas, parasitárias, crônicas e debilitantes que afetam substancialmente as populações pobres e vulneráveis no mundo (HOTEZ et al., 2020). Estão presentes principalmente em regiões de zona tropicais, recebem pouca ou nenhuma atenção de investimentos governamentais, farmacêuticos e de pesquisas

científicas (MALECELA; DUCKER, 2021; WHO, 2023).

Segundo a Organização Mundial da saúde (OMS), as DTN consistem em um grupo de 20 doenças com a característica de impacto nas comunidades mais pobres, entre elas estão: úlcera de Buruli, doença de Chagas, dengue e chikungunya, dracunculíase (doença do verme da Guiné), equinococose, trematodíases de origem alimentar, tripanossomíase humana africana (doença do sono), leishmanioses, hanseníase (doença de Hansen), filariose linfática, micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas, oncocercose (cegueira dos rios), podoconiose, raiva, sarna e outras ectoparasitoses, esquistossomose, helmintíases relacionadas ao solo, teníase/cisticercose, tracoma e boubá e outras treponematoses endêmicas (HOTEZ et al., 2020; WHO, 2023b).

A maioria das DTN são causada por agentes que apresentam ciclos de vida complexos, com transmissão vetorial e animais que atuam como reservatórios, fatores que corroboram para dificultar o controle e as ações em saúde pública, tornando-se um desafio para as autoridades (MALECELA; DUCKER, 2021; WHO, 2023b).

As DTN afetam milhões de pessoas em todo o mundo. A OMS estima que mais de 1,7 milhões de pessoas deveriam receber algum tipo de atendimento para essas enfermidades todos os anos. Além disso, essas enfermidades provocam uma alta taxa de morbidade e mortalidade. Sabe-se que anualmente 19 milhões de anos de vida são perdidos por incapacidade (Disability Adjusted Life Years - Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade- DALY) e 200 mil por mortes. Outro fator é o custo para a comunidade, onde se estimam gastos equivalentes a bilhões de dólares americanos a cada ano em direitos à saúde, em perda de produtividade, em redução socioeconômica e em nível educacional. As DTN também são responsáveis, no âmbito individual, por gerar deficiências, estigmatização, exclusão social e discriminação, e ainda por colocar os enfermos e suas famílias em situação de pressão financeira considerável (INCEBOZ, 2019; WHO, 2023b).

Em 2015, as DTN foram incorporadas aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), impulsionando um novo plano para o período de 2021 a 2030. Esta agenda estabelece metas para prevenir, controlar, eliminar ou erradicar 20 doenças e grupos de doenças. Ele se baseia em três pilares principais: acelerar a ação programática, intensificar abordagens abrangentes e reformar os modelos operacionais para uma melhor aceitação pelos países (MALECELA; DUCKER, 2021; WHO, 2020).

A agenda para as DTN está alinhada com a crescente ênfase na cobertura de saúde universal global. Sua base é a busca por um impacto nacional por meio de abordagens transversais lideradas pelos próprios países e apoiadas por colaboração coordenada entre parceiros. Priorizando uma transição gradual, busca reduzir a incidência e prevalência das DTN sem comprometer a capacidade coletiva (MABEY et al., 2021; MALECELA; DUCKER, 2021).

Investimentos gradativos serão empreendidos para apoiar essa transição, abarcando o

financiamento necessário para abordar de maneira sustentável as DTN endêmicas, por meio da análise de estudos de caso em nível nacional. A estrutura de sustentabilidade visa a integração pragmática das DTN nos sistemas de saúde dos países, com rastreamento das contribuições financeiras e não financeiras para garantir transparência. A responsabilização compartilhada entre países parceiros e a Organização Mundial da Saúde (OMS) fortalecerá uma verdadeira parceria para alcançar as metas até 2030 (MALECELA; DUCKER, 2021; SOUZA et al., 2021).

Dentre as dez principais DTN, estão as leishmanioses, grupo de infecções parasitárias vetoriais que afetam várias regiões tropicais e subtropicais, impactando de maneira significativa as populações mais vulneráveis. Essas enfermidades, que incluem diferentes manifestações clínicas, desde a forma cutânea até a visceral, apresentam carência de investimentos em pesquisa, diagnóstico, tratamento e controle, o que contribui para sua persistência e para o desafio constante de reduzir sua incidência e impacto na saúde pública (PAHO/WHO, 2023a; WHO, 2023a).

2.2 Leishmanioses

2.2.1 Aspectos Gerais

As leishmanioses são doenças causadas por várias espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* pertencentes à família Trypanosomatidae e classe Kinetoplastida (ALVAR et al., 2012; LAINSON; SHAW, 2005). Os ciclos de transmissão variam de acordo com a região geográfica, as espécies, os vetores e os reservatórios (AKHOUNDI et al., 2016).

A transmissão do parasito ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos infectadas, as quais alimentaram-se anteriormente em um mamífero infectado. Estão descritas como vetores comprovados ou suspeitos das leishmanioses mais de 600 espécies de flebotomíneos. No Velho Mundo, os gêneros mais relevantes são *Phlebotomus* sp. e *Sergentomyia* sp. (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017), enquanto no Novo Mundo inclui-se *Lutzomyia* sp., *Brumptomyia* sp., *Nyssomyia* sp., *Psychodopygus* sp., *Warileya* sp., *Bichromomyia* sp. e *Trichophoromyia* sp. (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; GALATI; RODRIGUES, 2023).

O padrão de transmissão pode ser zoonótico, com a necessidade de uma espécie de mamífero não humano atuando como reservatório, ou antroponótico, em que o próprio ser humano faz o papel de reservatório (STEVERDING, 2017). Existem outras formas de transmissão menos comuns, como: transfusão de sangue, compartilhamento de agulhas contaminadas e a transmissão vertical de mãe para filho (COHEN et al., 1991; CRUZ et al., 2002; MEINECKE et al., 1999).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios com tropismo por células do sistema imunológico, especificamente por células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas (BATES, 2007; VAN ASSCHE et al., 2011). As diferentes espécies

de *Leishmania* são morfológicamente semelhantes, mas ocasionam formas clinicamente distintas; esse fato resulta da interação parasito-vetor-hospedeiro (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

As três principais formas clínicas da parasitose são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2023). A LC é a manifestação clínica mais comum, causando lesões e úlceras na pele, principalmente em partes expostas do corpo, deixando estigmas ao longo da vida. A LMC causa a destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. A forma clínica mais grave é a LV ou calazar, caracterizada por evolução crônica e envolvimento sistêmico (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Essa apresenta manifestações variáveis como febre persistente e irregular, palidez, esplenomegalia associada ou não a hepatomegalia e, quando não tratada, pode ser fatal (WHO, 2019).

Atualmente, existem no mundo aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem. Dessas, 15 apresentam grande importância nas Américas (Quadro 1) (INCEBOZ, T., 2019; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2019). No Brasil, as espécies com maior importância em saúde pública são *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V) guyanensis* e *L. (L.) infantum* (ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2023).

Quadro 1 - Espécies de *Leishmania* identificadas em humanos e formas clínicas nas Américas.

<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i>
Visceral	Cutânea	Cutânea	Mucosa

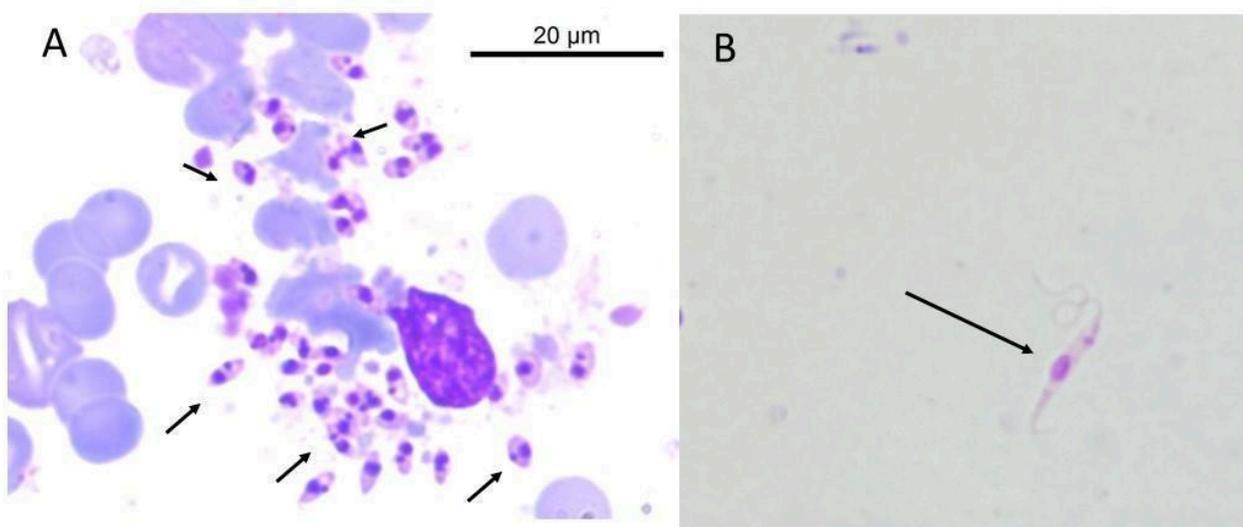
Fonte: Adaptado: (PAHO/WHO, 2019).

2.2.2 Ciclo Biológico de *Leishmania* spp.

O ciclo biológico de *Leishmania* spp. apresenta complexidade por conter diferentes estágios em que o parasito passa por diferenciações morfofisiológicas para completar seu ciclo de desenvolvimento e para a manutenção da espécie (GLUENZ; GINGER; MCKEAN, 2010). Além disso, esses protozoários são parasitos de ciclo heterexeno, envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados (vetores), que são os flebotomíneos (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

As espécies do gênero *Leishmania* apresentam duas principais formas evolutivas: amastigota e promastigota. A amastigota exibe um aspecto arredondado, com presença do cinetoplasto localizado próximo ao núcleo e flagelo interiorizado (Figura 1A). Estas formas estão presentes dentro de células do sistema fagocítico mononuclear no hospedeiro vertebrado. As promastigotas, presentes no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, são caracterizadas por apresentarem flagelo livre, com cinetoplasto localizado entre o núcleo e a extremidade anterior, exibindo morfologia alongada (Figura 1B) (BATES, 2007; GLUENZ; GINGER; MCKEAN, 2010).

Figura 1 - Formas evolutivas de *Leishmania* sp. A: Forma amastigota em aspirado de medula óssea de humano. B: Forma promastigota em meio de cultura.



Fonte adaptada: A. (Alves et al. 2024). B. Atlas Virtual de Parasitologia Humana (<https://sites.google.com/ufms.br/atlasparasitologiaufms>).

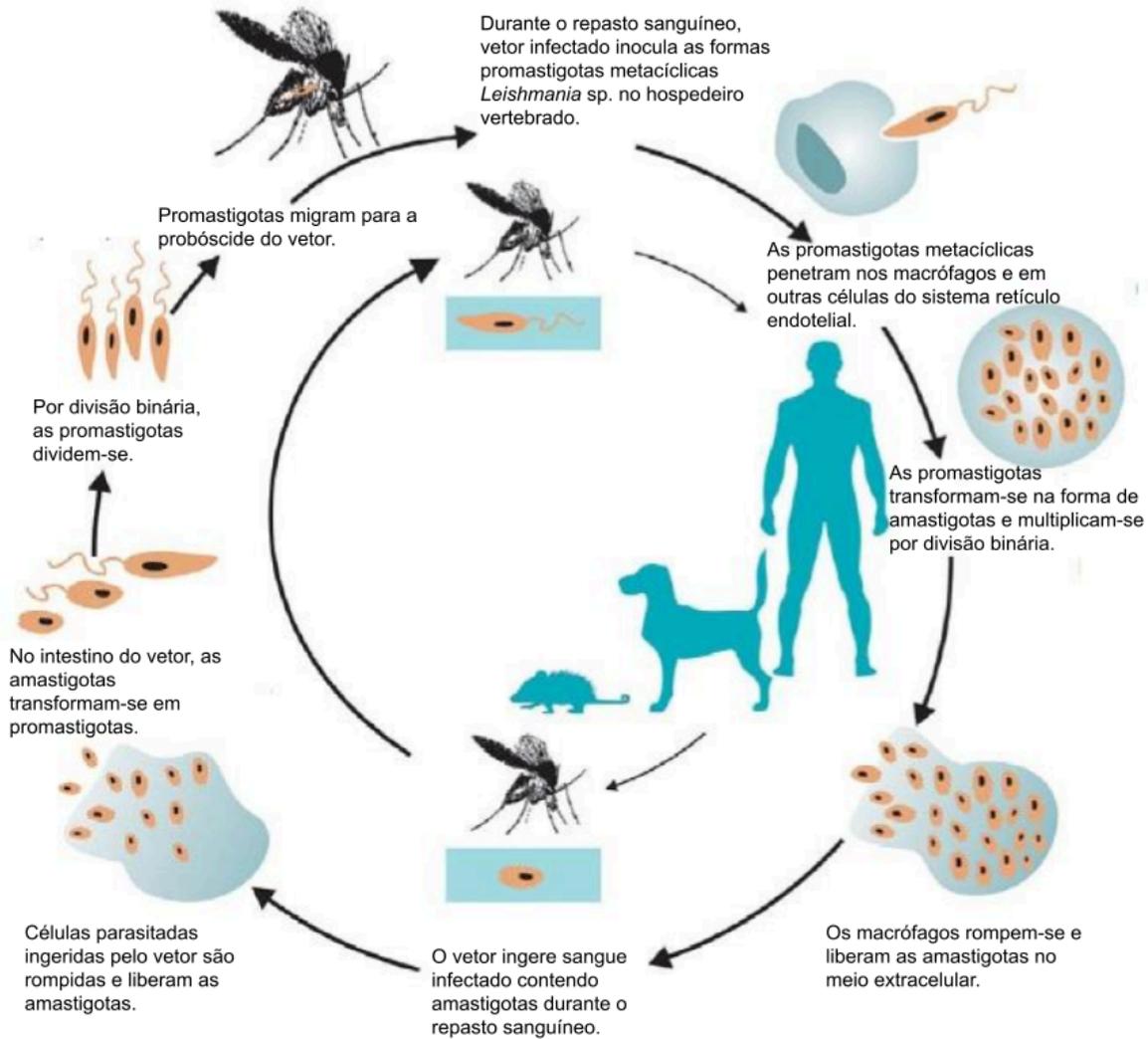
A infecção do hospedeiro invertebrado por *Leishmania* spp. ocorre durante o repasto sanguíneo em um vertebrado infectado, quando são ingeridas as formas amastigotas. No trato digestivo do inseto, as amastigotas sofrem diferenciação e transformam-se em promastigotas. Após sucessivas etapas de divisão e migração para o intestino médio anterior, as promastigotas se tornam formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (promastigotas metacíclicas). Adaptadas para uma transmissão bem-sucedida, as promastigotas metacíclicas fixadas à válvula estomodeal do inseto são inoculadas durante a telmofagia, quando um novo hospedeiro vertebrado, então, é infectado (BATES, 2007).

No hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são internalizadas por macrófagos, originando o vacúolo parasitóforo e se diferenciando em amastigotas. O ambiente dentro do vacúolo é ácido, mas as amastigotas conseguem sobreviver e proliferar até romper a célula parasitada, invadindo novas células. As amastigotas liberadas iniciam uma cadeia de infecções levando às manifestações clínicas, as quais estão relacionadas ao tropismo por diferentes tipos de

células do sistema imune, variando de acordo com a espécie de *Leishmania* e com a resposta do hospedeiro envolvido (DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

A Figura 2 representa um esquema ilustrativo do ciclo biológico da *Leishmania*.

Figura 2 - Ciclo Biológico de *Leishmania* spp. nas Américas.



Fonte adaptada: (PAHO/WHO, 2019).

2.2.3 Histórico

A origem do gênero *Leishmania* está documentada em dois fósseis de flebotomíneos, um encontrado em uma fêmea ingurgitada de *Palaeomyia burmitis* e o outro em *Lutzomyia adiketis*. Ambos insetos estavam preservados em âmbar, com idades estimadas em 100 milhões e 20 a 30 milhões de anos, respectivamente (POINAR; POINAR, 2004; STEVERDING, 2017). A origem geográfica das diferentes espécies ainda é muito discutida e três hipóteses principais foram propostas (STEVERDING, 2017).

Na hipótese supercontinental, o gênero *Leishmania* evoluiu na era Mesozóica antes da separação da Pangea (THOMAZ-SOCCOL et al., 1993).

A hipótese Paleártica sugere que *Leishmania* sp. teve origem na região Paleártica, que inclui a Europa, a Ásia ao norte do Himalaia, o norte da Arábia e a África ao norte do Saara, no período Paleoceno, 66-56 milhões de anos atrás (KERR, 2000; STEVERDING, 2017).

A hipótese Neotropical propõe que *Leishmania* sp. pode ter sido introduzido durante o Mioceno (23-5,33 milhões de anos atrás) na região Neotropical, antes do levantamento do istmo do Panamá. Esse fato pode explicar a maior diversidade de *Leishmania* sp. no Novo Mundo em comparação ao Velho Mundo, devido às mudanças climáticas e a adoção de novos hospedeiros pelo vetor (LAINSON; SHAW, 1987).

A LV foi observada pela primeira vez em 1885 na Índia pelo médico escocês David Douglas Cunningham (BASANO; CAMARGO, 2004). No ano de 1900, William Leishman – patologista inglês que havia servido na Índia pelo exército britânico – observou em um esfregaço de um soldado formas ovoides e, assim, propôs que tais formas estavam relacionadas à tripanossomíase. Algum tempo depois, Charles Donovan fez a mesma observação em autópsias de nativos indianos. No entanto, apenas em 1898, foi chegada a conclusão – pelo médico Ronald Ross - de que as parasitos descobertos por Leishman e Donovan eram protozoários (STEVERDING, 2017).

O primeiro caso de LV relatado no continente americano foi em 1911, no Paraguai, em um indivíduo proveniente do município de Corumbá, Mato Grosso (atual Mato Grosso do Sul). O paciente era um imigrante italiano que havia trabalhado na construção da Ferrovia São Paulo-Corumbá (MIGONE, 1913).

Em 1934, emergiu a primeira evidência definitiva da doença no Brasil, descrita por Henrique Penna, patologista do Instituto Oswaldo Cruz (PENNA, 1934). Por muitos anos, a LV manteve-se restrita à região nordeste do país, sendo considerada uma zoonose esporádica de caráter silvestre ou rural, que atingia homens e cães que viviam ou entravam em contato direto com esses ambientes (ALENCAR, 1962; DEANE; DEANE, 1954). Na década de 1980, a doença emergiu em áreas urbanas e periurbanas de outras regiões do país, como o Sudeste, Centro-Oeste e Sul, devido às modificações socioambientais e ao êxodo rural, às mudanças ambientais e climáticas, à ação antrópica, conseqüente, à adaptação do vetor (BRAZIL; BRAZIL, 2003; COSTA; PEREIRA;

ARAÚJO, 1990).

2.3 Leishmaniose Visceral

2.3.1 Aspectos Clínicos

A leishmaniose visceral (LV) representa a forma clínica mais grave do grupo das leishmanioses, pois quando não tratada pode levar à morte. Caracteriza-se como uma doença crônica, com amplo espectro clínico, podendo apresentar quadros leves, moderados e graves. O período de incubação é de duas semanas a 18 meses. A fase aguda da doença pode se manifestar com reações inflamatórias graves, desenvolvendo-se de dois a oito meses após a infecção, e quando crônica, os sintomas da LV podem levar anos para aparecer. A parasitose expressa um caráter progressivo com taxa de letalidade de 75% a 95% quando não tratada; a morte ocorre dentro de dois anos de infecção, mas em algumas situações pode ocorrer cura clínica espontânea (READY, 2014).

O parasito tem preferência por células do sistema fagocitário mononuclear, mais frequentemente macrófagos, afetando principalmente, linfonodos, baço, fígado, medula óssea e, menos comumente, rins, tecido linfóide associado ao intestino humano (*GALT -Gut-associated Lymphoid Tissue*), pulmões e pele. A infecção pode ser assintomática e, quando sintomática, os sinais são inespecíficos, facilmente confundidos com diferentes processos infecciosos (PAHO/WHO, 2019; PEDROSA, CELIA M. S., 2017; SAGAERT et al., 2012).

As manifestações clínicas mais comuns da LV incluem febre persistente e irregular, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, pancitopenia, fraqueza, hipergamaglobulinemia e perda de peso. A alta carga parasitária pode gerar como consequência a desnutrição aguda ou emagrecimento, especialmente em indivíduos com coinfeção HIV/LV e em crianças menores de cinco anos, embora não esteja claro se esse efeito é uma causa ou consequência do estado nutricional deficiente (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A LV em pacientes imunossuprimidos pode se manifestar de forma atípica alterando todos os sistemas orgânicos, como é relatado em casos de coinfeção com HIV. Nesses casos, são observados um maior envolvimento de sinais clínicos gastrointestinais, diarreia, manifestações cutâneas, além dos sinais e sintomas comuns a LV mais exacerbados. Outrossim, os coinfectados pelo HIV apresentam maior taxa de letalidade, possibilidade de falha do tratamento inicial e recidivas devido ao curso crônico da doença (HURISSA et al., 2010; JARVIS; LOCKWOOD, 2013).

Em áreas endêmicas, a infecção pelo HIV aumenta o risco de desenvolver LV em 100 a 2.320 vezes. Ambas infecções mudam a resposta imunológica predominantemente celular de Th1 para Th2 através de mecanismos complexos mediados por citocinas, levando a um efeito sinérgico prejudicial à resposta imune celular. Isso pode levar à progressão da clínica nos indivíduos

infectados pelo HIV, desenvolvendo condições definidoras de AIDS (JARVIS; LOCKWOOD, 2013; SHANKAR et al., 2009).

A LV também pode se expressar em duas complicações conhecidas como Leishmaniose Dérmica Pós Kala-azar (PKDL) e Leishmaniose Dérmica Para-kala-azar (PARA-KDL), comuns em áreas endêmicas (ZIJLSTRA, 2019).

A PKDL é uma doença dermatológica que pode levar à estigmatização. Os sintomas da PKDL geralmente surgem em seis meses a vários anos após a aparente remissão clínica da LV. A PKDL é identificada pela presença de lesões cutâneas maculares, papulares ou nodulares nas quais os parasitos *Leishmania* sp. podem ser visualizados na biópsia. A lesão se inicia na região do rosto, ao redor da boca e pode se espalhar para outras partes do corpo (WHO, 2019; ZIJLSTRA et al., 2003).

A PKDL está associada à coinfeção HIV/LV, sendo mais frequente e grave nesse grupo, predominantemente caracterizada por lesões múltiplas, não ulcerativas, principalmente nodulares, com parasitos abundantes na lesão, muitas vezes com distribuição e evolução atípicas (ZIJLSTRA, 2014).

Quando distúrbios dermatológicos ocorrem simultaneamente com LV ativa, eles resultam em uma forma clínica intermediária denominada como Para-KDL (MONIRUZZAMAN et al., 2023). As manifestações clínicas são uma combinação das condições clinicopatológicas de LV e PKDL em pacientes com Para-KDL, que apresentam um histórico de febre por semanas ou meses e sintomas constitucionais como perda de peso, fraqueza, hepatoesplenomegalia, anemia e erupção cutânea plana hipopigmentada (macular), combinada com erupção cutânea levemente elevada (maculopapular) ou elevada (nodular) (MARUF et al., 2023; ZIJLSTRA et al., 2003).

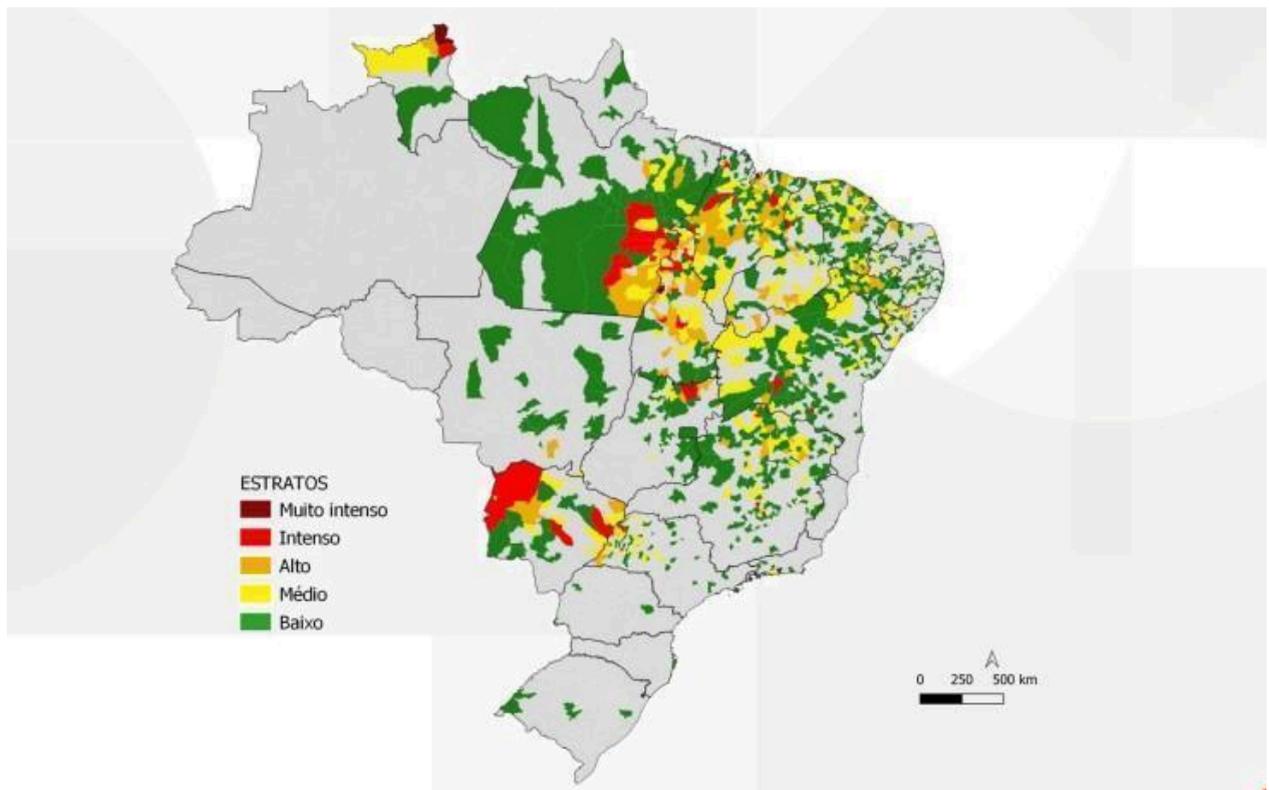
2.3.2 Epidemiologia

A LV é uma morbidade negligenciada distribuída em todos os continentes, exceto na Oceania e na Antártida, sendo endêmica em 70 países (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Segundo a OMS, os casos de LV são subnotificados, estimando-se que a cada ano surjam de 50.000 a 90.000 novos casos, com potencial para a ocorrência de surto e mortalidade. A enfermidade está distribuída principalmente em sete países, representando 90% dos casos mundiais. Os países participantes dessa lista são: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2023a).

Nas Américas, a LV atinge 13 países, como Colômbia, Venezuela, Paraguai e, principalmente, o Brasil - responsável por mais de 92% dos casos (PAHO/WHO, 2023b). De acordo com a OPAS, em 2021, os cinco municípios brasileiros que registraram maior número de casos foram: Fortaleza (CE), Belo Horizonte (MG), São Luís (MA), Araguaína (TO) e Paraupébas

(PA). Nesse mesmo período, as regiões foram classificadas quanto à intensidade de transmissão. Nos quesitos transmissão muito intensa e transmissão intensa, todos os municípios que entraram nesses grupos eram brasileiros (Figura 3) (BRASIL, 2022a; PAHO/WHO, 2022). No estado de Mato Grosso do Sul, três cidades foram classificadas como área de transmissão intensa: Três Lagoas, Corumbá e Campo Grande (BRASIL, 2022b).

Figura 3 - Estratificação de risco da leishmaniose visceral por município de infecção. Brasil, de 2020 a 2022.



Fonte: SVSA/MS, 2022.

No Mato Grosso do Sul, em 2022, foram diagnosticados 152 casos de LV, com 12,5% de letalidade; quando comparado com o ano de 2021, houve um aumento de 50% da letalidade. Na análise retrospectiva de 2002 e 2022, em relação ao número de casos confirmados e suspeitos, observou-se uma tendência de alta, como ilustrado na Figura 4 (MATO GROSSO DO SUL, 2023).

Figura 4 - Distribuição dos casos suspeitos, confirmados e óbitos por LV no estado de Mato Grosso do Sul, no período de 2013 a 2022.



Fonte: SINAN, 2023

2.3.3 Agentes Etiológicos da Leishmaniose Visceral

A LV, conhecida popularmente como “Calazar ou Kala-azar”, tem como agente etiológico protozoários com a seguinte classificação (COX, 2005; LAINSON; SHAW, 2005):

Reino: Protozoa Goldfuss, 1818

Filo: Euglenozoa Cavalier-Smith, 1998

Classe: Kinetoplastea Honigberg, 1963

Ordem: Trypanosomatida Kent, 1880 Família:

Trypanosomatidae Doflein, 1901

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Subgêneros: *Leishmania* Ross, 1903

Existe uma diversidade de espécies de *Leishmania* com importância médica, para as quais a classificação e a identificação taxonômicas são fundamentadas em características biológicas, bioquímicas, genéticas e ecológicas, incluindo a manifestação clínica da parasitose, o desenvolvimento nos hospedeiros (vertebrado e invertebrado) e na distribuição geográfica (LAINSON, 2010; LAINSON; SHAW, 2005; SCHÖNIAN; MAURICIO; CUPOLILLO, 2010).

As espécies envolvidas na patologia da LV são *Leishmania donovani*, comum na Ásia e África, e *L. infantum*, presente na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, América do Sul e América Central (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; MOHAMMADI et al., 2022; WAMAI et al., 2020). Tanto a *L. donovani* quanto a *L. infantum*, além de causar quadro clínico característico visceral, podem se disseminar gerando lesões na pele, muito relacionadas ao estado imunológico do hospedeiro (KARIMI; ALBORZI; AMANATI, 2016).

Existem relatos de outras espécies menos comuns causando LV, como *L. amazonensis*, no nordeste e sudeste brasileiro, e *L. tropica* no Irã (MOHAMMADI et al., 2022; PORTO et al., 2022; VALDIVIA et al., 2017).

2.3.4 Hospedeiros, Reservatórios e Vetores

A transmissão do parasito ao homem e outros hospedeiros mamíferos ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de dípteros pertencentes à Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, popularmente conhecidos como flebotomíneos, “mosquito palha”, “asa branca”, “asa dura”, “cangalhinha”, “birigui”, “flebotí”, “tatuquira” entre outros (LAINSON; RANGEL, 2005).

Os flebotomíneos são artrópodes pequenos, com aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento, aspecto hirsuto e coloração variando de castanho claro a escuro ou acinzentado. Apresentam tórax arqueado, com pernas longas e asas lanceoladas, que durante o pouso se mantêm eretas, e possuem hábitos preferencialmente crepusculares e noturnos (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão de *L. infantum* são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (LAINSON; RANGEL, 2005; OLIVEIRA et al., 2017). No subcontinente indiano, as espécies vetoras na transmissão de patógenos são *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus orientalis* e *Phlebotomus martini* (SHARMA; SINGH, 2008), enquanto as espécies *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi* estão envolvidas na transmissão na região do Mar Mediterrâneo (FRAGA et al., 2012).

No ciclo de transmissão do parasito, alguns mamíferos podem atuar como reservatórios. A transmissão de *L. donovani* é antroponótica; isto é, o humano atua como reservatório, já os reservatórios de *L. infantum* podem ser animais silvestres e domésticos, sendo a transmissão denominada como zoonótica (LAINSON; RANGEL, 2005). Em ambientes silvestres, estes são, principalmente: os canídeos *Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus* e *Speothos venaticus*; os felídeos *Panthera onca* e *Felis concolor*; os gambás *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*. Na área urbana, a principal fonte de infecção para o vetor são os cães domésticos (*Canis familiaris*), que apresentam intenso parasitismo cutâneo (COSTA, 2005; LAINSON; RANGEL, 2005).

2.3.5 Diagnóstico

No Brasil, a LV é uma de doença de notificação compulsória e são considerados como casos suspeitos, indivíduos procedentes de área de transmissão (endêmica) em qualquer idade, com quadro clínico de febre persistente, hepatomegalia, esplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e perda de peso. A confirmação do caso pode ser definida por critérios clínico-epidemiológicos ou clínico-laboratoriais (BRASIL, 2023, 2014). Os diagnósticos clínico e

laboratorial, bem conduzidos e associados, são vitais e extremamente importantes, pois auxiliam no manejo e na conduta médica, reduzindo o surgimento de complicações e mortalidade. Para o diagnóstico presuntivo de LV, são utilizados aspectos clínicos, epidemiológicos da doença e exames laboratoriais (PAHO/WHO, 2022).

2.3.5.1 Diagnóstico Clínico-Epidemiológico

O diagnóstico clínico-epidemiológico envolve uma combinação de sinais clínicos, histórico epidemiológico do paciente e suspeita clínica com base em fatores como a presença de sintomas característicos da doença e do contexto geográfico/endêmico. No Brasil, o Ministério de Saúde inclui como critérios para esse diagnóstico da LV: indivíduo clinicamente suspeito, residente ou procedente de área com transmissão de LV, sem confirmação laboratorial, mas com resposta favorável ao tratamento específico (BRASIL, 2011).

No entanto, o diagnóstico clínico-epidemiológico é complexo por sua apresentação se sobrepõe a outras infecções, sendo primordial o uso de múltiplas abordagens para aumentar a precisão diagnóstica (REIMÃO et al., 2020). Na LV, esses exames podem ser realizados pela identificação do parasita por meio de amostra de tecido ou aspirado de medula óssea, por teste sorológico ou molecular (MONDAL; BHATTACHARYA; ALI, 2010).

2.3.5.2 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico pode ser de forma direta ou indireta. No parasitológico direto busca-se a observação em microscópio óptico da forma amastigota de *Leishmania* sp. em amostras de aspirado de medula óssea, biópsia hepática ou gânglios linfáticos. Os esfregaços de tecidos são fixados e corados com Giemsa ou Leishman (SUNDAR et al., 2002; SRIVASTAVA et al., 2011; BRAZIL., 2014).

O diagnóstico parasitológico indireto para LV baseia-se no isolamento do parasito a partir de amostra biológica oriunda de pacientes, a qual é inoculada em meio de cultura bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e em temperatura adequada para o crescimento de formas promastigotas (BRAZIL., 2014; SANTOS et al., 2018) A observação da presença do parasito pode ocorrer após sete dias do isolamento podendo se estender por semanas; essa é feita a fresco, sem necessidade de fixar e corar o material, utilizando-se o microscópio óptico, onde é verificada a motilidade da *Leishmania* sp. (MAURYA et al., 2010; SRIVASTAVA et al., 2011).

O diagnóstico parasitológico, dentro dos exames laboratoriais das leishmanioses, continua sendo o padrão ouro pela alta especificidade, mesmo apresentando baixa sensibilidade e necessitando de profissionais capacitados (REIMÃO et al., 2020).

2.3.5.3 Diagnóstico Sorológico

Baseado na presença de resposta humoral específica, os métodos sorológicos mais comumente usados no diagnóstico de LV são: teste de imunocromatografia ou teste rápido (TR), teste de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (BRASIL, 2011; SRIVASTAVA et al., 2011)

O teste de imunocromatografia, amplamente conhecido como teste rápido devido à sua rápida aplicação e leitura, que ocorre em um intervalo de 10 a 20 minutos com resultados binários (positivo ou negativo), baseia-se na utilização de uma proteína recombinante (rK39) como antígeno, apresentando uma especificidade de 98% e uma sensibilidade que varia entre 94% e 96%. No Brasil, o Ministério da Saúde atualmente recomenda o uso deste teste para diagnosticar a LV, com o objetivo de expandir sua aplicação nas Unidades Básicas de Saúde (BRASIL, 2024). No entanto, essa abordagem enfrenta limitações na diferenciação entre infecções atuais, subclínicas ou passadas. Ademais, em pacientes infectados pelo HIV/AIDS, a sensibilidade do teste é reduzida, sendo de aproximadamente 60% (REIMÃO et al., 2020; SRIVASTAVA et al., 2011).

Baseado na detecção de anticorpos, o teste RIFI apresenta sensibilidade nos estágios iniciais da infecção e, após um período de seis a nove meses após a cura, são indetectáveis. A titulação para o resultado positivo deve ser superior ao ponto de corte de 1:40 (BRASIL, 2014; SRIVASTAVA et al., 2011). Recentemente, o Ministério da Saúde descontinuou a utilização da RIFI para diagnóstico de LV, uma vez que estudos demonstraram sua acurácia inferior a outros métodos disponíveis (FREIRE et al., 2019; SOUZA-FILHO et al., 2024; BRASIL, 2024).

O ELISA, atualmente, tem sido utilizado com o antígeno o rK39 por apresentar sensibilidade e especificidade de 100% e 96%, respectivamente (EJAZI; ALI, 2013). A vantagem dessa técnica está relacionada à quantidade de amostras que pode ser lida de uma só vez utilizando diferentes tipos de antígenos e amostras. Em contraponto, a desvantagem está relacionada ao alto custo em equipamentos, necessidade de profissionais especializados e ao extenso tempo para leitura, além da falta de discriminação entre doença ativa e cura clínica, limitando-se, então, seu uso em regiões endêmicas (REIMÃO et al., 2020).

No diagnóstico para LV, os testes sorológicos apenas têm valor definido em imunocompetentes. No caso de pacientes HIV/LV, esses testes não são utilizados como critério para exclusão diagnóstica de LV, por apresentarem baixa sensibilidade (BRASIL, 2015).

2.3.5.4 Diagnóstico Molecular

Os métodos moleculares têm por objetivo identificar e analisar informações genéticas em patógenos, associações específicas em doenças, predisposições e diversos outros aspectos de

interesse médico (VAN BELKUM, 2003). Para o diagnóstico de LV, os testes são baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA (REIMÃO et al., 2020).

2.3.5.4.1 Ensaios Baseados em PCR

Os ensaios baseados na PCR permitem a amplificação de nucleotídeos específicos de um alvo, que pode pertencer a regiões codificantes ou não codificantes dos genomas nuclear e mitocondrial do parasito (REIMÃO et al., 2020). Desses alvos, os mais comumente usados para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. são: região do espaçador transcrito interno ribossômico (*ITS*) (SCHÖNIAN et al., 2003), gene de RNA ribossômico de subunidade pequena (*SSU rRNA*) (SALOTRA et al., 2001); DNA cinetoplastidial repetitivo (*kDNA*) (SALOTRA et al., 2001), gene que codifica a proteína de choque térmico (*HSP70*) (MONTALVO et al., 2010) e de genes de mini-exon (KATAKURA et al., 1998). A extração do DNA é feita diretamente de tecidos de órgãos como baço, aspirado de medula óssea, gânglios linfáticos, ou ainda, desses tecidos fixados em lâminas de esfregaço (SRIVASTAVA et al., 2011).

O método possui alta sensibilidade, permitindo identificar a espécie de *Leishmania* por meio de fragmentos específicos de DNA de um grupo ou de uma espécie, ou ainda, pela combinação de uma PCR com uma etapa de digestão com endonucleases de restrição, clivando a molécula em fragmentos de tamanho específico de cada espécie, os quais são revelados por eletroforese em gel de agarose (MONTALVO et al., 2010; SCHÖNIAN et al., 2003).

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) também permite a quantificação da carga parasitária utilizando, metodologia útil no acompanhamento da evolução da infecção no paciente e no monitoramento da cura clínica (MARY et al., 2006). Outra ferramenta promissora para o diagnóstico de LV pela rapidez, praticidade e baixo custo é a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) (ERBER et al., 2022; REIMÃO et al., 2020).

Os ensaios de PCR, embora muito sensíveis, ainda não fazem parte da rotina diagnóstica nos serviços de saúde pela falta de padronização e otimização de protocolos de extração de DNA, controles internos para reação da PCR e cepa de referência de *Leishmania* spp. como controle positivo, além de um programa externo de controle de qualidade (FILHO; MOL; MEDEIROS, 2023; REIMÃO et al., 2020).

2.3.5.4.2 Sequenciamento

Nas últimas décadas, novas tecnologias moleculares vêm sendo desenvolvidas e utilizadas para o melhor entendimento dos organismos (CARVALHO et al., 2020). O sequenciamento de DNA baseia-se na incorporação de didesoxinucleotídeos de terminação de cadeia para a determinação da sequência de nucleotídeos de um determinado fragmento de DNA (SANGER; NICKLEN;

COULSON, 1977). Esses métodos são eficientes para identificar espécies, além da compreensão das diversas funções dos genes, identificar as variações genômicas, avaliar perfis de expressão gênica e auxiliar em estudos filogenéticos (AKHOUNDI et al., 2016; LIU et al., 2012).

O sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*) é uma tecnologia capaz de gerar gigabases de sequências de DNA em um curto espaço de tempo e a custos mínimos, utilizando plataformas como a *Illumina*, que tem se destacado por genotipar grande parte do genoma de várias espécies de *Leishmania* (BAXTER et al., 2011; LEPROHON et al., 2015).

A eficiência em tempo e custo do NGS fundamenta-se no uso da clonagem *in vitro* em sistemas de suporte sólido, permitindo que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez. A tecnologia dispensa grande parte do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis (CARVALHO; SILVA, 2010; KU; ROUKOS, 2013).

Os dados gerados pelo NGS permitem o desenvolvimento de estratégias inovadoras para descobrir e validar diferentes aspectos da biologia de *Leishmania* sp. Abordagens como a tipagem de SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*), InDels (do inglês, *deletion-insertion variants*) e CNV (do inglês, *copy number variation*) têm-se demonstrado eficientes para diferenciar as cepas de parasitos entre as populações naturais de *Leishmania* sp., assim como para a identificação de marcadores moleculares de resistência aos quimioterápicos (CARNIELLI et al., 2018; DOWNING et al., 2012; LEPROHON et al., 2015).

2.3.6 Tratamento

O tratamento da LV visa controlar a infecção. As abordagens terapêuticas podem diferir em eficácia e efeitos colaterais, sendo conduzidas de acordo com a localidade, as diretrizes específicas de cada país ou organização de saúde, o acesso aos medicamentos, o estado nutricional do paciente, a coinfeção por HIV e outras infecções associadas (SINGH et al., 2019).

Na LV, ainda a única opção de tratamento é medicamentosa, a qual é um desafio muito difícil e insatisfatória, verificando-se crescente resistência medicamentosa (SUNDAR 2017). Os fármacos disponíveis são limitados a compostos antimoniais pentavalentes (SB^V), paromomicina injetável (PM), miltefosina oral (MF), anfotericina B (AmpB) e pentamidina (ALVES SOUZA et al., 2019; SCARPINI et al., 2022).

Os SB^V apresentam-se em duas formas: estibogluconato de sódio (SSG) e antimoniato de meglumina (MA), sendo o último o fármaco de primeira escolha no Brasil. A administração se dá por via intramuscular ou intravenosa em doses de 20 mg/kg por 28 a 30 dias. O mecanismo de ação ainda é pouco compreendido. Sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e via oxidativa de ácidos graxos. Os medicamentos apresentam elevada toxicidade, baixa adesão pelos pacientes em função dos longos esquemas posológicos exigidos, e

também há evidências de pacientes imunodeprimidos que não respondem ao tratamento (DESJEUX, 1999; GONTIJO; MELO, 2004). Foram descritas como reações adversas: arritmias cardíacas, alterações eletrolíticas (intervalo QT prolongado-QTc), taquicardia ventricular, batimentos ventriculares prematuros, fibrilação ventricular e taquicardia ventricular do tipo “torsades de pointes”, artralgia, mialgia, aumento de enzimas pancreáticas e hepáticas (BRASIL, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

A PM é um antibiótico aminoglicosídeo com ação no bloqueio da síntese proteica. É administrado por via intramuscular em dosagem de 15 mg/kg/dia durante 21 dias. É um fármaco de baixo custo, utilizado na Índia, mas de elevado potencial nefrotóxico, ototóxico e hepatotóxico (MAZIRE; AGARWAL; ROY, 2022; SCARPINI et al., 2022; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019). No Brasil, esse medicamento não é administrado para essa enfermidade (BRASIL, 2014).

A MF é o primeiro medicamento anti-*Leishmania* oral eficaz na LV. É um composto alquilfosfolipídico com ação no aumento da produção de óxido nítrico nos macrófagos, citotóxico ao parasita, bem como na alteração na composição da membrana plasmática e nos danos às mitocôndrias. As doses recomendadas são de 2 a 2,5 mg/kg por 28 dias. Por se tratar de um composto teratogênico, não pode ser administrado a gestantes. Seus principais efeitos adversos são: diarreia, vômito, desidratação e, ocasionalmente, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Possui meia-vida longa (aproximadamente uma semana), o que o torna vulnerável ao desenvolvimento de resistência pelos parasitas, como observado na Índia (MAZIRE; AGARWAL; ROY, 2022; SUNDAR et al., 2002).

O uso da MF no Brasil, inicialmente, era permitido apenas na leishmaniose visceral canina (BRASIL, 2016), mas em 2018, o uso em humanos foi liberado para o tratamento da leishmaniose cutânea no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS (BRASIL, 2018).

A AmpB apresenta duas formulações: desoxicolato e lipossomal. É um antifúngico que atua na formação de poros aquosos devido à alta afinidade por um componente da membrana celular da *Leishmania* spp., o ergosterol, provocando a morte celular (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021). São recomendados como primeira escolha para pacientes com coinfeção por HIV e LV (PAHO/WHO, 2022). A formulação de AmpB desoxicolato apresenta maior toxicidade, causando efeitos colaterais importantes, incluindo nefrotoxicidade, hipocalemia, reações à infusão e miocardite (KRAFT et al., 2023). A recomendação de administração pode ser diariamente ou em dias alternados por infusão intravenosa em dextrose a 5% por 4 h na dose de 0,75–1,0 mg/kg por 15 a 20 dias (WHO, 2010). A AmpB Lipossomal (LAMB) tem toxicidade reduzida pela formulação lipídica, com melhor farmacocinética e biodisponibilidade. O medicamento em questão apresenta um alto custo e a dose total varia de acordo com a região. A administração deve ser feita em ambiente hospitalar, por ser intravenosa, podendo provocar eventos adversos, como febre, cefaleia,

náuseas, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar (PONTE-SUCRE et al., 2017). No Brasil, o fármaco é recomendado para gestantes, coinfectados HIV/LV e pacientes que tenham contraindicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade relacionada ao uso dos antimoniais pentavalentes. A administração do medicamento segue a dosagem de 1,0 a 1,5 mg/Kg/dia durante 21 dias, ou 3,0 mg/Kg/dia durante 10 dias (BRASIL, 2014).

A pentamidina é utilizada como tratamento alternativo, possui alta toxicidade e apresenta efeitos colaterais, tais como fibrilação ventricular, *diabetes mellitus*, anorexia, astenia, náusea, dor abdominal, hipoglicemia prolongada, taquicardia e outras arritmias e insuficiência renal (BRASIL, 2014; PICCICA et al., 2021). O mecanismo de ação está envolvido na inibição da síntese ribossomal de proteínas, com interferência também na síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídios. Acumula-se em compartimentos que contêm DNA, como a mitocôndria, onde altera o potencial de membrana mitocondrial, levando à morte celular (BLOCK; SCHMITT; SCHWARZ, 1993; HAFIZ; KYRIAKOPOULOS, 2023; KITAMURA et al., 1995). Em muitos países, é recomendada para profilaxia secundária na coinfeção HIV-LV (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019). A administração pode ser intramuscular, intravenosa ou inalatória. No Brasil, a dose é de 4 mg/kg/dia em dias alternados, não ultrapassando 2 g como dose total, por via intravenosa (BRASIL, 2014).

O Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil disponibiliza gratuitamente o tratamento para LV com o antimoniato de meglumina como primeira escolha, e a anfotericina B lipossomal como segunda escolha (BRASIL, 2023).

A terapia multimedicamentosa no tratamento da LV vem sendo explorada e envolve diferentes combinações de medicamentos anti-*Leishmania*. A combinação pode gerar uma atividade sinérgica ou aditiva, diminuindo a duração da terapia e doses administradas, a ocorrência de efeitos adversos e o custo do tratamento, aumentando a probabilidade de um melhor desfecho. Também dificulta a resistência aos medicamentos, prolongando assim o uso dos mesmos. Essa abordagem tem sido usada nos tratamentos para PKDL (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

2.3.6.1 Profilaxia Secundária Para LV

A profilaxia secundária ou terapia de manutenção refere-se a medidas preventivas realizadas após exposição conhecida ou suspeita a um agente patogênico, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de uma infecção. Comumente é utilizada após exposição a determinados agentes infecciosos, como o HIV, hepatite B, raiva e outras doenças transmissíveis, por meio do uso de medicamentos antivirais, vacinas ou soros específicos (KAPLAN; MASUR; HOLMES, 2002).

Nos casos de LV, a profilaxia secundária é recomendada em regiões endêmicas e para imunocomprometidos. A terapia ocorre após um ciclo completo de tratamento e é conduzida até que seja obtida a reconstituição imunológica adequada (PICCICA et al., 2021).

No Brasil, a profilaxia secundária é recomendada com anfotericina B lipossomal em

indivíduos coinfectados HIV/LV que tenham a contagem de linfócitos T-CD4 abaixo de 350 células/mm³. A suspensão da profilaxia ocorre quando essas células superam o valor padronizado de 350 células/mm³, o paciente apresenta um bom quadro clínico sem sinais e sintomas de LV por mais de seis meses e contagem de carga viral indetectável (BRASIL, 2015).

2.3.6.2 Refratariedade ao Tratamento de LV

A refratariedade refere-se à falta de resposta terapêutica convencional e/ou resistência a intervenções médicas adequadas ou esperadas (BRASIL, 2014). As falhas terapêuticas e a refratariedade vêm sendo relatadas na LV e, como consequência, o aumento da mortalidade mesmo após sucessivas tentativas de cura clínica sem sucesso (SUNYOTO; BOELAERT; MEHEUS, 2019). Muitos desses casos estão ocorrendo no estado de MS, o que gera uma preocupação com a manutenção da doença na região. Sendo assim, é imprescindível a descrição mais detalhada a nível epidemiológico e molecular do parasita que está causando a refratariedade em pacientes com LV e, assim, auxiliar na busca por novas drogas ou outros tratamentos para o seu controle (LEPROHON et al., 2015; MYLER; STUART, 2000).

A persistência e o aumento de casos de LV em alguns focos endêmicos, como no Brasil e, em especial em Mato Grosso do Sul, mesmo após extensas intervenções de controle, podem estar relacionados a casos refratários aos tratamentos atuais e às variações genéticas do parasito. As relações intraespecíficas conduzem a uma seleção natural contínua para adaptação e contra-adaptação. Nesse contexto, tanto o parasito quanto o hospedeiro estão envolvidos em uma corrida armamentista evolucionária, conforme delineado na "Hipótese da Rainha Vermelha" (LIVELY; DYBDAHL, 2000). Neste contexto, presume-se que o sucesso do parasito se manifeste a nível molecular, na tentativa de modular as interações para que fiquem semelhantes, causando o mínimo de perturbação ao hospedeiro (KOEHLER et al., 2007). Estudos genômicos de *Leishmania* sp. demonstram que o parasito apresenta alta plasticidade e utiliza a amplificação adaptativa de genes como estratégia para se adaptar ao ambiente (UBEDA et al., 2008).

Nos últimos anos, pacientes diagnosticados com LV têm demonstrado resistência aos principais fármacos utilizados no tratamento, apresentando várias recidivas e fazendo uso exacerbado de medicamentos, conseqüentemente, acarretando em outros problemas de saúde devido à sua toxicidade (CROFT; YARDLEY, 2002). Além de reações adversas, o insucesso da cura clínica acarreta muitos gastos para o sistema de saúde pública e ao próprio indivíduo, implicando em ocupações em leitos hospitalares por longos períodos, altos custos com os quimioterápicos e incapacidade funcional do paciente (SUNYOTO; BOELAERT; MEHEUS, 2019). Outro ponto está relacionado à coinfeção HIV/LV, onde de 25 a 61% dos pacientes apresentaram redução na resposta terapêutica e aumento no número de recidivas (CASADO et al., 2001; COTA; SOUSA; RABELLO, 2011).

Estudos com biomarcadores envolvidos na resistência medicamentosa vêm ganhando foco por buscarem o entendimento do controle dos genes de *Leishmania* spp. na absorção, no sequestro, na interação entre efluxo, mutação ou regulação negativa de um sistema de captação de fármacos (GOURBAL et al., 2004; SALARI et al., 2022). Atualmente, são conhecidos numerosos biomarcadores de resistência aos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, como os genes codificadores: da proteína aquagliceroporina (AQP1), do complexo Transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC), da Proteína 14-3-3, da Proteína 299 (P299), das histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4, do gene C quinase ativado (LACK1), da proteína ubiquitina, da permease de aminoácidos (AAP3), do fosfoglicerato quinase (PGK), da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), da proteína tirosina fosfatase (PTP), da pteridina redutase 1 (PTR1), da triparedoxina peroxidase (TXNPx), da membrana cinetoplastídica (KMP11), da tripanotiona redutase (TryR), da calcineurina, de repetições ricas em leucina (LRRs), de genes transportadores LiMT e LiRos3, ARM58 e ARM56, HSP23, da proteína serina/treonina fosfatase (proteínas semelhantes à fosfatase 2C), do superóxido dismutase de ferro-A, do transportador de folato 1 (FT1), do HSP83, da proteína relacionada à calpaína do cinetoplastídeo pequeno (SKCRP14.1), do LmACR2, da redutase I dependente de tiol (TDR1) e da proteína de choque térmico 70 (hsp70) (SALARI et al., 2022).

A identificação de biomarcadores de resistência permite realizar uma conduta medicamentosa mais eficiente e personalizada, diminuindo a probabilidade de recaídas e recidivas, obtendo um desfecho mais favorável (CARNIELLI et al., 2018).

2.4 Caracterização Genética de *Leishmania* sp.

O gênero *Leishmania* é composto por 39 espécies conhecidas, sendo 20 patogênicas ao homem (INCEBOZ, T., 2019; MAURÍCIO, 2018). Organismos unicelulares eucariotos apresentam um mecanismo peculiar de expressão gênica. Os genes codificadores de proteínas são distribuídos nos cromossomos como parte de unidades contíguas na mesma fita de DNA e são transcritos como unidades de transcrição policistrônica (AGABIAN, 1990). O RNA mensageiro (mRNA) maduro é gerado a partir de transcritos primários por *trans-splicing*, em que há a adição na porção 5' de uma emenda líder (SL) de 39 nucleotídeos e a cauda poli-A na porção 3' (GIBSON; SWINKELS; BORST, 1988). A expressão gênica é controlada pela estabilidade do RNA na ausência de promotores, e não pelo aumento da atividade do RNA polimerase (MÜLLER et al., 2010; MÜLLER; PADMANABHAN; PAPADOPOULOU, 2010). Essa estratégia parece facilitar a adaptação em ambientes de estresse, como sob pressão a um medicamento. Estão relacionados a esse mecanismo, o polimorfismo de único nucleotídeo (SNP), o aumento da expressão gênica por meio da amplificação gênica ou duplicação, exclusão de genes e aneuploidia (LEPROHON et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2013; UBEDA et al., 2008).

O gênero em questão apresenta uma grande variedade genômica, cada espécie tem diferentes

números de cromossomos, assim como diversos conjuntos de genes. Essa variedade pode estar relacionada à distribuição geográfica, ao vetor, aos reservatórios e às manifestações clínicas (SANTI; MURTA, 2022). Estudos mostram que a diversidade genética é intraespecífica, variando com as regiões geográficas até mesmo dentro dos países, sugerindo a existência de entidades ecologicamente divergentes (BOITÉ et al., 2012; LLANES et al., 2022; ROGERS et al., 2011).

As características abordadas reforçam a necessidade de estudos e abordagens genéticas nas diferentes espécies de *Leishmania*, como também nas diferentes cepas circulantes em cada região. O entendimento da complexidade dos aspectos genômicos e da interação hospedeiro-*Leishmania* contribui para a melhor compreensão da grande adaptabilidade desses parasitos e seus mecanismos de resistência aos medicamentos e, conseqüentemente, das falhas terapêuticas (SANTI; MURTA, 2022).

3 JUSTIFICATIVA

A LV representa a forma clínica mais grave do grupo das leishmanioses, uma vez que quando não tratada pode levar à morte. Caracteriza-se como uma doença crônica, com amplo espectro clínico, podendo apresentar quadros leves, moderados e graves. Destaca-se entre essas manifestações a Leishmaniose Dérmica Para-Kala-Azar (Para-KDL), que ocorre de forma atípica, com manifestação simultânea tanto visceral quanto cutânea.

A enfermidade possui uma distribuição global e faz parte das doenças negligenciadas, sendo particularmente prevalente em populações de baixa renda. A desnutrição, o deslocamento populacional, as mudanças no ambiente humano, as condições habitacionais precárias e a imunodeficiência são fatores associados à ocorrência da doença. Além disso, há desafios relacionados ao diagnóstico, ao tratamento contínuo e à resistência aos medicamentos quimioterápicos. Esses problemas contribuem para a complexidade do controle e da gestão da LV em nível global.

Investigações extensivas que registrem casos incomuns de leishmaniose, delineiem um perfil epidemiológico e conduzam a identificação e caracterização genética da espécie de *Leishmania* nos casos de LV, são ferramentas fundamentais para uma compreensão abrangente da doença. Tais estudos desempenham um papel crucial ao facilitar o diagnóstico precoce e a prática clínica mais eficaz, além de contribuírem para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos sensíveis e específicos. Adicionalmente, podem ampliar as opções de tratamento disponíveis e fornecer subsídios para a identificação de novos alvos terapêuticos, o que poderia resultar na redução da morbidade e mortalidade associadas à parasitose.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar as características epidemiológicas da leishmaniose visceral e genéticas de *Leishmania* spp. em pacientes diagnosticados no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Humap-UFMS/Ebserh).

4.2 Objetivos Específicos

Relatar casos atípicos de pacientes com LV: leishmaniose dérmica para-kala-azar (Para-KDL);

Avaliar e descrever o perfil epidemiológico dos pacientes com suspeita de LV;

Identificar e caracterizar geneticamente a espécie de *Leishmania* nos pacientes diagnosticados com LV.

Capítulo 1

Artigo publicado na revista “PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES”.

RESEARCH ARTICLE

VL-HIV co-infection with *Leishmania* containing skin lesions resembling para-kala-azar dermal leishmaniasis

Natália O. Alves^{1,2}, Jéssica A. Oshiro³, Yunna C. Silva³, Gabriela C. Pacher^{1,4}, Aline E. Casaril¹, Yasmin S. Rizk¹, Silvia N. O. Uehara^{3,5}, Anamaria M. M. Paniago^{2,3,5}, Isadora L. X. Andrade⁵, Carla C. P. Arruda^{1,4*}, Alessandra G. Oliveira^{1,2*}

1 Laboratory of Human Parasitology, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, **2** Graduate Program in Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, **3** Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, **4** Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, **5** Maria Aparecida Pedrossian University Hospital—Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil

* alessandra.oliveira@ufms.br (AGO); carla.arruda@ufms.br (CCPA)



OPEN ACCESS

Citation: Alves NO, Oshiro JA, Silva YC, Pacher GC, Casaril AE, Rizk YS, et al. (2024) VL-HIV co-infection with *Leishmania* containing skin lesions resembling para-kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 18(8): e0012438. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438>

Editor: José Angelo Lauletta Lindoso, Institute of Infectology Emilio Ribas and Instituto de Medicina Tropical, BRAZIL

Received: August 17, 2023

Accepted: August 6, 2024

Published: August 26, 2024

Copyright: © 2024 Alves et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: "The data set contains information of a sensitive nature that cannot be made available for reasons of confidentiality. This includes the personal information of the patients involved, as well as their respective medical records. Further information can be obtained from the Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul: cepconep.propp@ufms.br.

Abstract

Leishmaniasis are a group of neglected vector-borne infectious diseases that are among the six priority endemic diseases worldwide. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe clinical manifestation, characterized by systemic and chronic visceral involvement and high mortality in immunosuppressed and untreated patients. VL can be complicated into post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL), and when dermatologic disorders occur simultaneously with active VL, an intermediate clinical form called para-kala-azar dermal leishmaniasis (para-KDL) occurs. This clinical form is of great epidemiological relevance, as humans act as a source of infection for vectorial transmission. In the Americas, Brazil is among the seven countries responsible for more than 90% of VL cases, though reports of PKDL and para-KDL are rare. This paper presents three cases of VL-HIV co-infection with *Leishmania*-containing skin lesions resembling para-kala-azar dermal leishmaniasis. The cases were investigated by the team from the Infectious Diseases Department of University Hospital (HUMAP/UFMS) in Mato Grosso do Sul, Brazil. The three patients exhibited skin lesions where amastigote forms of *L. (L.) infantum* were identified. All cases exhibited similar clinical manifestations of para-KDL, including fever, hepatosplenomegaly, pancytopenia, and disseminated skin lesions. The study described the prevalence of comorbidities, the incidence of VL relapse, and the therapeutic regimen in relation to the outcomes. The study underscores the importance of follow-up and secondary prophylaxis in patients with VL, which are essential for the efficacy of the treatment. Furthermore, the study provides insight into the potential epidemiological profile of para-KDL cases in Brazil, which contributes to the development of more efficient clinical management strategies for patients.

Funding: This work was supported by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência, e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul-FUNDECT (Grant number 99/2023 SIAFIC 33115 to AGO). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected vector-borne infectious disease with a systemic and chronic involvement that is lethal when untreated. Para-kala-azar dermal leishmaniasis (para-KDL) is a complication of VL, in which the patient presents with dermatological and visceral manifestations simultaneously. Para-KDL cases are of significant epidemiological importance, as humans act as a source of infection in parasite transmission. In the Americas, Brazil accounts for over 90% of VL cases. Nevertheless, reports of para-KDL remain scarce. This paper presents three cases of VL-HIV co-infection with *Leishmania*-containing skin lesions resembling para-kala-azar dermal leishmaniasis. The three cases exhibit similarities in terms of signs and symptoms, diagnostic criteria for AIDS, and the presence of active VL with skin lesions. The study contributes to the understanding of the epidemiological profile of para-PKDL cases in Brazil. It highlights the significance of multidisciplinary follow-up and secondary prophylaxis for patients with VL and emphasizes the need for more effective clinical management strategies for these patients.

Introduction

Leishmaniasis, a group of vector-borne infectious diseases caused by several species of *Leishmania* protozoan parasites, are considered neglected tropical diseases by the World Health Organization (WHO). They are included among the six priority endemic diseases worldwide, given that they occur in countries with vulnerable populations. In the Americas, these diseases represent a significant public health concern due to their high incidence, extensive geographic distribution, and high morbidity and mortality rates [1,2].

The clinical manifestations of leishmaniasis are dependent upon the causative species and the patient's immune response and can be classified as cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), and visceral leishmaniasis (VL) [1]. Visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, is the most severe clinical manifestation, with a systemic and chronic involvement of the viscera. It is important to note that VL is a highly lethal disease in untreated and immunosuppressed individuals, particularly in patients with *Leishmania*-HIV co-infection [3,4].

In the 1990s, the concurrence of HIV and leishmaniasis was first observed in countries along the Mediterranean basin [5]. Currently, there is a high frequency of *Leishmania*-HIV co-infection in Ethiopia and Brazil [6]. HIV-positive patients are particularly vulnerable to VL since this disease contributes to the acceleration of HIV replication and its progression to AIDS. This interaction between the two conditions represents a substantial challenge in regions with a high prevalence of co-infection [7].

Visceral leishmaniasis (VL) can result in the development of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL), a dermatological disorder that can lead to stigmatization [8]. The symptoms of PKDL typically manifest between six months and several years after the apparent clinical remission of VL. The presence of macular, papular, or nodular skin lesions is indicative of PKDL, in which *Leishmania* parasites can be visualized upon biopsy [9]. The incidence of PKDL is highest in African and Southeast Asian countries, where *Leishmania donovani* is the primary causative agent. A review of the literature revealed a paucity of documented cases from other regions [3].

In the event of dermatological disorders occurring concurrently with active VL, they give rise to an intermediate clinical form, designated Para-Kala-azar Dermal Leishmaniasis (para-KDL) [10]. The clinical manifestations of para-KDL are characterized by the development of

skin rashes that may originate around the mouth and subsequently spread to other parts of the body. A study conducted in Bangladesh observed a combination of the clinical-pathological conditions of VL and PKDL in patients with para-KDL, who presented with a history of fever for weeks or months and constitutional symptoms such as weight loss, weakness, hepatosplenomegaly, anemia, and macular or mixed skin lesions (macular, papular, and nodular) [11]. Phenotypes may include the hypopigmented flat (macular) rash, which may be accompanied by some mildly raised (maculopapular) or raised (nodular) rash [9].

Brazil is one of seven countries with the highest number of cases, accounting for over 90% of VL cases [3]. However, reports of PKDL and para-KDL are uncommon [8,12–15]. Mato Grosso do Sul state is considered an endemic region for VL, with 152 new cases and 19 deaths registered in 2022, representing a 50% increase compared to the previous year [16]. Currently, there are no reports of para-KDL in the region.

This paper presents three cases of immunocompromised patients with active VL and *L. (L.) infantum*-HIV coinfection, which exhibit similar characteristics to those observed in para-KDL.

Methods

Ethics statement

The study received approval from the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul (CEP/UFMS- 4.628.192), as well as the Human Research Ethics Committee of the Maria Aparecida Pedrossian University Hospital (HUMAP/UFMS), under protocol 6/2021/SGPIT/GEP/HUMAP-UFMS-EBSERH. Data contain potential information. Written informed consent was obtained from patients.

The study participants

This paper presents three cases of patients treated at the Maria Aparecida Pedrossian University Hospital (HUMAP/UFMS) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. The patients exhibited similar clinical characteristics, prompting further investigation by the medical and research team. The hospital conducted routine examinations of suspected cases of VL and collected biological material for direct parasitological diagnosis.

The Human Parasitology Teaching and Research Laboratory of the Biosciences Institute at the Federal University of Mato Grosso do Sul (LPH/INBIO/UFMS) collaborated in the analysis of collected materials, including bone marrow aspirate (BMA), lesion edge biopsy, and slides. The materials were subjected to indirect parasitological examination and molecular diagnosis.

Indirect parasitological examination

The bone marrow aspirate (BMA) samples were inoculated into NNN biphasic medium with liquid phase of Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, SP/Brazil) supplemented with 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, SP/Brazil), 10,000 U.mL⁻¹ penicillin, 10 mg.mL⁻¹ streptomycin (Sigma-Aldrich, SP/Brazil), and 0.5 mL of male urine. The cultures were incubated at 26°C and observed for the presence of promastigotes, mobile flagellated forms, every seven days for six weeks [17,18].

For samples of biopsy material from the lesion edge, the biological material was washed three times in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, SP/Brazil) supplemented as described above [17]. The material was macerated and inoculated under uniform conditions to prevent contamination by bacteria and fungi.

Molecular diagnosis and species characterization

BMA, cutaneous lesion samples, and slide scrapings were used for molecular diagnosis. These materials were fixed, stained, and subjected to DNA extraction. The PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen, Waltham, United States) was used to extract DNA from the BMA and biopsy materials, following the manufacturer's instructions. Lesion edge biopsy slides were scraped with a scalpel, and DNA extraction followed the instructions for the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

The diagnosis was made using polymerase chain reaction (PCR) to identify a 300 base pair (bp) region of the ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1). The primers LITSR (5' CTGGATCATTTTCCGATG 3') and L5.8S (5' TGATACCACTTATCGCACTT 3') were utilized. For the polymerase chain reaction (PCR), a solution of 8 μ L ultrapure water, 10 μ L of 2x Conventional MasterMix Buffer (QuatroG Biotecnologia, Porto Alegre, Brazil), 1 μ L of each oligonucleotide (10 pm/ μ L), and 5 μ L of extracted DNA was prepared in a final volume of 25 μ L. The thermal gradient profile described by Schönian (2003) was followed [19]. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel, and the resulting bands were visualised using ultraviolet light.

The *Leishmania* species was identified through the use of the RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technique with PCR products. The products were digested with HaeIII restriction enzymes (isolated from *Haemophilus aegyptius*), which cleave fragments into segments with the 5'...GG▼CC...3' or 3'...CC Sequence ▲GG...5' [1]. The reaction consisted of a final volume of 20 μ L, including 15 μ L of pure ultra water, 2 μ L of 10x buffer, 1 μ L of HaeIII enzyme, and 2 μ L of PCR DNA. The sample was incubated at 37°C in a water bath for one hour and then for 20 minutes at 80°C. Subsequently, the material underwent electrophoresis in a 2% agarose gel with TBE buffer for two hours, and the bands were observed under ultraviolet light. The expected fragment sizes for identifying *L. infantum* are 50 bp and 200 bp, and for *L. amazonensis* they are 200 bp and 140 bp [19].

Results

Case 1

In November 2021, a 28-year-old male street vendor from Campo Grande, MS, was referred to Maria Aparecida Pedrossian University Hospital (HUMAP/UFMS) with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and syphilis. His CD4 count was 16 cells/mm³. The patient reported a loss of weight and an itchy rash, accompanied by the appearance of lesions that were pale and ulcerated, particularly in the upper and lower extremities. These lesions had first manifested two months prior. In the preceding two weeks, the patient exhibited symptoms of hyporexia, asthenia, odynophagia, fever (not measured), night sweats, and dry cough. Additionally, he reported an anus nodule that impeded bowel movements and caused bleeding. His medical history included a history of alcoholism, tobacco smoking for 10 years, and the use of illicit drugs, including cocaine, marijuana, and base paste. The patient's physical examination revealed a poor clinical state, with emaciation, dehydration, and pallor. Additionally, lymph node enlargement was observed in the retroauricular, anterior, and posterior cervical chains. Disseminated nodular lesions were observed predominantly in the face and limbs, in addition to hypochromic lesions in the upper limbs. No palpable visceromegaly or other alterations were detected. During the patient's hospitalization, amastigote forms of *Leishmania* sp. were observed in the bone marrow aspirate (BMA) and peripheral blood, as well as in the biopsy of skin lesions (Fig 1A and 1B). Additionally, he was diagnosed with pulmonary tuberculosis and esophageal candidiasis. He presented with severe pancytopenia and received a transfusion of three units of packed

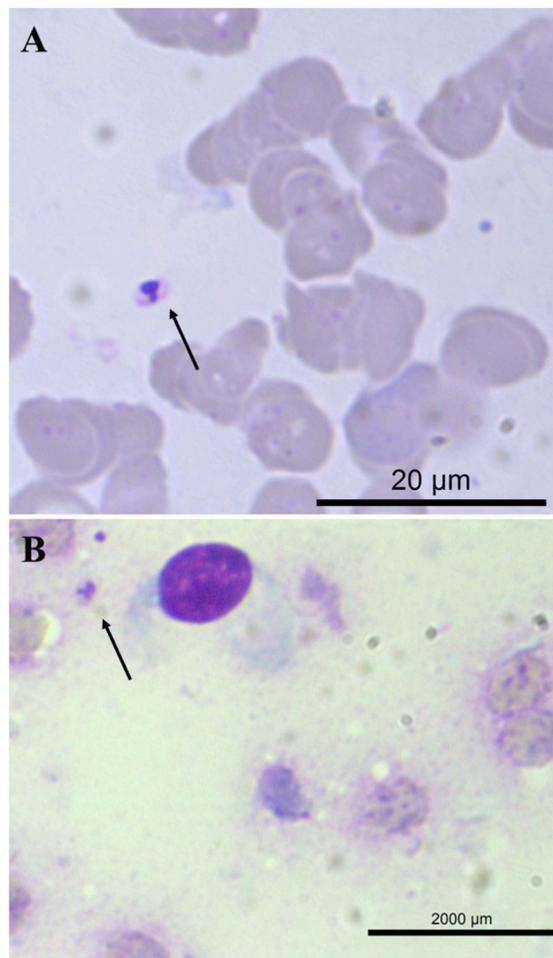


Fig 1. Diagnosis of leishmaniasis (Case 1): direct parasitological methods. (A) Amastigote form in bone marrow aspiration (arrow); (B) amastigote form found in skin lesion biopsy (arrow).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438.g001>

red blood cells. He commenced treatment for leishmaniasis with 50 mg/day of amphotericin B deoxycholate but was discharged from the hospital after six days without HAART. He declined to continue the treatment regimen despite being informed of its necessity.

In November 2021, samples of BMA and skin biopsy were submitted for an indirect parasitological test (axenic culture) and molecular diagnosis to the Human Parasitology Laboratory of the Biosciences Institute of the Federal University of Mato Grosso do Sul (LPH/INBIO/UFMS). Flagellated parasites were observed in the culture from the first week. A conventional PCR was performed using primers targeting a region of approximately 300 base pairs (bp) of the internal transcribed spacer region of the *Leishmania* ribosomal gene (ITS1), and the parasite DNA was successfully detected in both materials. The RFLP technique was employed for the identification of the species, and the amplification products of the positive samples were subjected to digestion with the restriction enzyme HaeIII (isolated from *Haemophilus aegyptius*) [19], which was compatible with *L. (L.) infantum* (Fig 2).

The patient returned to HUMAP in January 2022 with complaints of pain in facial lesions and difficulty swallowing solid food. A physical examination revealed that the facial lesions in the right malar and bilateral periauricular regions had worsened, with the presence of granulomatous tissue on a purplish-red background.

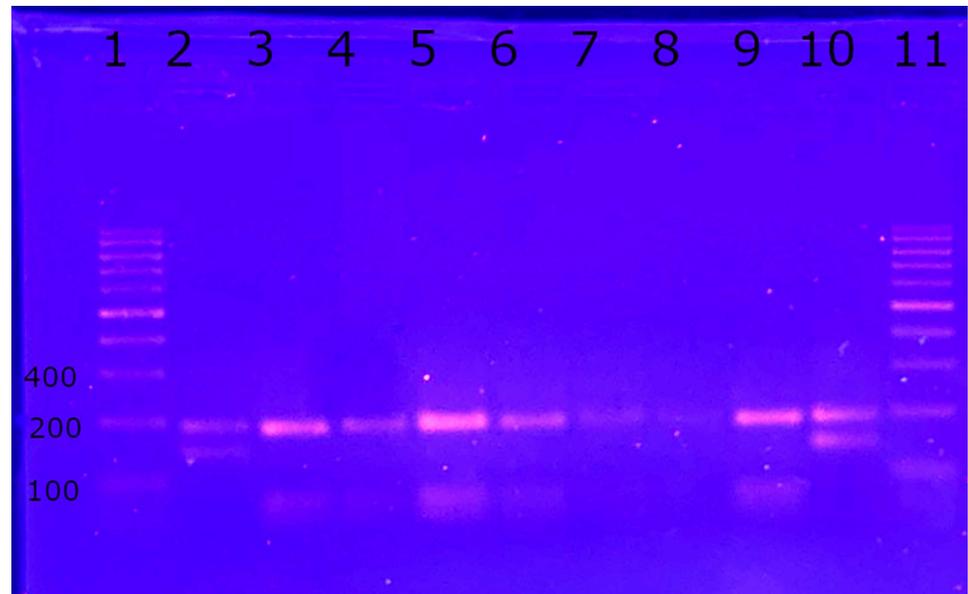


Fig 2. Molecular diagnosis by RFLP. Positive product amplifications underwent digestion with the HaeIII restriction enzyme. 1: Ladder 100 bp; 2: positive control for *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), fragments of approximately 140 and 200 bp. 3: positive control for *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/2022/072) fragments of approximately 50 and 200 bp. 4: Bone marrow aspirate (BMA) sample (Case 1). 5: Skin lesion biopsy sample (Case 1). 6: BMA sample (Case 2). 7: BMA sample (Case 3). 8: Skin lesion biopsy sample (Case 3). 9: positive control for *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2022/072). 10: positive control for *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8). 11: Ladder 100 bp.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438.g002>

He was admitted to the hospital for treatment of infectious diseases diagnosed in his previous hospitalization, as well as for cytomegalovirus (CMV) intestinal infection, histoplasmosis (identified from the fungal culture of a skin lesion), and COVID-19. Additionally, he was diagnosed with upper digestive hemorrhage. While hospitalized, he developed anemia and severe thrombocytopenia, with a CD4 count of 1 cell/mm³, requiring hemotransfusion and vasoactive drug therapy. The initial treatment consisted of 25 mg of amphotericin B deoxycholate, which was discontinued due to deterioration in renal function and replaced with liposomal amphotericin B (L-AmB). During this period, the patient underwent a 10-day course of treatment for tuberculosis, leishmaniasis, and histoplasmosis, in addition to antiretroviral therapy (ART) comprising dolutegravir 50 mg every 12 hours, tenofovir 300 mg per day, and lamivudine 300 mg per day. The patient was discharged from the hospital but was scheduled for maintenance treatment for leishmaniasis and histoplasmosis with liposomal amphotericin B (L-AmB) 200 mg once a week and follow-up with secondary prophylaxis. Subsequent to his discharge, the patient failed to adhere to the antiretroviral therapy (ART) regimen.

In March 2022, a second sample of BMA was collected from the patient during their period of hospitalization following the completion of treatment for leishmaniasis. The sample was analyzed at the LPH/INBIO/UFMS using direct and molecular parasitological diagnosis. Both methods yielded negative results. He was readmitted to HUMAP in early July 2022 due to severe anemia (hemoglobin concentration of 3.8 g/dL), profuse epistaxis, and bleeding from a skin lesion in his left nostril. However, he was discharged from the hospital three days after admission. He was readmitted to the hospital at the end of July 2022 in a significantly worsened clinical condition and passed away two days after hospitalization.

Fig 3 presents a timeline of the principal clinical events and associated therapeutic interventions for VL.

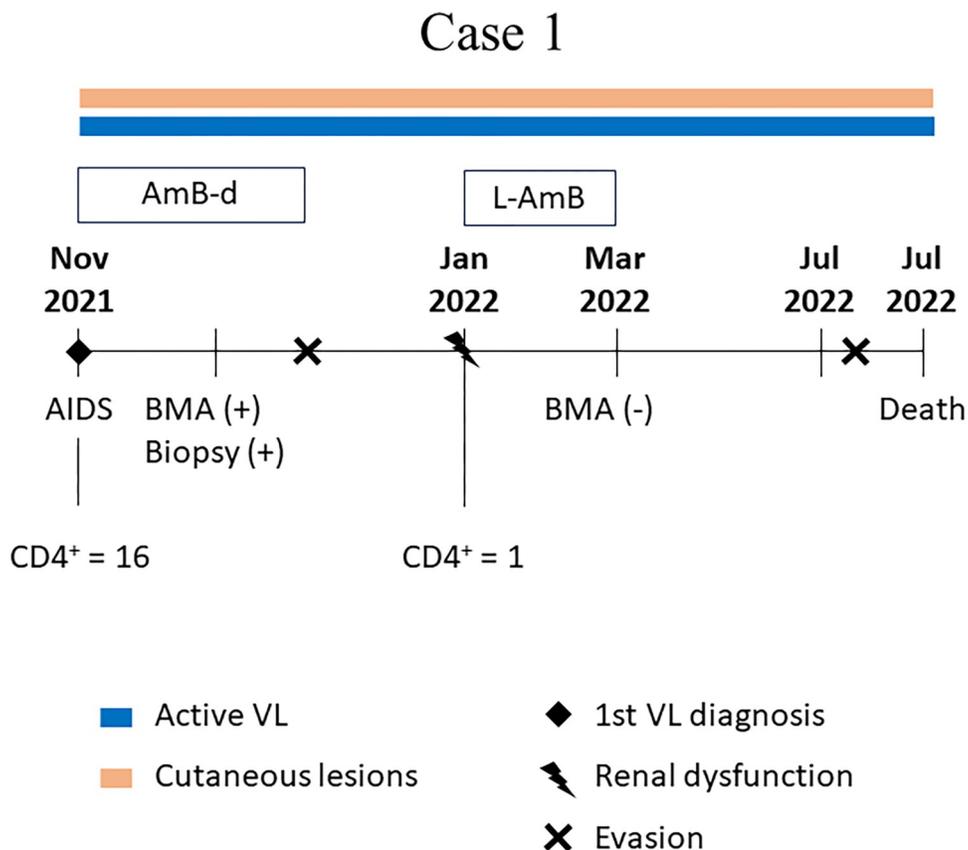


Fig 3. Main clinical events of Case 1. Timeline of the main events that occurred in case 1. AIDS: Acquired human immunodeficiency syndrome; L-AmB: liposomal amphotericin B; AmB-d: amphotericin B deoxycholate; BMA: bone marrow aspirate; VL: Visceral leishmaniasis; Biopsy: biopsy of skin lesions; (+) positive diagnostic; (-) negative diagnostic; CD4+: CD4 Lymphocyte count; vl: viral load.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438.g003>

Case 2

A 42-year-old male patient from Campo Grande, MS, was referred to HUMAP/UFMS in May 2017 for a follow-up of AIDS, diagnosed approximately 12 years earlier (2004). The patient reported a history of alcohol use disorder but denied smoking or using illicit drugs. At the appointment, the patient was in good health and was taking ART with tenofovir, lamivudine, and efavirenz. Additionally, the patient was receiving sulfamethoxazole and azithromycin as primary prophylaxis and L-AmB (200 mg injected every 21 days) as secondary prophylaxis for VL, which was diagnosed in 2016. Laboratory tests conducted in April 2017 demonstrated a CD4 count of 93.0 cells/mm³ and an undetectable viral load. On physical examination, the patient was in a satisfactory general state, hemodynamically stable, and no abnormalities were observed. In June 2017, the patient exhibited symptoms of chronic diarrhea, loss of appetite, and a general decline in condition. In November 2017, the antiretroviral regimen was modified to include zidovudine, lamivudine, and efavirenz due to the development of chronic kidney disease.

Despite the administration of L-AmB every 15 days as secondary prophylaxis, the patient experienced a recurrence of VL in January 2018. Consequently, the attack treatment was reintroduced. Concomitantly, the CD4 count was 123.0 cells/mm³, and the viral load was undetectable. Four months later, in July 2018, the patient returned with complaints of emotional

lability. Despite a diagnosis of VL and hepatosplenomegaly, the patient exhibited no apparent signs of illness upon physical examination. In September, the patient exhibited an undetectable viral load and a CD4 count of 47.0 cells/mm³. In February 2019, the patient experienced another relapse and received retreatment with L-AmB. In March 2019, the CD4 count was 57.0 cells/mm³, and the viral load was undetectable. In April 2019, the patient presented with discrete and diffuse erythematous papules and nodules on the face, anteroposterior trunk, upper limbs, and lower limbs. A skin biopsy was then performed, which revealed the presence of *Leishmania* sp. amastigotes. Concomitant severe and refractory pancytopenia was considered to be secondary to splenomegaly. In May, he underwent splenic embolization, which resulted in the development of sepsis and an episode of acute on chronic renal failure. Upon physical examination, the patient was found to be in a poor clinical state, exhibiting pallor, dehydration, and tachypnea. A leukocytosis with left deviation was identified during a blood test, and the blood cultures were found to be negative. Antimicrobial therapy with piperacillin-tazobactam and hemodialysis sessions were initiated to stabilise the patient's condition.

The patient demonstrated a notable improvement in his overall condition during the September 2019 follow-up. Laboratory tests demonstrated a glomerular filtration rate (GFR) of 63 mL/min/1.73 m², indicative of a significant recovery in kidney function. At that time, he was undergoing ART with abacavir, lamivudine, and dolutegravir. His CD4 count was 150 cells/mm³, and his viral load was undetectable. In November 2019, a recurrence of VL was observed, accompanied by the presence of *Leishmania* sp. amastigotes in both the BMA and skin lesion biopsy. This relapse resulted in hepatosplenomegaly and an increase in globulins, reaching 7 g/dL. Ten doses of pentamidine 150 mg were prescribed between December 2019 and January 2020. L-AmB was administered as a secondary prophylaxis every fifteen days until the CD4 count reached a level above 350 cells/mm³.

For the identification of *Leishmania* sp. species, BMA slides dated November 26, 2019 (Fig 4A), and skin lesion imprint slides dated April 9, 2019 (Fig 4B), were used. The biopsy material from the lesion was insufficient to yield a conclusive result. Nevertheless, the presence of *L. infantum* was confirmed in the BMA (Fig 2).

The patient returned for follow-up in February 2020 with an undetectable viral load and a CD4 count of 353.0 cells/mm³. By July 2020, the CD4 count had increased to 480.0 cells/mm³. In August 2020, the patient was discharged from secondary prophylaxis due to the favorable progress indicators and the absence of VL signs and symptoms. By November 2020, the patient's general and nutritional condition was satisfactory, and no changes were observed in laboratory tests during this period.

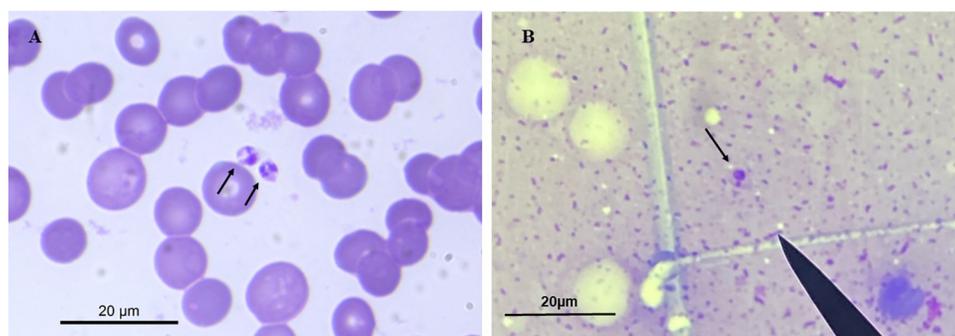


Fig 4. Diagnosis of leishmaniasis (Case 2): direct parasitological methods. (A) amastigote forms in bone marrow aspirate (arrows); (B) amastigote form found in a biopsy of skin lesions (arrow).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438.g004>

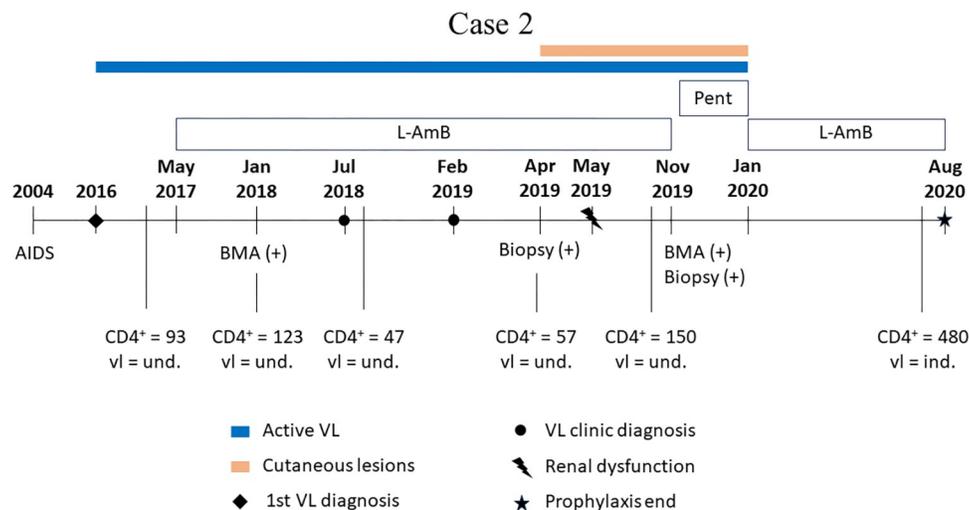


Fig 5. Main clinical events of Case 2. Timeline of the principal occurrences in Case 2. AIDS: Acquired human immunodeficiency syndrome; L-AmB: liposomal amphotericin B; AmB-d: amphotericin B deoxycholate; Pent: Pentamidine; BMA: bone marrow aspirate; VL: Visceral Leishmaniasis; Biopsy: biopsy of skin lesions; (+) positive diagnostic; (-) negative diagnostic; CD4+: CD4 Lymphocyte count; vl: viral load.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438.g005>

The most recent appointment at HUMAP occurred in February 2022, with no reports of adverse events or patient complaints. At the present time, he is being monitored at another outpatient clinic without any symptoms related to leishmaniasis.

[Fig 5](#) depicts the chronology of therapeutic approaches and pivotal clinical occurrences associated with VL.

Case 3

A 46-year-old male patient, a rural worker and bricklayer's assistant, a former smoker and drinker, and a resident of Campo Grande has been receiving follow-up care at HUMAP since 2014 due to AIDS. In 2016, he experienced an acute renal failure and was diagnosed with VL, neurotoxoplasmosis, tuberculosis, and porphyria cutanea tarda.

In February 2019, he was hospitalized for 13 days due to the presence of erythematous papules, bullous, crusted, and non-pruritic skin lesions on his lower limbs, which subsequently evolved to involve his upper limbs, trunk, face, and posterior cervical region ([Fig 6A and 6B](#)). At this time, the CD4 count was 121 cells/mm³, and the viral load was 83 copies/mm³. Despite the lack of improvement, in June he returned to the service complaining of spontaneous epistaxis (without triggering factors), hepatosplenomegaly, and pancytopenia. A bone marrow aspiration and biopsy of a skin lesion in the malleolar region were collected, and *Leishmania* sp. amastigotes were observed in both materials. The patient was administered liposomal amphotericin B (L-AmB) at a dose of 250 mg daily for a period of ten days, in addition to biweekly prophylaxis with the same drug.

The patient reported experiencing palpitations with a sudden onset while at rest on a monthly basis, beginning in September 2019. The patient was diagnosed with systemic arterial hypertension (SAH), hypertrophic cardiomyopathy, and pulmonary arterial hypertension. A CD4 count of 170 cells/mm³ with an undetectable viral load was observed in June 2020. Subsequently, the secondary prophylaxis for leishmaniasis was modified to an interval of 21 days. However, in July 2020, the dose of L-AmB was reduced to 150 mg due to alterations in renal function. Furthermore, in September 2020, the dose was reduced to 100 mg. The patient's

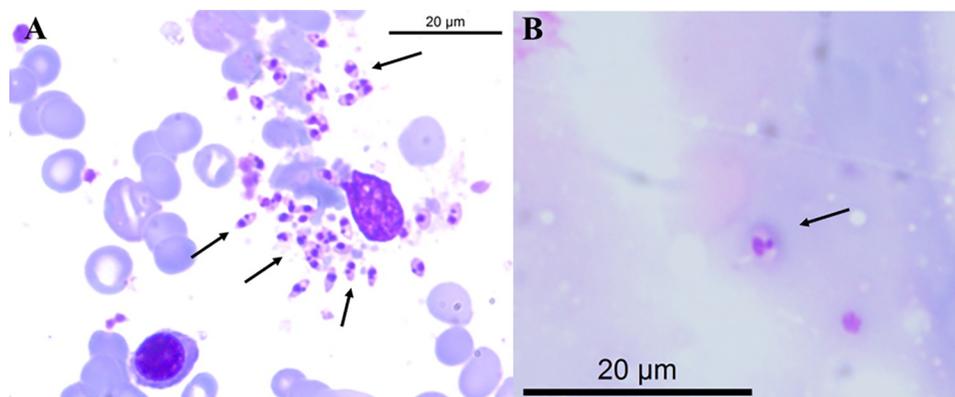


Fig 6. Diagnosis of leishmaniasis (Case 3): direct parasitological methods. (A) amastigote forms in bone marrow aspirate (arrows); (B) amastigote form found in a biopsy of skin lesions (arrow).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438.g006>

renal alterations persisted over the following month, necessitating his admission to the hospital for uninterrupted treatment while his renal, cardiac, and hepatic functions were closely monitored. The administration of L-AmB was gradual, beginning with a dosage of 1 mg/kg (one vial per day) for three days until a total cumulative dose of 200 mg was reached (adjusted for renal function at 3 mg/kg for a 63.5 kg patient over 10 days). In the same period, *Leishmania* spp. amastigotes were detected again due to erythematous papules persisting, as a result, a biopsy was performed at the edge of the skin lesion. The patient was discharged from the hospital 12 days after admission and then received 150 mg of secondary prophylaxis at the day hospital every 21 days. His CD4 count was 135 cells/mm³ with an undetectable viral load in December 2020.

BMA and biopsy of the skin lesion were performed in June 2019 and October 2020 (Fig 6A and 6B). The samples were sent to LPH/INBIO/UFMS for molecular diagnosis. As with Case 2, DNA was extracted from the scrapings of the slides, and the PCR and RFLP techniques identified *L. (L.) infantum* (Fig 2).

In February 2021, the nephrotoxicity of his medication for opportunistic infections with low functional reserve was evaluated. The treatment for leishmaniasis was modified to a thrice-weekly infusion of pentamidine with electrocardiogram (ECG) monitoring. The administration of the novel chemotherapy regimen resulted in a favorable clinical response, with an increase in the CD4 count to 223 cells/mm³ and a reduction in the viral load to undetectable levels.

Subsequently, a dermatologist was consulted, and a biopsy of a skin lesion on the lower abdomen was performed. The dermis exhibited a diffuse interstitial inflammatory infiltrate that contained primarily lymphocytes, histiocytes, and a few plasma cells. The presence of amastigote-like forms was observed, and an immunohistochemical analysis for *Leishmania* sp. was carried out, which yielded negative results. Consequently, secondary prophylaxis for leishmaniasis using pentamidine was scheduled to be administered biweekly.

The patient demonstrated a notable improvement in the latter half of 2022, with no new lesions, signs, or symptoms. Furthermore, the CD4 count increased to 397 cells/mm³, while the viral load was 45 copies/mm³. The patient completed the course of treatment with pentamidine following the final administration of the drug in March 2023. During a medical follow-up in July, the patient reported no fever, cough, sweating, weight loss, or other signs or symptoms of illness. Laboratory tests demonstrated a CD4 count of 353 cells/mm³ and an undetectable viral load. The patient was advised to return for a follow-up consultation in September.

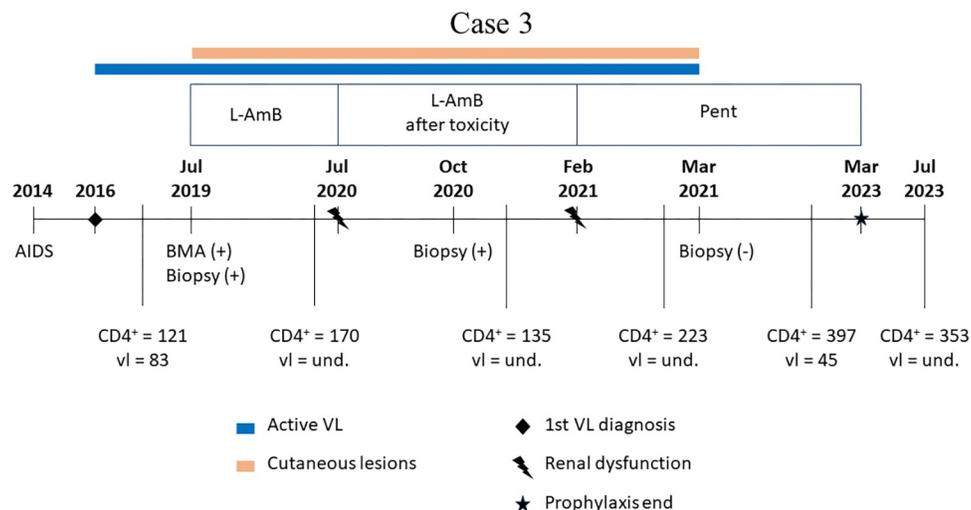


Fig 7. Main clinical events of Case 3. Timeline of the main events that occurred in case 3. AIDS: Acquired human immunodeficiency syndrome; L-AmB: liposomal amphotericin B; AmB-d: amphotericin B deoxycholate; Pent: Pentamidine; BMA: bone marrow aspirate; VL: Visceral Leishmaniasis; Biopsy: biopsy of skin lesions; (+) positive diagnostic; (-) negative diagnostic; CD4+: CD4 Lymphocyte count; lv: viral load.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438.g007>

Fig 7 illustrates the clinical events and therapeutic approach for case 3 of VL. A brief summary of the main events of the three cases is presented in Table 1.

Discussion

This study presents the first description of three cases that exhibit characteristics suggestive of para-kala-azar dermal leishmaniasis (para-KDL) in the Midwest region of Brazil. Para-KDL is characterized by the manifestation of visceral infection and skin lesions with abundant parasitic forms, and it is considered an intermediate form between PKDL and VL [9]. In immunosuppressed individuals, these manifestations are more frequent and severe [5].

Table 1. Summary of reported cases.

Cases	1	2	3
Direct Parasitological examination (Skin biopsy)	Amastigote forms of <i>Leishmania</i> sp.	Amastigote forms of <i>Leishmania</i> sp.	Amastigote forms of <i>Leishmania</i> sp.
Molecular diagnosis of Skin biopsy (RFLP)	<i>L. (L.) infantum</i>	insufficient material	<i>L. (L.) infantum</i>
Direct Parasitological examination (BMA)	Amastigote forms of <i>Leishmania</i> sp.	Amastigote forms of <i>Leishmania</i> sp.	Amastigote forms of <i>Leishmania</i> sp.
Molecular diagnosis of BMA (RFLP)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
Amphotericin B deoxycholate (order of drug administration)	Yes (1 st)	No	No
Liposomal Amphotericin B	Yes (2 nd)	Yes (1 nd /3 th)	Yes (1 st)
Pentamidine	No	Yes (2 nd)	Yes (2 nd)
Secondary Prophylaxis	abandonment	Yes	Yes
Relapses	0	3	1
Duration of follow-up	-	5 years (2016–2020)	5 years (2019–2023)
Outcome	death	completed secondary prophylaxis	completed secondary prophylaxis

1st, 2nd and 3th—order of administration of the medication. BMA: Bone Marrow Aspiration.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012438.t001>

The pathophysiology and immune responses in VL/HIV co-infection and para-KDL are different. In VL/HIV co-infection, the immune response is predominantly of the Th2 type, characterized by reduced levels of IL-12, IL-18, and IFN- γ . On the other hand, in para-KDL, the immune response is a combination of Th1/Th2 profiles, with production of IFN- γ and persistence of IL-10, as well as a Th17 response. While VL/HIV co-infection induces an immune response more inclined towards Th2, in para-KDL a mixture of Th1 and Th2 responses is observed, accompanied by the presence of a Th17 response [5,20,21].

Para-KDL has great epidemiological importance because human patients can serve as a reservoir for *Leishmania* spp. and play a crucial role in the anthroponotic transmission of the parasite [9,21,22].

All three case reports describe patients diagnosed with AIDS who also had active VL and concomitant skin lesions (Table 1). The clinical manifestations of VL were consistent across all cases, including fever, hepatosplenomegaly, pancytopenia, and disseminated skin lesions. Furthermore, amastigote forms were observed in both BMA and skin lesion biopsies. The presence of *L. (L.) infantum* was confirmed through RFLP analysis of the samples, providing strong support for the clinical diagnosis of para-KDL.

The available CD4 count data is described in the timeline of each case. Unfortunately, we do not have cytokine dosages to assess the systemic inflammatory response and the cutaneous inflammatory response in terms of TH1 or TH2 predominance separately. The low CD4 count suggests that a systemic TH2 response may have predominated, making it difficult to control the leishmaniasis [5].

The co-infection of HIV and *Leishmania* spp. has the potential to compromise the cellular immune response, which could in turn affect the evolution of the immune response to both agents. The observed improvement in CD4 count may have resulted from the control of *Leishmania* infection through the use of leishmanicidal drugs, while the control of skin lesions may have resulted from the improvement in CD4 count due to the use of HAART. These phenomena have been well documented in the studies of Zijlstra [5,23].

In the three cases presented here, dermal lesions cannot be classified as disseminated cutaneous leishmaniasis (DL) due to the following reasons: although the clinical characteristics of the lesions may exhibit some degree of overlap, the parasite identified in these cases was *L. (L.) infantum*, while the two species recognized as causing DL are *L. (Viannia) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*. In none of the cases were there reports of primary lesions before the description of multiple lesions, which could suggest hematogenous or lymphatic dissemination of the parasite, as occurs in DL. Additionally, there were no accompanying mucosal lesions, which can be present in up to 30% of patients with DL. It is notable that the prevalence of the parasite in the disseminated form is lower compared to the diffuse form. Moreover, the lesions do not correspond with the clinical presentation of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), which is characterized by extensive verrucous plaques and mucosal lesions [24].

Concomitant skin involvement in AIDS-associated VL, with identification of *L. infantum* in the skin lesions, has been considered an atypical manifestation of VL due to severe immunosuppression [25,26]. Cases can only be characterized as para-KDL when they present clinical and immunopathogenic characteristics similar to PKDL [13], along with macropapular lesions distributed on the face, trunk, and in patients who have already started antileishmanial treatment. This suggests that specific cellular immunity has begun to be restored. However, in patients with AIDS, PKDL/para-KDL manifests in a manner distinct from that observed in non-AIDS patients. This is attributed to the profound reduction in CD4 T lymphocytes, which is accompanied by a notable prevalence of amastigotes within the lesions and a more pronounced and extensive clinical presentation [5]. The complex interaction between the immune response and the parasite gives rise to a multitude of designations that may be overlapping and

even confusing. There arises, therefore, a need for the adoption of a nomenclature that allows for accurate diagnosis and proper procedures [5].

Cases 2 and 3 describe the characteristics of the chronic active visceral form of the disease, in which the continuous multiplication of parasites is observed, signs and symptoms persisting even under prophylaxis [27]. Additionally, the patients experienced relapses of VL, which is likely attributable to the immunosuppressive effects of HIV. Furthermore, immunodeficiency is associated with ART, secondary prophylaxis, and CD4 lymphocyte count [28,29].

In HIV patients, a CD4 count below 200 cells/mm³ is a significant prognostic factor for survival, with the potential to facilitate the development of opportunistic diseases, such as VL [30,31]. This is demonstrated by comparing the low CD4 count of the three reported patients to the onset of symptoms and the diagnosis confirmation for VL. Cases 2 and 3 demonstrated an improvement in the clinical picture upon an increase of these cells.

The clinical manifestations of HIV/VL coinfection may be atypical, involving the gastrointestinal and respiratory tracts, and kidneys, and inducing hemorrhagic phenomena (epistaxis, ecchymosis, and hematuria) [32,33]. In all cases reported, the patients exhibited chronic kidney disease. Furthermore, cases 2 and 3 exhibited evidence of cardiovascular and hepatic involvement. In Case 3, pulmonary arterial hypertension was observed, with multiple possible etiological factors (HIV infection, cardiomyopathy, chronic obstructive pulmonary disease, and chronic kidney disease).

In the Americas, the Pan American Health Organization (PAHO) recommends the use of amphotericin B for the treatment of HIV/VL coinfection, as well as the practice of secondary prophylaxis in all patients with CD4 counts below 350/mm³ [34].

Our service followed the recommendations of the 'Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento de Pacientes com o Coinfecção *Leishmania*-HIV' (Manual of Recommendations for the Diagnosis, Treatment and Follow-up of Patients with *Leishmania*-HIV Coinfection) [35] during the patients' treatment period. Accordingly, the recommended initial treatment was amphotericin B deoxycholate at a dose of 1 mg/kg/day (with a maximum daily dose of 50 mg and a total cumulative dose of 40 mg/kg/day). Alternatively, liposomal amphotericin B at a dose of 2 mg/kg/day (with a maximum daily dose of 40 mg/kg and a total cumulative dose of 40 mg/kg/day) could be considered in the event of adverse reactions or in individuals over the age of 50. As a second-line treatment, pentamidine at a dose of 4 mg/kg/day (administered in ten doses every other day) could be employed in the event of therapeutic failure with amphotericin.

In the context of the secondary prophylaxis regimen, it is recommended that the aforementioned dosages be administered every two weeks or every four weeks. The treatment plan is designed to accommodate the patient's tolerance, taking into account factors such as the toxicity profile and potential interactions, as well as the conditions of the healthcare service [35]. In all three cases, the protocols were followed as closely as possible. However, modifications were necessary in cases 2 and 3 due to observed toxicity, with the aim of preventing further harm to the patients. Furthermore, studies have demonstrated that the administration of a combination of two drugs is an effective method for eliminating parasites in patients with PKDL and para-KDL [11,34].

In general, patients with HIV/VL have low cure rates and high mortality rates. Treatment is complex and can result in therapeutic failure, high toxicity, and drug resistance [36]. The current literature indicates that early diagnosis and treatment, as well as regular secondary prophylaxis and follow-up care provided by a multidisciplinary team, are of significant importance. This approach led to improved survival rates and even a complete clinical cure of skin lesions in Case 2. In Case 1, the patient prematurely terminated the treatment regimen, resulting in a deterioration of his condition upon his return, ultimately leading to his demise.

In Cases 2 and 3, the patients were treated with a combination of drugs, initially amphotericin B, followed by pentamidine. The efficacy of this approach is evident from the favourable outcomes observed in both cases.

In Brazil, the public healthcare system includes two drugs for the treatment of VL patients: meglumine antimoniate (first-choice drug) and amphotericin B. The criteria for drug choice are related to contraindications, especially regarding the toxicity of meglumine antimoniate, which is not recommended for patients with renal or hepatic insufficiency, pregnant women and HIV patients [35]. Both treatments are conducted in a hospital setting, which may contribute to low compliance and high dropout rates.

Another factor that is worthy of consideration is the elevated expense associated with antileishmanial treatment [36]. As previously reported in Cases 2 and 3, the process from diagnosis to treatment completion can be lengthy, with Case 3 spanning over five years. The patient in Case 3 is still on secondary prophylaxis. It is important to note that all administration of drugs for VL occurs in a hospital environment, which is costly and occupies beds, supplies, and requires periodic tests to monitor drug toxicity. These costs are a significant burden on health systems and on patients themselves, who lose days of work and must pay for transportation to the health unit [37].

The report discusses cases with symptoms that may overlap with other comorbidities, including syphilis, histoplasmosis, tuberculosis, and other conditions related to the prevalent PLECT syndrome in Brazil [38,39]. This underscores the significance of para-KDL as a differential diagnosis in endemic areas, which can result in more favourable outcomes for patients.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Finance Code 001, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, and Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência, e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul-FUNDECT.

Author Contributions

Conceptualization: Natália O. Alves, Silvia N. O. Uehara, Carla C. P. Arruda, Alessandra G. Oliveira.

Data curation: Natália O. Alves, Jéssica A. Oshiro, Gabriela C. Pacher, Yasmin S. Rizk, Anamaria M. M. Paniago, Isadora L. X. Andrade.

Investigation: Natália O. Alves, Jéssica A. Oshiro, Yunna C. Silva, Gabriela C. Pacher, Aline E. Casaril, Silvia N. O. Uehara, Anamaria M. M. Paniago, Isadora L. X. Andrade.

Methodology: Natália O. Alves, Yunna C. Silva, Gabriela C. Pacher, Silvia N. O. Uehara.

Project administration: Alessandra G. Oliveira.

Visualization: Silvia N. O. Uehara, Anamaria M. M. Paniago.

Writing – original draft: Natália O. Alves, Jéssica A. Oshiro, Yunna C. Silva, Gabriela C. Pacher, Aline E. Casaril, Yasmin S. Rizk, Isadora L. X. Andrade, Carla C. P. Arruda, Alessandra G. Oliveira.

Writing – review & editing: Natália O. Alves, Aline E. Casaril, Anamaria M. M. Paniago, Carla C. P. Arruda, Alessandra G. Oliveira.

References

1. PAHO/WHO. Leishmaniose visceral—OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. 2023 [cited 23 Jun 2023]. Available: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-visceral>
2. Engels D, Zhou X-N. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious Diseases of Poverty*. 2020; 09: 9–17. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-0630-9> PMID: 31987053
3. WHO world HO. Leishmaniasis. 2023 [cited 23 Jun 2023]. Available: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>
4. Carvalho LS, das Graças Braga M, da Silva Costa DA, Simões TC, Lula MD, Silveira MR. Lethality among individuals infected with visceral leishmaniasis in Brazil: a retrospective study (2007–2018). *Parasitol Res*. 2022; 121: 725–736. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07429-3> PMID: 35013872
5. Zijlstra EE. PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e3258. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003258> PMID: 25412435
6. Diro E, Lynen L, Ritmeijer K, Boelaert M, Hailu A, Griensven J van. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in East Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8: e2869. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002869> PMID: 24968313
7. Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV/AIDS—Research and Palliative Care*. 2018; 10: 193–201. <https://doi.org/10.2147/HIV.S143929> PMID: 30410407
8. Trindade MAB, Silva LL da C, Braz LMA, Amato VS, Naafs B, Sotto MN. Post-kala-azar dermal leishmaniasis and leprosy: case report and literature review. *BMC Infectious Diseases*. 2015; 15: 543. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1260-x> PMID: 26592919
9. Zijlstra E, Musa A, Khalil E, El Hassan I, El-Hassan A. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2003; 3: 87–98. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00517-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00517-6) PMID: 12560194
10. Moniruzzaman M, Been Sayeed SKJ, Rahim MdA, Hassan R, Rahman MdM. Para Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Case Report. *Cureus*. 2023 [cited 27 Jul 2023]. <https://doi.org/10.7759/cureus.33701> PMID: 36788910
11. Maruf S, Sagar SK, Rashid MMU, Nath P, Islam MS, Ghosh P, et al. Revisiting the diagnosis and treatment of Para Kala-azar Dermal Leishmaniasis in the endemic foci of Bangladesh. *PLOS ONE*. 2023; 18: e0280747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280747> PMID: 36662825
12. Roselino AM, Chociay MF, Costa RS, Machado AA, Figueiredo JF de C. L. (L.) chagasi em lesões cutâneas na co-infecção aids-calazar. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2008; 50: 251–254.
13. Carnaúba D, Konishi CT, Petri V, Martinez ICP, Shimizu L, Pereira-Chiocola VL. Atypical disseminated leishmaniasis similar to post-kala-azar dermal leishmaniasis in a Brazilian AIDS patient infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi: a case report. *International Journal of Infectious Diseases*. 2009; 13: e504–e507. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.01.022> PMID: 19447660
14. Lindoso JAL, Moreira CHV, Celeste BJ, Oyafuso LKM, Folegatti PM, Zijlstra EE. Para-kala-azar dermal leishmaniasis in a patient in Brazil: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018; 51: 105–107. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0487-2016> PMID: 29513829
15. Bittencourt A, Silva N, Straatmann A, Nunes VLC, Follador I, Badaró R. Post-kala-azar dermal leishmaniasis associated with AIDS. *Braz J Infect Dis*. 2003;7. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702003000300009> PMID: 14499047
16. MATO GROSSO DO SUL. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA 2022. Secretaria de Saúde do Mato Grosso do Sul; 2023. Available: https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/02/Boletim_leish_visceral_023-Final.pdf
17. Cardozo Pinto de Arruda C, de Jesus Haroim D, Silva Rizk Y, da Silva Freitas de Souza C, Zaverucha do Valle T, Bento Carvalho D, et al. A Triazole Hybrid of Neolignans as a Potential Antileishmanial Agent by Triggering Mitochondrial Dysfunction. *Molecules*. 2020; 25: 37. <https://doi.org/10.3390/molecules25010037> PMID: 31861910
18. Santos RC dos, Pinho FA de, Passos GP, Lorangeira DF, Barrouin-Melo SM. *Isolamento de Leishmania infantum* naturalmente infectante a partir de amostras caninas em meio Novy-MacNeal-Nicolle preparado com sangue desfibrinado de diferentes espécies animais. *Veterinary Parasitology*. 2018; 257: 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.010> PMID: 29907186
19. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003; 47: 349–358. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00093-2) PMID: 12967749

20. Khalil EAG, Khidir SA, Musa AM, Musa BY, Elfaki MEE, Elkadaru AMY, et al. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Paradigm of Paradoxical Immune Reconstitution Syndrome in Non-HIV/AIDS Patients. *Journal of Tropical Medicine*. 2013; 2013: e275253. <https://doi.org/10.1155/2013/275253> PMID: 23634148
21. Rodrigues MZA, Grassi MFR, Mehta S, Zhang X-Q, Gois LL, Schooley RT, et al. Th1/Th2 Cytokine Profile in Patients Coinfected with HIV and Leishmania in Brazil. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011; 18: 1765–1769. <https://doi.org/10.1128/CVI.00076-11> PMID: 21832098
22. Rahman KM, Islam S, Rahman MW, Kenah E, Ghalib CM, Zahid MM, et al. Increasing incidence of post-kala-azar dermal leishmaniasis in a population-based study in Bangladesh. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 73–76. <https://doi.org/10.1086/648727> PMID: 19951168
23. Zijlstra EE. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasites & Vectors*. 2016; 9: 464. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1721-0> PMID: 27553063
24. Brasil M da S. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2nd ed. Ms; 2010.
25. Orsini M, Silva M, Luz ZMPD, Disch J, Fernandes O, Moreira D, et al. Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35: 259–262. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822002000300011> PMID: 12045821
26. Cossart C, Le Moal G, Garcia M, Frouin E, Hainaut-Wierzbicka E, Roblot F. Manifestations cutanées inhabituelles au cours d'une leishmaniose viscérale associée au VIH. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 2016; 143: 841–845. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2016.09.027> PMID: 27742137
27. Cota GF, de Sousa MR, de Assis TSM, Pinto BF, Rabello A. Exploring prognosis in chronic relapsing visceral leishmaniasis among HIV-infected patients: Circulating *Leishmania* DNA. *Acta Tropica*. 2017; 172: 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.011> PMID: 28501450
28. Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML de, Sena JM de, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*. 2008; 24: 2941–2947. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2008001200024> PMID: 19082286
29. Kubar J, Marty P, Lelièvre A, Quaranta J-F, Staccini P, Caroli-Bosc C, et al. Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. *AIDS*. 1998; 12: 2147. <https://doi.org/10.1097/00002030-199816000-00009> PMID: 9833855
30. Cota GF, Sousa MR de, Rabello A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-Infected Patients: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2011; 5: e1153. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001153> PMID: 21666786
31. Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Patients: A Comparative Study. *Medicine*. 2001; 80: 54.
32. Lindoso JA, Cota GF, Cruz AM da, Goto H, Maia-Elkhoury ANS, Romero GAS, et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8: e3136. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003136> PMID: 25233461
33. Silva BBL da, Alves AKR, Almeida BC de, Pereira R de B, Castro MR de, Santos VAPP, et al. Análise dos perfis epidemiológicos da leishmaniose visceral e da coinfeção leishmaniose visceral-HIV no Piauí, 2007 a 2019. *Research, Society and Development*. 2021; 10: e126101220247–e126101220247. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20247>
34. PAHO/WHO OP de la S. Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição. Pan American Health Organization; 2022. <https://doi.org/10.37774/9789275725030>
35. BRASIL M da S. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. 2015; 109.
36. Singh OP, Sundar S. Immunotherapy and Targeted Therapies in Treatment of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Future Prospects. *Frontiers in Immunology*. 2014;5. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00296>
37. Sunyoto T, Boelaert M, Meheus F. Understanding the economic impact of leishmaniasis on households in endemic countries: a systematic review. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2019; 17: 57–69. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1555471> PMID: 30513027
38. Brito ECA, Franca T, Canassa T, Weber SS, Paniago AMM, Cena C. Paracoccidiodomycosis screening diagnosis by FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2022; 39: 102921. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102921> PMID: 35598713
39. Oppermann K, Cocco AR, Heck R, Bonamigo RR. PLECT or PPLECT? Granulomatous pyoderma gangrenosum in the differential diagnosis of the verrucous syndrome. *An Bras Dermatol*. 2018; 93: 605–607. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187329> PMID: 30066779

Capítulo 2

Manuscrito sobre o perfil da leishmaniose visceral. Intenção de submissão à revista
“AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE”

Perfil Clínico-Epidemiológico de Adultos com Suspeita de Leishmaniose Visceral Atendidos no Hospital Referência de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

Natália Oliveira Alves^{1,2}, Everton Falcão de Oliveira^{2,4}, Jéssica Ayumi Oshiro⁴, Emanuela Corrêa da Costa de S. Soares⁴, Giulia Menezes de Mendonça⁵, Jucelei de Oliveira Moura Infran^{1,2}, Aline Etelvina Casaril¹, Anamaria Melo Miranda Paniago^{2,4,5}, Eliane Mattos Piranda¹, Carla Cardozo Pinto de Arruda^{1,3}, Alessandra Gutierrez de Oliveira^{1,2}.

¹ Laboratório de Parasitologia Humana, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴ Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁵ Instituto Integrado de Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Autor correspondente

Alessandra Gutierrez de Oliveira, Laboratory of Human Parasitology, Institute of Biosciences and Graduate Program in Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

E-mail: alessandra.oliveira@ufms.br

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada que tem destaque entre as principais condições de saúde negligenciadas globalmente, caracterizada por um espectro crônico e sistêmico, podendo ser grave e letal se não tratada. As regiões tropicais e subtropicais constituem as regiões de maior prevalência. O Brasil contribui com parcela significativa dos casos globais e o estado de Mato Grosso do Sul apresenta-se como uma área endêmica para essa enfermidade. O objetivo do estudo foi traçar o perfil epidemiológico de pacientes adultos com suspeita ou diagnóstico confirmado de LV atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Foram coletados dados clínicos e epidemiológicos dos prontuários médicos, bem como o resultado do diagnóstico parasitológico indireto e molecular. Dos 127 pacientes incluídos no estudo, 40 foram diagnosticados com LV. Houve uma prevalência mais alta entre pacientes do sexo masculino, não-brancos, com uma média de idade 39,7 anos. Na análise da associação entre o diagnóstico positivo para LV e as covariáveis do perfil clínico-epidemiológico, observou-se que a presença de pancitopenia, tabagismo e lesões cutâneas estão diretamente associadas à doença. Esses fatores sugerem um aumento potencial no risco de adoecimento por LV. A coinfeção com HIV/LV foi observada em 33 dos 40 pacientes com LV. A profilaxia secundária para LV foi mais frequente nos casos positivos. No que tange à gravidade da doença, foi observada uma associação significativa com anemia, lesão cutânea e doenças pulmonares e renais. Este estudo forneceu uma visão abrangente do panorama epidemiológico e clínico da LV em Mato Grosso do Sul, destacando a complexidade da doença e a necessidade de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento.

Palavras-chave: Diagnóstico. Epidemiologia. Hospital de referência. Leishmanioses.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical que figura entre as dez principais condições de saúde negligenciadas globalmente. Apresenta caráter crônico e sistêmico, sendo grave e letal quando não tratada^{1,2}. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo³⁻⁵.

As regiões mais impactadas pela LV são as tropicais e subtropicais, com maior incidência em populações vulneráveis. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se anualmente a ocorrência de 50.000 a 90.000 novos casos de LV em todo o mundo, sendo notificados apenas entre 25% e 45% desses casos. O Brasil destaca-se entre os sete países responsáveis por mais de 90% dos casos globais de LV, sendo reconhecido como região endêmica para a doença ^{2,6}.

No decorrer de 2022, foram identificados 152 casos de LV no estado de Mato Grosso do Sul, com letalidade de 12,5%, o que representa um aumento de 50% em comparação com o ano de 2021. Ao analisar a estratificação dos municípios sul-mato-grossenses em relação à taxa de transmissão, observou-se que os municípios de Campo Grande, Três Lagoas, Corumbá e Aquidauana foram categorizados como áreas de intensa transmissão ⁷.

A morbidade da LV representa um significativo desafio para a saúde pública, resultante tanto de fatores ambientais, como migrações, conflitos de guerra, urbanização, desmatamento e mudanças climáticas, assim como de fatores individuais, incluindo a coinfeção *Leishmania*-HIV, desnutrição e predisposição genética ^{6,8}. Esses fatores também estão relacionados a novos padrões epidemiológicos, evidenciando a importância da vigilância epidemiológica ^{9,10}.

O objetivo deste estudo foi descrever o perfil epidemiológico de pacientes adultos com suspeita clínica de LV atendidos no serviço de saúde do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Humap-UFMS/Ebserh), Brasil, no período de agosto de 2021 a junho de 2023.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEP/UFMS 4.628.192) e pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (nº 6/2021/SGPIT/GEP/HUMAP-UFMS EBSEH).

Delineamento do estudo

Trata-se de estudo descritivo transversal que utilizou dados primários obtidos a partir de diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico e dados clínicos e epidemiológicos de prontuários médicos com suspeita clínica de LV.

Local, período e dados do estudo

O estudo foi realizado no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, localizado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Este hospital é referência estadual para o diagnóstico e tratamento de leishmaniose visceral e tegumentar. Entre agosto de 2021 e junho de 2023, todos os pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, admitidos no hospital com suspeita de LV, foram considerados elegíveis e recrutados para o estudo.

Como rotina da triagem hospitalar, todos os pacientes com suspeita de LV realizaram o exame parasitológico direto para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em aspirado de medula óssea (AMO). Adicionalmente, para este estudo, foram realizados exames complementares, tais como, diagnóstico parasitológico indireto (cultura) e molecular (reação em cadeia da polimerase - PCR) no Laboratório de Parasitologia Humana do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (LPH/INBIO/UFMS).

Dados clínicos e epidemiológicos foram coletados dos prontuários médicos:

procedência, zona de moradia (rural/urbana), idade, sexo, escolaridade, hábitos de vida (tabagismo, alcoolismo, drogas ilícitas), quadro clínico sugestivo de LV (anemia, pancitopenia, fadiga/astenia/fraqueza, febre, hiporexia, dor abdominal, diarreia, vômito, perda ponderal, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, tosse, sangramento), sinais de gravidade para formas graves de LV, medicamentos em uso, profilaxia secundária para LV (específico para pessoa vivendo com HIV/AIDS), caso de recidiva de LV, evolução (óbito/cura clínica), comorbidades e presença de infecções oportunistas.

Diagnóstico de leishmaniose visceral

Foram considerados como casos suspeitos de LV pacientes que apresentaram sinais clínicos de febre e esplenomegalia, provenientes de área com registros de transmissão de LV¹¹.

Os casos foram confirmados a partir de um dos seguintes diagnósticos: exame parasitológico direto (presença de formas amastigotas no AMO, realizado no laboratório do HUMAP), presença de formas promastigotas em cultura (exame parasitológico indireto) ou diagnóstico molecular (PCR), ambos conduzidos no LPH/INBIO/UFMS.

Diagnósticos realizados no LPH/INBIO/UFMS

Parasitológico indireto

No diagnóstico parasitológico indireto, as amostras de aspirado de medula óssea (AMO) foram inoculadas em meio de cultura bifásico NNN, enriquecido com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (estreptomicina e penicilina) e 2% de urina masculina. As culturas foram mantidas em estufa a 26°C, e observadas a cada sete dias, durante seis semanas consecutivas para verificar a presença de promastigotas ^{12,13}.

Diagnóstico Molecular

O DNA genômico de amostras de AMO foi extraído usando o kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen, Waltham, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante. Já as lâminas com esfregaço de AMO foram raspadas com bisturi, e a extração de DNA seguiu as instruções do kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). A técnica da extração de DNA em lâmina só foi empregada quando o material de AMO foi insuficiente. Para validar a extração e como controle endógeno de reação, foi realizada uma PCR utilizando como alvo o gene Beta Actina. Utilizou-se 1,5 µL da amostra de DNA, 22,5 µL de PCR SuperMix (Invitrogen, USA), 0,5 µL para cada oligonucleotídeo FWD (5'-CGGAACCGCTCATTGCC - 3') e REV (5' - ACCCACA CTGTGCCCATCTA -3') com o volume final de 25 µL. A reação foi submetida às seguintes condições de amplificação no termociclador (BIO RAD, EUA): 94°C por 2 min seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min, com pós-extensão a 72°C por 5 min.¹⁴. Para o controle negativo, foi utilizada uma amostra sem DNA contendo apenas água ultrapura, e como controle positivo uma amostra com DNA humano extraído de sangue periférico.

Subsequentemente, foi realizada uma PCR convencional visando uma região de aproximadamente 300 pares de bases (bp) do espaçador transcrito interno do gene ribossômico de *Leishmania* sp. (ITS1). Para essa reação usou-se 8 µL (≅10 ng/µL) da amostra, 10 µL de MasterMix PCR Convencional 2x (quatroG, Brasil), 1 µL de cada oligonucleotídeo LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATA CCACTTATCGCACTT-3'); 5 µL de água pura foram adicionados para um volume final de reação de 25 µL. A reação foi colocada em condições de amplificação no termociclador (BIO RAD, EUA): 95°C por 3 min seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min, com pós-extensão a 72°C por 5 min¹⁵ (Schönian et al., 2003). Como controles positivos, foram usados DNA de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2022/LV072_22) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) extraídos de cultura e, como controle negativo, foi adicionada água pura no lugar do DNA.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em 100 mL de tampão Tris-borato-etilenodiamina tetracético (TBE) corado com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Brasil). A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 80 min em tampão TBE concentrado. A visualização das bandas foi realizada utilizando luz ultravioleta. As bandas com tamanho aproximado de 300 pb visualizadas no gel foram consideradas positivas para LV¹⁵.

Gravidade da doença

Os pacientes foram classificados como casos graves quando apresentavam ao menos um dos seguintes critérios: idade superior a 65 anos, desnutrição grave, óbito, comorbidades ou manifestações clínicas de icterícia e hemorragias. Foram também classificados como indicadores de alerta para possível agravamento, a idade entre 50 e 65 anos, histórico de recidiva, presença de diarreia, vômitos, suspeita de infecção bacteriana ou febre persistente por mais de 60 dias. Todos esses critérios estão estabelecidos no manual do Ministério da Saúde "Leishmaniose Visceral Grave - Normas e Condutas" ¹¹.

Análise de dados

Tabelas de distribuição de frequências e gráficos foram utilizadas para descrever e caracterizar o perfil da população do estudo. Para avaliar a associação entre a positividade para LV e as variáveis do perfil clínico-epidemiológico, foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando aplicável. Para as variáveis numéricas, foi verificada a diferença de médias com o teste Mann-Whitney.

O modelo de regressão logística binomial foi utilizado para avaliar a associação entre desfecho e os dados laboratoriais e covariáveis relacionadas às comorbidades dos participantes do estudo. Covariáveis que apresentaram associação com *p*-valor menor ou igual a 0,20 foram incluídas na análise multivariada. O algoritmo *stepwise* (considerando as

duas direções *backward* e *forward*) e o critério de informação de Akaike (AIC) foram utilizados para a seleção das variáveis, controle de possíveis fatores de confusão e definição do modelo com melhor ajuste. A presença de multicolinearidade foi analisada *a priori* pela análise da matriz de correlação das variáveis independentes e *a posteriori* pelo *Variance Inflation Factor* (VIF). Como medida de ajuste, foi utilizado o teste de Hosmer e Lemeshow. O nível de significância estatística adotado para todos os testes de hipóteses foi de $p \leq 0,05$.

A análise foi realizada com o software R versão 4.3.2 (<https://www.r-project.org/>) e os seguintes programas foram usados: *tidyverse*, *descr* e *generalhoslem*.

Para avaliar a relação entre o diagnóstico positivo para LV e as covariáveis referentes ao perfil clínico-epidemiológico, considerando possíveis confusões e interações, foi adotado o modelo de regressão logística.

RESULTADOS

Entre agosto de 2021 e junho de 2023, um total de 127 pacientes com suspeita de LV com idade igual ou superior a 18 anos foram admitidos no estudo. Todos os participantes foram submetidos ao diagnóstico de rotina do Humap-UFMS/Ebserh, parasitológico direto, sendo formas amastigotas identificadas em 35 pacientes (Figura 1).

Adicionalmente, o LPH/INBIO/UFMS realizou o diagnóstico parasitológico indireto (cultivo) em 118 pacientes resultando na detecção de formas flageladas de *Leishmania* sp. em 23 casos. Na análise molecular, todas as amostras dos 127 pacientes foram submetidas à PCR, resultando em 38 amostras que apresentaram amplificação do DNA de *Leishmania* sp. (29,9% de pacientes positivos entre os suspeitos de LV). Portanto, 40 pacientes receberam a confirmação do diagnóstico para LV (Figura 1).

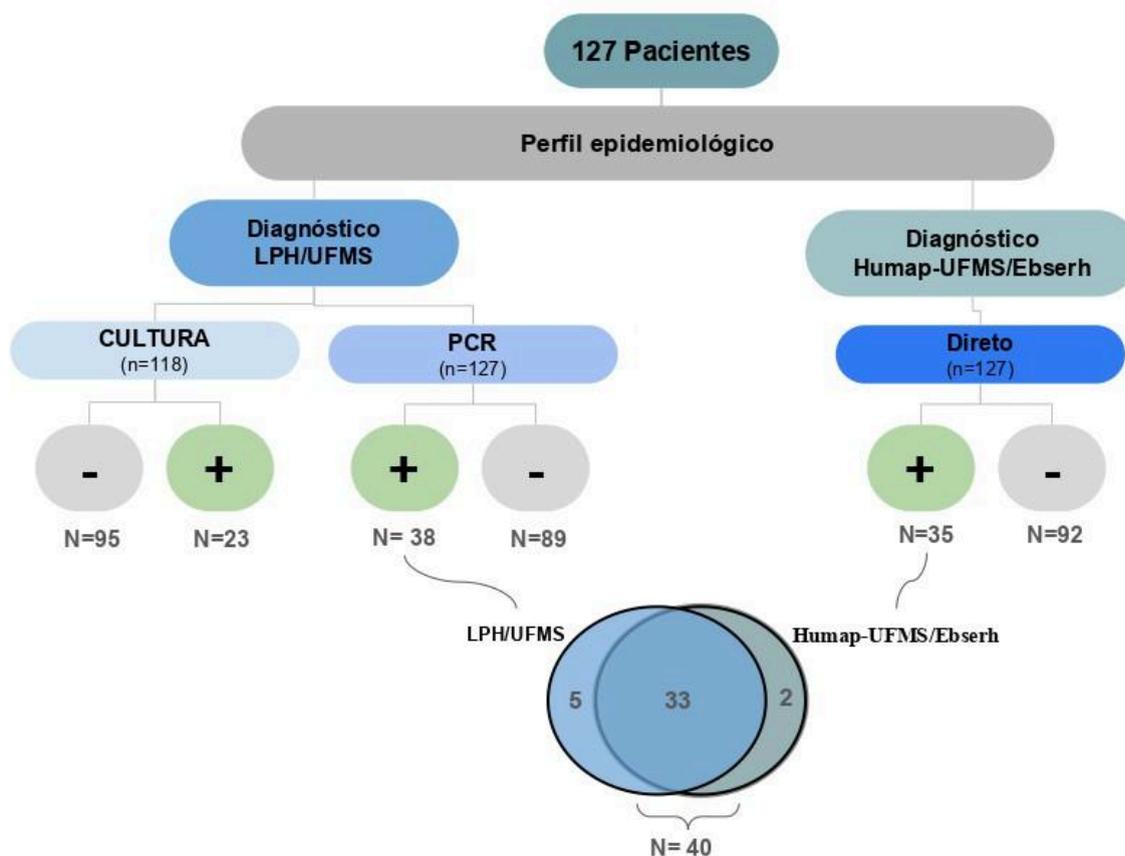


Figure 1. Flow chat representativo da análise do estudo. (+) diagnóstico positivo e (-) diagnóstico negativo.

Indivíduos do sexo masculino e não-brancos foram predominantes em ambos diagnósticos positivo e negativo. Em relação à escolaridade, destacaram-se participantes com ensino fundamental para ambos desfechos, conforme a Tabela 1. A média de idade foi de 39,7 anos para os casos positivos de LV (Figura 2).

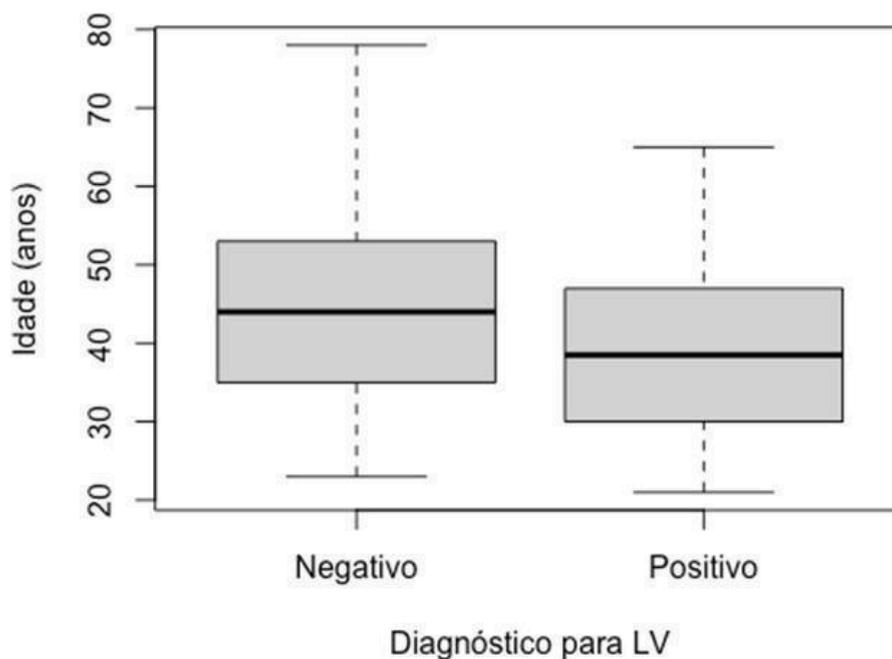


Figure 2. *Boxplot* da variável idade segundo diagnóstico de leishmaniose visceral positivo e negativo (n=127).

Analisando-se os dados contidos nos prontuários dos participantes em relação à residência (126), a maioria (92.9%) encontrava-se em áreas urbanas. Desse total, 68,1% eram pacientes negativos e 31,9% positivos. Campo Grande foi o município com o maior número de participantes nas duas categorias: positivos (28/32,2%) e negativos (59/67,8%). Os demais participantes vieram dos seguintes municípios: Jardim, Aquidauana, Porto Murtinho, Sidrolândia, Bela Vista, Bonito, Coxim, Dois Irmãos do Buriti, Jaraguari, Nioaque, Anastácio, Aparecida do Taboado, Cassilândia, Chapadão do Sul, Corumbá, Dourados, Guia Lopes da Laguna, Ladário, Maracaju, Paranaíba, Ribas do Rio Pardo, Rio Brillhante, São Gabriel e Terenos (Figura 3).

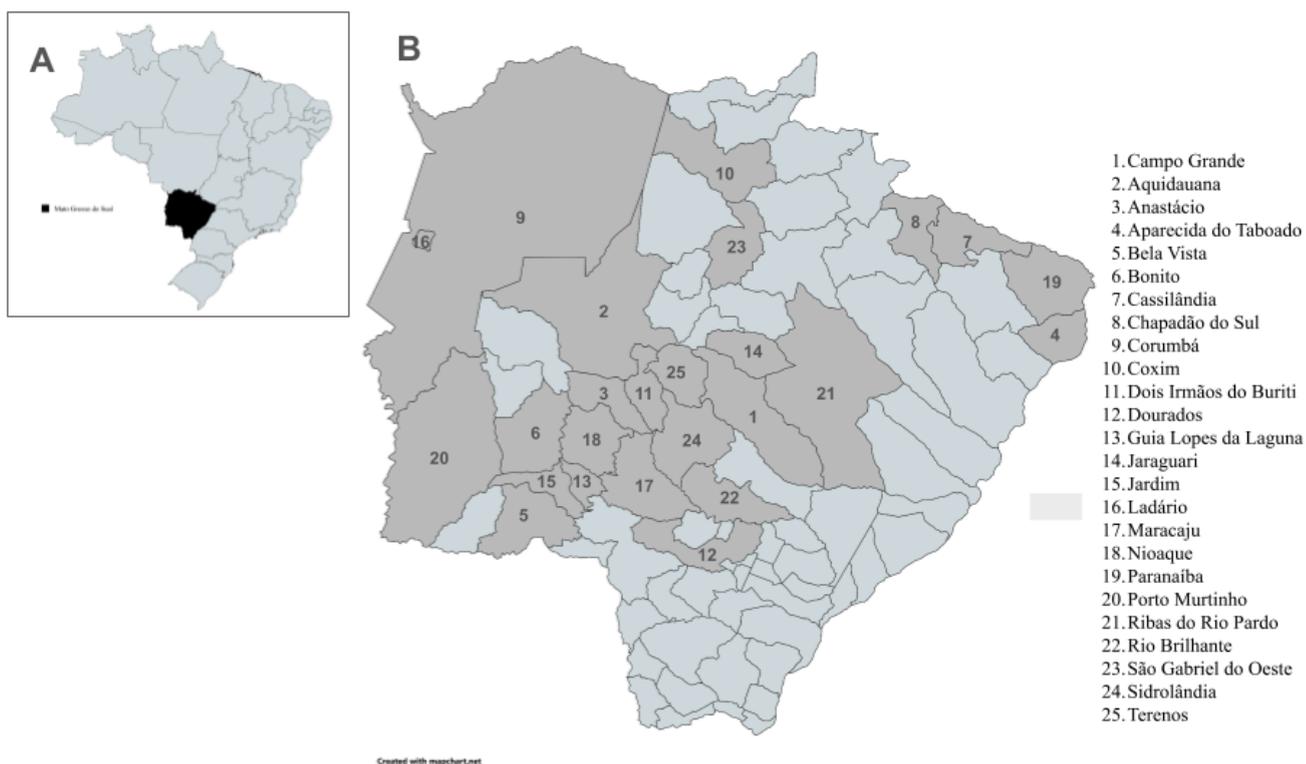


Figure 3. Mapa da procedência dos participantes do estudo. **A** - Mapa dos estados brasileiros, com destaque para o Mato Grosso do Sul. **B** - Mapa dos municípios de Mato Grosso do Sul, onde estão evidenciados os municípios de origem dos participantes.

No que concerne às comorbidades, o HIV foi mais prevalente em ambos os grupos, em 33 (31.1%) pacientes diagnosticados com LV e 73 (68.9%) pacientes negativos para LV. A profilaxia secundária também foi um critério considerado, uma vez que é recomendada pela OMS para pacientes com coinfeção HIV/LV desde o primeiro episódio de LV (PAHO/WHO, 2022). As análises indicaram que no grupo com diagnóstico positivo, houve uma prevalência maior de profilaxia secundária (75%, $p < 0.001$), em comparação com o grupo com diagnóstico negativo (25%), o que revelou uma relação significativa.

A Tabela 1 sumariza o perfil clínico-epidemiológico destes casos segundo classificação para o diagnóstico de LV, e apresenta os resultados da análise univariada.

Tabela 1.

Perfil clínico-epidemiológico da população de estudo segundo diagnóstico de leishmaniose visceral atendida no Humap-UFMS/Ebserh Campo Grande, Mato Grosso do Sul (n=127)*

Covariáveis	Diagnóstico de LV		<i>p</i> -valor	OR (IC 95%)	
	Negativo	Positivo		Univariado	Multivariado
Perfil epidemiológico	n =87 (%)	n =40 (%)			
Idade (anos)	Média (SD)	Média (SD)			
	45.2 (14.1)	39.7 (11.0)	0.031*	0.97 (0.94-1.00)	0.98 (0.94-1.02)
Sexo	(%)	(%)			
Feminino	22 (78.6)	6 (21.4)	0.285	Referência	-
Masculino	65 (65.7)	34 (34.3)		1.92 (0.75-5.61)	-
Cor					
Branco	32 (80.0)	8 (20.0)	0.092	Referência	Referência
Não-branco	55 (63.2)	32 (32.8)		2.33 (0.99-5.98)	1.48 (0.56-4.15)
Escolaridade					
Ensino Fundamental	29 (65.9)	15 (34.1)	0.897	Referência	-
Ensino Médio	12 (60.0)	8 (20.0)		1.29 (0.42-3.83)	-
Ensino Superior	2 (66.7)	1 (33.3)		0.97 (0.04-10.90)	
Área					
Rural	7 (77.8)	2 (22.2)	0.719	Referência	-
Urbana	79 (68.1)	38 (31.9)		1.64 (0.37-11.36)	-
Hábitos de vida					
Tabagismo					

Não	50 (75.8)	16 (24.2)	0.101	Referência	Referência
Sim	37 (60.7)	24 (39.3)		2.03 (0.95-4.41)	2.30 (0.96-5.72)
Etilismo					
Não	36 (66.7)	18 (33.3)	0.849	Referência	-
Sim	51(69.9)	22 (30.1)		0.86 (0.41-1.85)	-
Uso de drogas ilícitas					
Não	68 (72.3)	26 (27.7)	0.176	Referência	Referência
Sim	19 (57.6)	14 (42.4)		1.93 (0.84-4.40)	1.02 (0.37-2.72)
Quadro clínico					
Anemia					
Não	46 (75.4)	15 (24.6)	0.156	Referência	Referência
Sim	41 (62.1)	25 (37.9)		1.87 (0.88-4.09)	0.63 (0.18-2.10)
Pancitopenia					
Não	47 (78.3)	13 (21.7)	0.039*	Referência	Referência
Sim	40 (59.7)	27 (40.3)		2.44 (1.13-5.48)	3.26 (0.99-11.85)
Fadiga/Astenia/Fraqueza					
Não	47 (72.3)	18 (27.7)	0.451	Referência	-
Sim	40 (64.5)	22 (35.5)		1.44 (0.68-3.07)	-
Febre					
Não	41 (77.4)	12 (22.6)	0.104	Referência	Referência
Sim	46 (62.2)	28 (37.8)		2.08 (0.95-4.74)	1.68 (0.69-4.26)
Hiporexia					
Não	53 (68.8)	24 (31.2)	1.00	Referência	-
Sim	34 (68.0)	16 (32.0)		1.04 (0.48-2.23)	-

Dor abdominal					
Não	68 (68.7)	31 (32.3)	1.00	Referência	-
Sim	19 (67.9)	9 (32.1)		1.04 (0.41-2.51)	-
Diarreia					
Não	68 (68.7)	33 (32.7)	0.744	Referência	-
Sim	19 (67.9)	7 (26.9)		0.76 (0.27-1.92)	-
Vômito					
Não	67 (69.1)	30 (30.9)	0.982	Referência	-
Sim	20 (66.7)	10 (33.3)		1.12 (0.45-2.63)	-
Perda ponderal					
Não	42 (75.0)	14 (25.0)	0.227	Referência	-
Sim	45 (63.4)	26 (36.6)		1.73 (0.81-3.83)	-
Hepatoesplenomegalia					
Não	45 (75.0)	15 (25.0)	0.194	Referência	-
Sim	42 (62.7)	25 (37.3)		1.79 (0.84-3.90)	-
Linfadenomegalia					
Não	76 (69.1)	34 (30.9)	0.935	Referência	-
Sim	11 (64.7)	6 (35.3)		1.22 (0.39-3.48)	-
Tosse					
Não	51 (66.2)	26 (33.8)	0.626	Referência	-
Sim	36 (72.0)	14 (28.0)		0.76 (0.34-1.64)	-
Sangramento					
Não	77 (67.5)	37 (32.5)	0.708	Referência	-
Sim	10 (76.9)	3 (23.1)		0.62 (0.13-2.18)	-

Comorbidades					
Coinfecção por HIV					
Não	14 (66.6)	7 (33.3)	1.00	Referência	-
Sim	73 (68.9)	33 (31.1)		0.90 (0.34-2.58)	-
Hipertensão arterial					
Não	68 (72.3)	36 (34.6)	0.173	Referência	Referência
Sim	19 (57.6)	4 (17.4)		0.40 (0.11-1.15)	0.26 (0.05-1.08)
Diabetes mellitus					
Não	79 (67.5)	38 (32.5)	0.645	Referência	-
Sim	8 (80.0)	2 (20.0)		0.52 (0.08-2.20)	-
Doenças cardiovasculares					
Não	80 (67.3)	38 (32.2)	0.803	Referência	-
Sim	7 (77.8)	7 (22.2)		0.60 (0.09-2.63)	-
Doenças cerebrovasculares					
Não	84 (68.3)	39 (31.7)	1.00	Referência	-
Sim	3 (75.0)	1 (25.0)		0.72 (0.03-5.81)	-
Doenças pulmonares					
Não	82 (69.5)	36 (30.5)	0.62	Referência	-
Sim	5 (55.6)	4 (44.4)		1.82 (0.43-7.28)	-
Doenças hepáticas					
Não	77 (68.8)	35 (31.2)	1.00	Referência	-
Sim	10 (66.7)	5 (33.3)		1.10 (0.32-3.34)	-
Doenças renais					
Não	83 (69.7)	36 (30.3)	0.441	Referência	-

Sim	4 (50.0)	4 (50.0)		2.31 (0.52-10.24)	-
Uso crônico de imunossupressores					
Não	84 (68.3)	39 (31.7)	1.00	Referência	-
Sim	3 (75.0)	1 (25.0)		0.72 (0.03-5.81)	-
Uso de quimioterápicos					
Não	86 (68.3)	40 (31.7)	0.176	-	-
Sim	1 (100.0)	0 (0.0)		-	-
Profilaxia secundária para LV					
Não	81 (78.6)	22 (21.4)	<0.001***	Referência	-
Sim	6 (25.0)	18 (75.0)		11.05 (4.11-33.63)	-
Outras infecções oportunistas					
Candidíase					
Não	63 (67.0)	31 (33.0)	0.697	Referência	-
Sim	24 (72.7)	9 (23.3)		0.76 (0.30-1.79)	-
Pneumonia					
Não	69 (67.6)	33 (32.4)	0.857	Referência	-
Sim	18 (72.0)	7 (28.0)		0.81 (0.29-2.07)	-
Tuberculose					
Não	58 (66.7)	29 (33.3)	0.651	Referência	-
Sim	29 (72.5)	11 (27.5)		0.76 (0.32-1.70)	-
Toxoplasmose					
Não	77 (68.8)	35 (31.2)	1.00	Referência	-
Sim	10 (66.7)	5 (33.3)		1.10 (0.32-3.34)	-
Histoplasmose					

Não	82 (70.1)	35 (29.1)	0.338	Referência	-
Sim	5 (50.0)	5 (50.0)		2.34 (0.62-8.92)	-
Sífilis					
Não	74 (69.8)	32 (30.2)	0.649	Referência	-
Sim	13 (61.9)	8 (38.1)		1.42 (0.52-3.72)	-
Citomegalovírus					
Não	78 (67.8)	37 (32.2)	0.855	Referência	-
Sim	9 (75.0)	3 (25.0)		0.70 (0.15-2.51)	-
Criptococose					
Não	83 (68.0)	39 (32.0)	0.941	Referência	-
Sim	4 (80.0)	1 (20.0)		0.53 (0.03-3.74)	-
COVID-19					
Não	80 (67.2)	39 (32.8)	0.423	Referência	-
Sim	7 (87.5)	1 (12.5)		0.29 (0.02-1.73)	-
Pneumocistose					
Não	75 (66.9)	37 (33.1)	0.460	Referência	-
Sim	12 (80.0)	3 (20.0)		0.51 (0.26-1.00)	-
Lesão cutânea (presença de amastigota)					
Não	85 (70.2)	36 (29.8)	0.147	Referência	Referência
Sim	2 (33.3)	4 (66.7)		4.72 (0.88-35.17)	9.05 (1.23-93.54)

*Em algumas categorias as informações dos participantes contidas no prontuário eram ausentes ou ignorado. * p -valor < 0.05; ** p -valor < 0.01; *** p -valor < 0.001

O estudo observou a presença de recidivas entre os pacientes suspeitos de LV. Entre os positivos, 11 pacientes apresentaram de uma a quatro recidivas. Entre os negativos, dois foram diagnosticados com LV no passado, e um deles apresentou cinco recidivas. No decorrer dos dois anos de coleta, 22 participantes evoluíram para óbito (nos prontuários não havia a causa do óbito), dos quais seis tinham sido diagnosticados com LV.

Considerando a relação entre o diagnóstico positivo para LV e as covariáveis referentes ao perfil clínico-epidemiológico, a Tabela 2 apresenta possíveis confusões e interações. O modelo final incluiu as covariáveis tabagismo, pancitopenia, lesão cutânea e hipertensão arterial.

A presença de pancitopenia, tabagismo e a coinfeção com presença de lesões cutâneas estão diretamente associados com a doença e o modelo sugere que possam aumentar a chance de adoecimento por LV. A hipertensão arterial contribuiu para o ajuste do modelo, mas não está associada ao desfecho. O teste de Hosmer e Lemeshow não significativo ($p = 0.947$) indica que o modelo foi bem ajustado; os VIF para as variáveis explicativas indicam ausência de multicolinearidade.

Table 2.
Dados da análise de regressão logística.

Covariáveis	β Coeficiente (Erro padrão)	OR (IC 95%)	VIF
Constante (intercepto)	-1.728 (0.415)	-	-
Tabagismo (Sim)	0.791 (0.417)	2.20 (0.98-5.08)	1.01
Pancitopenia (Sim)	1.163 (0.431)*	3.20 (1.40-7.68)	1.04
Lesão cutânea (Sim)	2.395 (1.052)	10.97 (1.57-113.34)	1.14
Hipertensão arterial (Sim)	-1.567 (0.695)	0.21 (0.04-0.71)	1.15

Akaike Information Criterion: 149.08; OR: *odds ratio* (razão de chances); VIF: *Variance Inflation Factor*
* p -valor < 0.05; ** p -valor < 0.01; *** p -valor < 0.001

Ao analisar somente os casos positivos para LV ($n = 40$), pacientes do sexo masculino (85.0%; $\chi^2 = 18.225$; p -valor<0.001) não-brancos (80.0%; $\chi^2 = 13.225$; p -valor<0.001) foram mais frequentes.

A coinfeção com HIV/LV foi elevada e esteve presente em 33 dos 40 pacientes com LV (82,5%). A adesão à terapia antirretroviral (TARV) também foi analisada. Onze pacientes (33,4%) estavam fazendo uso regular de TARV, enquanto os demais 66,6% (22) não estavam em tratamento ou o utilizavam de forma irregular. Quanto à carga viral, 27 prontuários continham essas informações, com seis apresentando valores indetectáveis e os outros 21 variando de 33 a 8.599.017. A contagem de células CD4+ foi registrada em 25 prontuários, e todos estavam abaixo de 200 células/mm³.

No que diz respeito ao tratamento de LV, sete pacientes não realizaram o tratamento. Do restante, 45,5 % (15) foram tratados exclusivamente com anfotericina B lipossomal, enquanto 9% (3) receberam anfotericina B desoxicolato. Nove pacientes (22,5%) iniciaram o tratamento com anfotericina B desoxicolato e, posteriormente, transitaram para anfotericina B lipossomal. Três pacientes (9%) começaram o tratamento com antimoniato de meglumina e, devido à toxicidade, passaram a usar anfotericina B, sendo que dois deles fizeram uso dos três medicamentos disponíveis (anfotericina B lipossomal, desoxicolato e antimoniato de meglumina). Três pacientes utilizaram pentamidina em combinação com uma das formas farmacêuticas de anfotericina B, sendo que apenas um deles não fez uso de anfotericina desoxicolato. Em relação ao parâmetro de tratamento anterior para LV, um total de 11 pacientes foi registrado.

Para gerenciar a administração medicamentosa, devido a complicações e monitoramento de toxicidade, 21 pacientes foram tratados em ambiente hospitalar, cinco tratados exclusivamente no ambulatório (Professora Esterina Corsini do Humap-UFMS/Ebserh), enquanto sete receberam os dois tratamentos. Em relação às internações pós-tratamento para LV, 17 pacientes se encontraram nessa situação, inclusive 15 deles sendo internados de duas a 31 vezes.

Os pacientes diagnosticados com LV (n=40) foram classificados segundo a gravidade e divididos em duas categorias não grave e grave. O sexo masculino, não-branco, com ensino fundamental e residência em área urbana foram frequentes nas duas categorias (Maetrial

suplementar).

No grupo de casos graves o tabagismo foi mais frequente (41.7%) e a presença de sangramento foi observado em 100% dos casos graves, seguido por vômito (70%) e linfadenomegalia (66.7%), enquanto no grupo não grave, a anemia foi prevalente (68%, $p=0.05$) (Material suplementar 1).

Apresentaram associação significativa com a gravidade da doença: anemia e a ocorrência de três comorbidades: lesão cutânea (100%, $p < 0,033$), doenças pulmonares e renais (Material suplementar 1). Na abordagem multivariada, nenhum modelo apresentou bom ajuste, e no modelo retornado pelo algoritmo *stepwise*, nenhuma variável apresentou associação significativa com a gravidade da doença.

DISCUSSÃO

O perfil da leishmaniose visceral (LV) tem passado por modificações ao longo das décadas, e essas mudanças estão associadas aos reservatórios, aos vetores e aos hospedeiros na dinâmica da transmissão, bem como a fatores sociodemográficos¹⁶. Até a década de 1980, a LV era predominantemente uma doença de áreas rurais. No entanto, devido ao avanço industrial, ao deslocamento populacional das áreas rurais para as urbanas, à ampliação da infraestrutura viária e ferroviária, e ao processo de urbanização em diversas regiões do Brasil, começaram a ocorrer epidemias urbanas de LV^{16,17}.

No estado de Mato Grosso do Sul, a expansão e progressão da enfermidade está associada à construção do gasoduto Bolívia-Brasil, culminando em uma epidemia de alta mortalidade entre 1999 e 2004 nos municípios de Aquidauana, Campo Grande e Três Lagoas. A migração significativa de trabalhadores provenientes de regiões endêmicas, juntamente com a presença dos vetores *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, desempenharam um papel crucial no estabelecimento da doença¹⁸⁻²⁰. Neste estudo,

observamos que a maioria dos pacientes são provenientes de áreas urbanas, tanto entre os casos suspeitos (79/68.1%) quanto entre os confirmados (39/31.9%), com registros de residência em 10 municípios do Estado. Campo Grande se sobressai com a maior frequência de LV (27 casos), o que está em concordância com estudos anteriores, demonstrando o avanço do processo de urbanização²¹⁻²³.

O perfil epidemiológico identificado no estudo revelou maior frequência entre homens (85.0%; $\chi^2 = 18.225$; p -valor < 0.001), não-brancos (80.0%; $\chi^2 = 13.225$; p -valor < 0.001), com média de idade de 39.4 anos e ensino fundamental (40%), em consonância aos achados nacionais²⁴. Essas características podem estar relacionadas a uma combinação de fatores socioeconômicos, ocupacionais, comportamentais e genéticos. Homens não brancos tendem a ocupar trabalhos ao ar livre, expondo-se mais aos vetores do parasito, enquanto condições socioeconômicas desfavoráveis contribuem para ambientes propícios à sua disseminação²⁵⁻²⁷. Fatores genéticos e imunológicos também influenciam a suscetibilidade individual à doença, com diferenças étnicas e na resposta imunológica contribuindo para sua prevalência em grupos específicos²⁸. Desigualdades no acesso aos cuidados de saúde, discriminação racial e falta de conscientização sobre prevenção e tratamento também desempenham um papel significativo^{25,29}.

O modelo de regressão logística utilizado no estudo indica que a presença de pancitopenia, tabagismo e lesões cutâneas estão correlacionadas diretamente com a doença, potencialmente aumentando a chance de adoecimento por LV. Pesquisas têm associado a pancitopenia, especialmente se persistente, como um marcador significativo para LV, o que merece consideração substancial, pois pode facilitar a rápida identificação diagnóstica da doença³⁰. A correlação entre leishmaniose visceral (LV) e tabagismo pode ser justificada pela exposição prolongada às altas doses de tabaco, que têm o potencial de causar danos significativos às células imunes inatas e de inibir a produção de moléculas imunitárias. Essa interferência pode resultar em um desequilíbrio na resposta inflamatória, o que, por sua vez, favorece a rápida propagação e a colonização a longo prazo de agentes patogênicos³¹⁻³³.

A concomitância de LV e a presença de lesões cutâneas com presença de amastigotas, podem conduzir à ocorrência de complicações associadas à LV denominadas leishmaniose dérmica pós-kala-azar (PKDL) e leishmaniose dérmica para-kala-azar (Para-KDL)³⁴. A PKDL é uma condição dermatológica que emerge após a remissão aparente da LV, caracterizada por lesões cutâneas contendo amastigotas de *Leishmania* sp. detectáveis em biópsias, podendo gerar estigma aos pacientes, porém ao mesmo tempo, pode sinalizar um prognóstico bom para diminuição da letalidade na LV^{6,34}. Por outro lado, a Para-KDL é uma forma intermediária que exhibe sintomas clínicos tanto da LV quanto da PKDL, incluindo febre prolongada, hepatoesplenomegalia e diversas lesões cutâneas³⁵. Quando associadas à coinfeção HIV/LV, tanto a PKDL quanto a Para-KDL tendem a se apresentar de forma mais grave e frequente³⁶. Essas complicações são de natureza complexa e desafiadora em termos de prognóstico, sendo escassamente estudadas e divulgadas, especialmente no contexto brasileiro³⁷.

O estudo revelou uma elevada ocorrência de participantes com HIV, dos quais 106 entre 127 eram portadores do vírus. No contexto da coinfeção HIV/LV, também houve alta prevalência, 33 dos 40 indivíduos positivos para LV apresentaram coinfeção HIV/LV, apesar de não haver correlação com a gravidade da doença. O fenômeno pode estar relacionado ao fato de que o HUMAP-UFMS/Ebserh atua como um centro de referência para o atendimento de adultos com HIV/AIDS. Graepp-Fontoura et al. (2023)³⁸ observaram uma elevada taxa de coinfeção HIV/LV na região Centro-Oeste, especialmente no Mato Grosso do Sul, com uma incidência de 1,17 casos por 100 mil habitantes. Esses achados ressaltam a relevância de estudos nessa região. Esses dados são significativos, pois apontam para mudanças no perfil epidemiológico, revelando um padrão emergente devido à sobreposição geográfica dessas duas enfermidades³⁹.

A coinfeção HIV/LV tem um papel direto no agravamento da enfermidade e na taxa de letalidade^{38,40}. O monitoramento da coinfeção HIV/LV também auxilia no planejamento e aquisição de medicamentos, considerando que esses casos necessitam de tratamento,

acompanhamento sistemático com adoção de medidas terapêuticas de profilaxia secundária para evitar recidivas e óbitos por LV⁴⁰.

Na análise comparativa entre os grupos diagnosticados negativamente e positivamente para LV, a profilaxia secundária se destacou como um parâmetro estatisticamente significativo (75% <0.001). Esse achado era esperado e pode ser explicado pela diretriz da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), que preconiza a administração de profilaxia secundária para todos os pacientes com HIV diagnosticados com LV e contagem de células T CD4+ abaixo de 350/mm³. Os fármacos indicados são os mesmos utilizados no tratamento (anfotericina B lipossomal ou desoxicolato, antimoniato de N-metil glucamina, isotionato de pentamidina), sendo a escolha do esquema baseada nas condições do serviço e nas características de tolerabilidade de cada paciente^{41,42}.

Após a análise epidemiológica do grupo de pacientes diagnosticados com LV foi avaliada a gravidade. Das variáveis analisadas, o quadro clínico de sangramento foi mais frequente, enquanto nas comorbidades, as doenças pulmonares, hepáticas e renais apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo não grave. Segundo o Ministério da Saúde, dentre os critérios de inclusão para gravidade, o sangramento e as comorbidades são fatores determinantes. Apesar de poucos estudos, a relação entre doenças pulmonares e a LV já foi relatada, demonstrando o agravamento no prognóstico dos pacientes. A pneumonite intersticial e a broncopneumonia são frequentemente descritas como complicações severas e potenciais causas de mortalidade em indivíduos diagnosticados com LV⁴³⁻⁴⁶. A literatura tem estabelecido uma correlação entre a mortalidade e fenômenos hemorrágicos, considerando-os marcadores significativos de prognóstico e gravidade da LV^{47,48}. As comorbidades também estão relacionadas com a letalidade, assim como na conduta medicamentosa⁴⁵ em especial atenção às doenças renais e hepáticas, em que a presença do parasita, além de causar danos diretos aos órgãos, quando associado ao tratamento, é potencializada pela toxicidade da droga^{49,50}.

No contexto das técnicas de diagnóstico abordadas neste estudo, a técnica molecular

de reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstrou uma maior detecção de amostras positivas em comparação com os métodos parasitológico direto e cultura (Figura 1). A técnica de pesquisa direta ainda é amplamente considerada como o padrão ouro no diagnóstico de LV devido à sua elevada especificidade. Contudo, sua sensibilidade é restrita e sua realização demanda conhecimento técnico específico. Em relação à cultura, embora apresente alta especificidade, sua sensibilidade é limitada, além de ser um procedimento trabalhoso, dispendioso e demorado^{51,52}.

Por outro lado, a técnica molecular por PCR se destaca das outras devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, especialmente em amostras com baixas cargas parasitárias⁵³. Além de possibilitar o diagnóstico, a PCR também tem aplicação na quantificação dos parasitas, o que permite monitorar a evolução da doença, antecipar e controlar a eficácia da terapia anti-*Leishmania*, bem como identificar características específicas do parasita, como virulência ou resistência a medicamentos, e diferenciar espécies⁵⁴.

Este estudo apresentou um diferencial significativo no que concerne à coleta de dados, os quais foram diretamente obtidos de prontuários de pacientes atendidos em um hospital de referência para LV, proporcionando uma amplitude de informações mais substanciais quando contrastados com outros trabalhos que se baseiam na coleta em banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação^{24,38,55,56}. Entretanto, foram constatadas limitações decorrentes de prontuários incompletos ou mal preenchidos. Os registros médicos representam uma fonte de dados fundamental para a análise epidemiológica e para compreender a história natural das doenças, sendo reconhecidos como o "padrão-ouro" na identificação de comorbidades, tratamentos e histórico médico em estudos relacionados aos serviços de saúde^{57,58}.

Os resultados desta pesquisa ressaltam a necessidade de enfatizar a capacitação e atualização dos profissionais de saúde para reconhecer precocemente os diversos sinais e sintomas clínicos da LV, além de aprimorar o acompanhamento dos pacientes em nível

comunitário para garantir a adesão adequada ao tratamento. A identificação precoce desses fatores é crucial para a transferência oportuna dos pacientes para um hospital de referência, onde receberão tratamento adequado.

CONCLUSÃO

O estudo em questão delineou as características necessárias para estabelecer o perfil epidemiológico da Leishmaniose Visceral em pacientes atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, reconhecido como centro de referência no tratamento dessa enfermidade no estado. A definição desse perfil epidemiológico é crucial para a compreensão e o acompanhamento dos aspectos da doença em uma região, fornecendo subsídios para a realização de capacitações e atualizações dos profissionais de saúde, visando reconhecer precocemente o quadro clínico da LV, bem como aprimorar o acompanhamento dos pacientes em nível comunitário, garantindo assim uma adesão adequada ao tratamento. Além disso, tais informações são essenciais para embasar a formulação de políticas públicas eficazes no combate à doença.

Agradecimentos. Agradecemos ao Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pelo apoio fundamental na coleta das amostras e dos dados necessários para a realização deste estudo. Por fim, expressamos nossa gratidão ao laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul por sua colaboração e suporte ao longo do projeto. Sem o respaldo dessas instituições, este trabalho não teria sido viável.

Suporte Financeiro:. O presente trabalho recebeu o financiamento da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul

(FUNDECT), conforme contemplado na Chamada FUNDECT N° 10/2022, referente ao Programa Mulheres na Ciência Sul-Mato-Grossense, sob o número do Processo 83/023.878/2023.

Conflito de Interesse: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEP/UFMS, nº 4.628.192) e pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (nº 6/2021/SGPIT/GEP/HUMAP-UFMS EBSEH). O consentimento informado foi obtido de todos os participantes. A pesquisa foi conduzida de forma anônima, e os dados coletados foram tratados com confidencialidade. Assim, os dados da pesquisa não estão disponíveis em razão da proteção à privacidade dos participantes.

Informações dos autores: incluindo afiliação, cidade, país e endereço de e-mail

Natália Oliveira Alves (nataliaalves2@ufg.br), Centro Multiusuário de Pesquisa de Bioinsumos e Tecnologias em Saúde da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil e Laboratório de Parasitologia Humana do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil. Alessandra Gutierrez de Oliveira (alessandra.oliveira@ufms.br), Carla Cardozo Pinto de Arruda, (carla.arruda@ufms.br), Aline Etelvina Casaril (aline.casaril@ufms.br), Eliane Mattos Piranda (eliane.piranda@ufms.br) e Jucelei de Oliveira Moura Infran (jucelei.infran@ufms.br), Laboratório de Parasitologia Humana do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil. Everton Falcão de Oliveira (everton.falcao@ufms.br), Anamaria Melo Miranda Paniago (anamaria.paniago@ufms.br), Jéssica Ayumi Oshiro (j_ayumi@ufms.br), Emanuela Corrêa da Costa de S. Soares (emanuela.correa@ufms.br). Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil. Giulia Menezes de Mendonça (giulia.menezes@ufms.br) Instituto Integrado de Saúde, Universidade Federal de

Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

REFERÊNCIAS

1. PAHO/WHO., 2024. Leishmaniose - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Available at: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Accessed. 2024
2. WHO world HO., 2023. Leishmaniasis. Available at: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Accessed. 2023
3. Costa JML., 2005. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. *Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil* 75: 3–17
4. Lainson R, Rangel EF., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 811–827
5. Lainson R, Shaw JJ., 2005. New world Leishmaniasis. *Parasitology*. 10th ed. London: Hodder Arnold, 313–344
6. WHO WHO., 2019. Epidemiological situation. Available at: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Accessed. 2019
7. MATO GROSSO DO SUL., 2023. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA 2022. Secretaria de Saúde do Mato Grosso do Sul
8. Wamai RG, Kahn J, McGloin J, Ziaggi G., 2020. Visceral leishmaniasis: a global overview. *Journal of Global Health Science* 2
9. Lima ID, Lima ALM, Mendes-Aguiar C de O, Coutinho JFV, Wilson ME, Pearson RD, Queiroz JW, Jeronimo SMB., 2018. Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12: e0006164
10. Servadio JL, Machado G, Alvarez J, Júnior FE de FL, Alves RV, Convertino M., 2020. Information differences across spatial resolutions and scales for disease surveillance and analysis: The case of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLOS ONE* 15: e0235920
11. Brasil M da SaúdeS de V em S., 2006. *Leishmaniose Visceral Grave: Normas E Condutas*. MS
12. Arruda CCP, Hardoim D de J, Rizk YS, Souza C da SF, Valle TZ, Carvalho DB, Taniwaki NN, Baroni AC de M, Calabrese K da S., 2020. A Triazole Hybrid of Neolignans as a Potential Antileishmanial Agent by Triggering Mitochondrial Dysfunction. *Molecules* 25: 37
13. Santos RC dos, Pinho FA de, Passos GP, Larangeira DF, Barrouin-Melo SM., 2018. *Isolamento de Leishmania infantum* naturalmente infectante a partir de amostras caninas em meio Novy-MacNeal-Nicolle preparado com sangue desfibrinado de diferentes

- espécies animais. *Veterinary Parasitology* 257: 10–14
14. García-Miranda P, Peral M, Ilundain A., 2010. Effect of antidiuresis on renal creatine metabolism. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 61: 83–8
 15. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47: 349–358
 16. Desjeux P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 239–243
 17. Conti RV, Moura Lane VF, Montebello L, Pinto Junior VL., 2016. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *Journal of Vector Borne Diseases* 53: 99
 18. Antonialli Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suárez YR., 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research*: 8
 19. Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr. FDA, Oshiro ET, Rodrigues Chang M., 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública* 31: 378–390
 20. Oliveira AG de, Falcão AL, Brazil RP., 2000. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS, Brasil. *Rev Saúde Pública* 34: 654–655
 21. Azevedo TS de, Lorenz C, Chiaravalloti-Neto F., 2019. Risk mapping of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 52: e20190240
 22. MATO GROSSO DO SUL S de E de S., 2023. *BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO: LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA 2022*. Campo Gande
 23. Oliveira EF de, Oliveira AG de, Arruda CCP de, Fernandes W de S, Medeiros MJ de., 2020. Spatio-temporal modeling of visceral leishmaniasis in Midwest Brazil: An ecological study of 18-years data (2001–2018). *PLOS ONE* 15: e0240218
 24. Bruhn FRP, Werneck GL, Barbosa DS, Câmara DCP, Simões TC, Buzanovsky LP, Duarte AGS, de Melo SN, Cardoso DT, Donato LE, Maia-Elkhoury ANS, Belo VS., 2024. Spatio-temporal dynamics of visceral leishmaniasis in Brazil: A nonlinear regression analysis. *Zoonoses and Public Health* 71: 144–156
 25. Okwor I, Uzonna J., 2016. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 94: 489–493
 26. Vlassoff C, Manderson L., 1998. Incorporating gender in the anthropology of infectious diseases. *Tropical Medicine & International Health* 3: 1011–1019
 27. Rathgeber EM, Vlassoff C., 1993. Gender and tropical diseases: A new research focus.

Social Science & Medicine 37: 513–520

28. Bucheton B, Abel L, Kheir MM, Mirgani A, El-Safi SH, Chevillard C, Dessein A., 2003. Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. *Genes Immun* 4: 104–109
29. Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls A-L, Le Pont F., 2002. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 529–532
30. Koster K-L, Laws H-J, Troeger A, Meisel R, Borkhardt A, Oommen PT., 2015. Visceral Leishmaniasis as a Possible Reason for Pancytopenia. *Frontiers in Pediatrics* 3
31. Garmendia J, Morey P, Bengoechea JA., 2012. Impact of cigarette smoke exposure on host–bacterial pathogen interactions. *European Respiratory Journal* 39: 467–477
32. Jiang C, Chen Q, Xie M., 2020. Smoking increases the risk of infectious diseases: A narrative review. *Tob Induc Dis* 18: 60
33. Lee J, Taneja V, Vassallo R., 2012. Cigarette Smoking and Inflammation: Cellular and Molecular Mechanisms. *J Dent Res* 91: 142–149
34. Zijlstra E, Musa A, Khalil E, El Hassan I, El-Hassan A., 2003. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 87–98
35. Moniruzzaman M, Been Sayeed SKJ, Rahim MdA, Hassan R, Rahman MdM., 2023. Para Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Case Report. *Cureus*
36. Zijlstra EE., 2014. PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3258
37. Lindoso JAL, Moreira CHV, Celeste BJ, Oyafuso LKM, Folegatti PM, Zijlstra EE., 2018. Para-kala-azar dermal leishmaniasis in a patient in Brazil: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 51: 105–107
38. Graepp-Fontoura I, Barbosa DS, Fontoura VM, Guerra RNM, Melo SDA, Fernandes MNDF, Costa PDSS, Maciel SM, Goiabeira YA, Santos FS, Santos-Neto M, Hunaldo Dos Santos L, Serra MAADO, Abreu-Silva AL., 2023. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Brazil: epidemiological profile and spatial patterns. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 117: 260–270
39. PAHO/WHO PAHO., 2017. *PLAN OF ACTION TO STRENGTHEN THE SURVEILLANCE AND CONTROL OF LEISHMANIASIS IN THE AMERICAS 2017-2022*. Washington, D.C.
40. PAHO/WHO OP de la S., 2023. *LEISHMANIOSES Informe epidemiológico das Américas*. Washington, D.C.: OPAS
41. BRASIL M da S., 2015. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV. : 109

42. PAHO/WHO OP de la S., 2022. *Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição*. Pan American Health Organization
43. Duarte MIS, Da Matta VLR, Corbett CEP, Laurenti MD, Chebabo R, Goto H., 1989. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 73–76
44. Duarte MIS, Corbett CEP., 1984. Histopathological and ultrastructural aspects of interstitial pneumonitis of experimental visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 683–688
45. Alvarenga DG de, Escalda PMF, Costa ASV da, Monreal MTFD., 2010. Visceral leishmaniasis: retrospective study on factors associated with lethality. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43
46. Bispo AJB, Almeida MLD, De Almeida RP, Bispo Neto J, De Oliveira Brito AV, França CM., 2020. Pulmonary involvement in human visceral leishmaniasis: Clinical and tomographic evaluation. *PLoS ONE* 15: e0228176
47. Belo VS, Struchiner CJ, Barbosa DS, Nascimento BWL, Horta MAP, Silva ES da, Werneck GL., 2014. Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8: e2982
48. Silva BBL da, Alves AKR, Almeida BC de, Pereira R de B, Castro MR de, Santos VAPP, Fontenele MJA, Silva L dos S, Oliveira AC de, Nogueira FD, Alves FR de O, Veras IL, Silveira EM de QFB da, Mello GW de S, Farias DR de., 2021. Análise dos perfis epidemiológicos da leishmaniose visceral e da coinfeção leishmaniose visceral-HIV no Piauí, 2007 a 2019. *Research, Society and Development* 10: e126101220247–e126101220247
49. El Hag IA, Hashim FA, El Toum IA, Homeida M, El Kalifa M, El Hassan AM., 1994. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Journal of Clinical Pathology* 47: 547–551
50. Oliveira JM de, Fernandes AC, Dorval MEC, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET, Oliveira ALL de., 2010. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43
51. Reithinger R., 2008. Diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Dermatology* 3: 315–327
52. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S., 2011. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 1–6
53. Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, Orlando G, Gramiccia M, Acquaviva V, Foschi A, Corvasce S, Colomba C, Titone L, Parravicini C, Cascio A, et al., 2007. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV-Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases* 44: 1602–1610

54. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL., 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138: 405–425
55. Botelho ACA, Natal DD., 2009. First epidemiological description of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul
56. Cota G, Erber AC, Schernhammer E, Simões TC., 2021. Inequalities of visceral leishmaniasis case-fatality in Brazil: A multilevel modeling considering space, time, individual and contextual factors. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15: e0009567
57. Melton LJ., 1996. History of the Rochester Epidemiology Project. *Mayo Clinic Proceedings* 71: 266–274
58. Yawn BP, Wollan P., 2005. Interrater Reliability: Completing the Methods Description in Medical Records Review Studies. *American Journal of Epidemiology* 161: 974–977.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplementary figure 1. Perfil clínico-epidemiológico dos casos positivos de leishmaniose visceral, segundo gravidade da doença, atendidas no Humap-UFMS/Ebserh Campo Grande, Mato Grosso do Sul (n=40).

*Em algumas categorias as informações dos participantes contidas no prontuário eram ausente ou ignorado.

Covariáveis	Gravidade		p-valor
	Não	Sim	
Perfil epidemiológico			
Idade (anos)	Média (SD)	Média (SD)	
	40.0 (11.1)	39.4 (11.2)	0.864
Sexo	n (%)	n (%)	
Feminino	3 (50.0)	3 (50.0)	1.000
Masculino	19 (55.9)	15 (44.1)	
Cor			
Branco	6 (75.0)	2 (25.0)	0.258
Não-branco	16 (50.0)	16 (50.0)	
Escolaridade			
Ensino Fundamental	9 (60.0)	6 (40.0)	0.358
Ensino Médio	6 (75.0)	2 (25.0)	
Ensino Superior	0 (0.0)	1 (100.0)	
Área			
Rural	1 (50.0)	1 (50.0)	1.000
Urbana	20 (54.1)	17 (45.9)	
Hábitos de vida			
Tabagismo			
Não	8 (50.0)	8 (50.0)	0.748
Sim	14 (58.3)	10 (41.7)	
Etilismo			
Não	8 (44.4)	10 (55.6)	0.339
Sim	14 (63.6)	8 (36.4)	
Uso de drogas ilícitas			
Não	13 (50.0)	13 (50.0)	0.510
Sim	9 (64.3)	5 (35.7)	
Quadro clínico			

Anemia			
Não	5 (33.3)	10 (66.7)	0.050*
Sim	17 (68.0)	8 (32.0)	
Pancitopenia			
Não	6 (46.2)	7 (53.8)	0.509
Sim	16 (59.3)	11 (40.7)	
Fadiga/Astenia/Fraqueza			
Não	9 (50.0)	9 (50.0)	0.750
Sim	13 (59.1)	9 (40.9)	
Febre			
Não	4 (33.3)	8 (66.7)	0.093
Sim	18 (64.3)	10 (35.7)	
Hiporexia			
Não	12 (50.0)	12 (50.0)	0.526
Sim	10 (62.5)	6 (37.5)	
Dor abdominal			
Não	15 (48.4)	16 (51.6)	0.149
Sim	7 (77.8)	2 (22.2)	
Diarreia			
Não	18 (54.5)	15 (45.5)	1.000
Sim	4 (57.1)	3 (42.9)	
Vômito			
Não	19 (63.3)	11 (36.7)	0.140
Sim	3 (30.0)	7 (70.0)	
Perda ponderal			
Não	5 (35.7)	9 (64.3)	0.101
Sim	17 (65.4)	9 (34.6)	
Hepatoesplenomegalia			
Não	6 (40.0)	9 (60.0)	0.194
Sim	16 (64.0)	9 (36.0)	
Linfadenomegalia			
Não	20 (58.8)	14 (41.2)	0.381
Sim	2 (33.3)	4 (66.7)	
Tosse			
Não	15 (57.7)	11 (42.3)	0.744
Sim	7 (50.0)	7 (50.0)	

Sangramento			
Não	22 (59.5)	15 (40.5)	0.083
Sim	0 (0.0)	3 (100.0)	
Comorbidades			
Coinfecção por HIV			
Não	4 (57.1)	3 (42.9)	1.000
Sim	18 (54.5)	15 (45.5)	
Hipertensão arterial			
Não	21 (58.3)	15 (41.7)	0.310
Sim	1 (25.0)	3 (75.0)	
Diabetes mellitus			
Não	22 (57.9)	16 (42.1)	0.196
Sim	0 (0.0)	2 (100.0)	
Doenças cardiovasculares			
Não	22 (57.9)	16 (42.1)	0.196
Sim	0 (0.0)	2 (100.0)	
Doenças cerebrovasculares			
Não	22 (56.4)	17 (43.6)	0.450
Sim	0 (0.0)	1 (100.0)	
Doenças pulmonares			
Não	22 (61.1)	14 (38.9)	0.033*
Sim	0 (0.0)	4 (100.0)	
Doenças hepáticas			
Não	22 (62.9)	13 (37.1)	0.013*
Sim	0 (0.0)	5 (100.0)	
Doenças renais			
Não	22 (61.1)	14 (38.9)	0.033*
Sim	0 (0.0)	4 (100.0)	
Uso crônico de imunossupressores			
Não	22 (56.4)	17 (43.6)	0.450
Sim	0 (0.0)	1 (100.0)	
Uso de quimioterápicos			
Não	22 (55.0)	18 (45.0)	1.000
Sim	0 (0.0)	0 (0.0)	
Profilaxia secundária para LV			
Não	11 (50.0)	11 (50.0)	0.537

Sim	11 (61.1)	7 (38.9)	
Outras infecções oportunistas			
Candidíase			
Não	16 (51.6)	15 (48.4)	0.476
Sim	6 (66.7)	3 (33.3)	
Pneumonia			
Não	20 (60.6)	13 (39.4)	0.211
Sim	2 (28.6)	5 (71.4)	
Tuberculose			
Não	17 (58.6)	12 (41.4)	0.498
Sim	5 (45.5)	6 (54.5)	
Toxoplasmose			
Não	21 (60.0)	14 (40.0)	0.155
Sim	1 (20.0)	4 (80.0)	
Histoplasmose			
Não	20 (57.1)	15 (42.9)	0.642
Sim	2 (40.0)	3 (60.0)	
Sífilis			
Não	19 (59.4)	13 (40.6)	0.430
Sim	3 (37.5)	5 (62.5)	
Citomegalovírus			
Não	21 (56.8)	16 (43.2)	0.579
Sim	1 (33.3)	2 (66.7)	
Criptococose			
Não	21 (53.8)	18 (46.2)	1.000
Sim	1 (100.0)	0 (0.0)	
COVID-19			
Não	22 (56.4)	17 (43.6)	0.450
Sim	0 (0.0)	1 (100.0)	
Pneumocistose			
Não	21 (56.8)	16 (43.2)	0.579
Sim	1 (33.3)	2 (66.7)	
Lesão cutânea (presença de amastigota)			
Não	22 (61.1)	14 (38.9)	0.033*
Sim	0 (0.0)	4 (100.0)	

p*-valor < 0.05; ** *p*-valor < 0.01; * *p*-valor < 0.001.

Capítulo 3

Manuscrito sobre o sequenciamento de cepas de *Leishmania* spp. Intenção de submissão à revista. “THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE”

Análise genômica da coinfeção por *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* em pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral

Natália O. Alves^{1,2}, Ph.D. Diego P. Alonso⁵, Ph.D. João L. R. Cunha⁶, Ph.D. Daniel Jeffares⁶, Ph.D. Aline E. Casaril¹, Jéssica A. Oshiro⁴, Fernanda Silva³, Emanuela C. C. S. Soares⁴, Ph.D. Paulo Eduardo Martins Ribolla⁵, Ph.D. Carla Cardozo Pinto de Arruda^{1,3}, Ph.D. Alessandra Gutierrez de Oliveira^{1,2}.

¹ Laboratório de Parasitologia Humana, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴ Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁵ Instituto de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brasil

⁶ York Biomedical Research Institute, University of York, York, United Kingdom

Correspondence

Alessandra Gutierrez de Oliveira, Laboratory of Human Parasitology, Institute of Biosciences and Graduate Program in Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

E-mail: alessandra.oliveira@ufms.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV) é um desafio na saúde pública devido à complexidade de sua abordagem médica e terapêutica, à variedade de manifestações clínicas, à escassez de fármacos e às recorrentes recaídas. Estudos genômicos têm sido úteis na identificação das espécies presentes, auxiliando no desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento e manejo médico da doença.

MÉTODOS: Foram coletadas 18 amostras de aspirado de medula óssea (AMO) de 17 pacientes diagnosticados com LV no Hospital de Referência. As amostras de AMO foram isoladas em meio de cultura NNN e posteriormente transferidas para meio *Schneider's Insect Medium* para propagação. O DNA das promastigotas cultivadas foi extraído e sequenciado o genoma completo, utilizando a plataforma *Illumina*. As análises bioinformáticas incluíram o alinhamento e mapeamento com os genomas de referência de *Leishmania infantum* JPCM5 e *L. amazonensis* UA30.

RESULTADOS: O estudo revelou a presença das espécies de *Leishmania*: um caso de *L. amazonensis*, nove casos de *L. infantum* e a coexistência de oito casos de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Quanto ao perfil epidemiológico, observou-se uma predominância em homens não brancos, média de idade de 35.6 anos, provenientes de áreas urbanas. A gravidade foi mais frequente no grupo com infecção mista, nos quais também foram prevalentes as comorbidades, como HIV.

CONCLUSÃO: Este foi o primeiro estudo a revelar coinfeção por *L. amazonensis/L. infantum* em amostras de pacientes no Mato Grosso do Sul, evidenciando a importância do sequenciamento genômico na identificação de espécies de *Leishmania* e suas coinfeções. Esses resultados demonstram a importância do sequenciamento para orientar tanto a abordagem clínica quanto a epidemiológica da doença.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies de flagelados digenéticos (heteroxênicos) pertencentes ao gênero *Leishmania* e apresentam-se sob três formas clínicas principais: visceral, cutânea e mucocutânea¹. O parasita é transmitido ao homem e aos animais por fêmeas hematófagas de flebotomíneos. É importante mencionar que, na América Central e alguns países da América do Sul, há uma particularidade quanto a etiologia da Leishmaniose visceral. Além de *Leishmania infantum*, o principal agente etiológico dessa parasitose, as espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, causadoras da leishmaniose cutânea, também estão associadas à forma visceral típica em pacientes humanos coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em animais domésticos²⁻⁵. O oposto também ocorre, com manifestações cutâneas causadas por *L. infantum*, inclusive no estado de Mato Grosso do Sul⁶⁻⁸.

A enfermidade é um importante problema de saúde pública no mundo, sobretudo, nas Américas, na África Oriental, no norte da África, na Ásia Ocidental e no sudeste Asiático⁹. Nas Américas, a LV é endêmica em 13 países, sendo o Brasil responsável por 92% dos casos

notificados¹⁰. Em 2022, Mato Grosso do Sul registrou 152 casos de LV, com uma letalidade de 12,5%, o que representa um aumento de 50% em relação a 2021. Campo Grande foi o município com a maior taxa de transmissão, classificando a região como de intensa propagação da doença¹¹.

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa sistêmica, de evolução crônica, caracterizada por febre irregular, hepatoesplenomegalia, acompanhada de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Devido ao estado de debilidade progressiva, o paciente pode evoluir para caquexia e óbito, caso não seja tratado^{1,12}.

O grande número de casos de coinfeção *Leishmania*-HIV dificulta o manejo clínico e o tratamento do paciente. Outra problemática a ser analisada são relatos de coinfeção por espécies de *Leishmania*, que refletem a complexidade da cadeia epidemiológica da parasitose e, conseqüentemente, o impacto clínico e epidemiológico das infecções dessa natureza^{13,14}.

O avanço das técnicas de sequenciamento de DNA, como o sequenciamento de nova geração (conhecido como *Next-Generation Sequencing*, NGS), transformou os estudos do genoma e tornou-se uma ferramenta indispensável para as análises genômicas, inclusive de *Leishmania* spp. Até o momento, já foram descritas variantes genéticas, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), variações no número de cópias de segmento (CNVs) de genes ou cromossomos e variações estruturais em detalhes, demonstrando a complexidade do genoma do parasita^{15,16}. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar o genoma de *Leishmania* sp. de pacientes com diagnóstico de LV do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Humap-UFMS/Ebserh), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

METODOLOGIA

ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEP/UFMS- 4.628.192), bem como do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (Humap-UFMS/Ebserh), sob protocolo 6/2021/SGPIT/GEP/HUMAP-UFMS-EBSERH.

AMOSTRAGEM, POPULAÇÃO E DADOS DO ESTUDO

O estudo foi realizado com 18 amostras de 17 pacientes (sendo que um paciente forneceu duas amostras, coletadas em períodos distintos) com suspeita de leishmaniose visceral (LV)

atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Humap-UFMS/Ebserh), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

As amostras de aspirado de medula óssea foram obtidas da rotina de diagnóstico laboratorial para pacientes com sintomas e histórico clínico compatíveis. Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Humana, situado no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (LPH/INBIO/UFMS), com o propósito de realização de diagnóstico parasitológico indireto (cultura) e sequenciamento do genoma das amostras.

As informações extraídas dos prontuários dos pacientes incluíram dados como sexo, idade, quadro clínico comuns associados à LV, tais como: anemia, bicitopenia/pancitopenia, febre, hiporexia/inapetência, dor abdominal, diarreia, vômito/náusea, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, tosse e sangramentos. Além disso, foram considerados fatores clínicos como recuperação ou óbito, presença de sangramento, edema, sorologia positiva para HIV, comorbidades, gravidade da condição e coinfeção bacteriana. Essas informações foram então correlacionadas com os resultados obtidos por meio do sequenciamento genético.

Os pacientes foram classificados em termos de gravidade apresentando ao menos um dos seguintes critérios: que abrangiam idade superior a 65 anos, desnutrição grave, óbito, comorbidades ou manifestações clínicas de icterícia e hemorragias. Foram também classificados conforme a presença de indicadores de alerta para possível agravamento, a idade entre 50 e 65 anos, histórico de recidiva, presença de diarreia, vômitos, suspeita de infecção bacteriana ou febre persistente por mais de 60 dias. Todos esses critérios estão estabelecidos no manual do Ministério da Saúde "Leishmaniose Visceral Grave - Normas e Condutas"¹⁷.

DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

O estudo considerou como casos suspeitos de leishmaniose visceral (LV) os pacientes que apresentaram sintomas clínicos de febre e esplenomegalia, oriundos de áreas com histórico de transmissão de LV¹⁷. Os casos confirmados de LV foram incluídos quando pelo menos um dos seguintes diagnósticos foi positivo: exame parasitológico direto (pesquisa de amastigotas) realizado no Humap-UFMS/Ebserh ou conduzido pelo LPH/INBIO/UFMS, cultura celular ou métodos moleculares.

DIAGNÓSTICOS CONDUZIDOS PELO LPH/INBIO/UFMS

PARASITOLÓGICO INDIRETO - CULTURA

As amostras de AMO, oriundas de pacientes atendidos no hospital Humap-UFMS/Ebserh, foram inoculadas no meio de cultura bifásico NNN enriquecido com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico estreptomicina e penicilina e urina masculina em um volume de 0,5 mL, sendo mantidas em estufa a 26°C¹⁸. Para observar presença de promastigotas, formas flageladas móveis, as culturas foram observadas a cada sete dias durante seis semanas. Com as culturas positivas, foram realizadas duas passagens para um novo meio de cultura nas mesmas condições. Na terceira passagem foi utilizado o meio de cultura *Schneider*, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico estreptomicina e penicilina e 2% de urina masculina¹⁹.

Após aproximadamente seis passagens, realizou-se expansão da cultura para um volume de 10 mL. Com sete dias, essas culturas foram centrifugadas a 4000 RPM e lavadas duas vezes com solução PBS (Phosphate Buffered Saline). Os precipitados foram ressuspensos em 0,5mL de PBS e armazenados em freezer -20°C para posterior extração de DNA (modificado de Carvalho et al., 2020)²⁰.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Antes de iniciar o processo de extração do DNA, as culturas foram novamente centrifugadas e ressuspensas com tampão de lise do kit de extração. Todo o procedimento de extração de DNA foi realizado com o kit PureLink™ Genomic DNA da Invitrogen (USA) seguindo instruções do fabricante.

Com intuito de validar a extração e verificar a presença de DNA de *Leishmania* sp., realizamos uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR convencional) visando identificar uma região de aproximadamente 300 pares de base (bp) do espaçador transcrito interno ribossômico 1 (ITS1) usando iniciadores LITSR 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S 5'TGATACCACTTATCGCACTT 3'. Na reação da PCR, o volume final foi de 25 µL, sendo 8µL de água ultrapura, 10 µL de Tampão Master Mix Convencional 2x (QuatroG Biotecnologia®, Porto Alegre, Brasil), um µL de cada oligonucleotídeo (10pm/ µL) e cinco µL de DNA extraído (≅10 ng/µL). O perfil de gradiente térmico foi realizado seguindo as condições descritas por SCHÖNIAN, 2003²¹.

O produto da extração foi quantificado usando fluorômetro Qubit 2.0 seguindo as recomendações do fabricante para Qubit dsDNA HS kit (High Sensitivity, Invitrogen).

SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA GERAÇÃO (NGS)

Para construção da biblioteca, a concentração dos produtos extraídos foram ajustados

para 0,2 ng/ μ L e, posteriormente, foi utilizado o *Nextera Library Prep Kit* (Illumina®, San Diego USA) seguindo as orientações do fabricante. Para isso, 1 μ L de DNA de cada amostra foi clivado com 2 μ L de *Tagment DNA Buffer* e 1 μ L de TDE1 (*Tagment DNA Enzyme*), incubados em termociclador a 55°C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 μ L de *NT Buffer* e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Os adaptadores para o sequenciamento (*Index*), P5 e P7, foram ligados por meio de uma PCR convencional com ciclos limitados. As condições foram as seguintes: 72°C por 3 minutos, 98°C por 30 segundos, seguida de 25 ciclos de 98°C por 10 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos, mantido a 10°C. Uma nova purificação com *AMPure XP beads* foi realizada e os *amplicons* foram quantificados usando fluorômetro Qubit 2.0 seguindo as recomendações do fabricante.

Posteriormente, as amostras foram normalizadas para 1 ng/ μ L e agrupadas em um *pool* nessa mesma concentração. Com o intuito de analisar a qualidade da biblioteca utilizou-se o *Kit TapeStation Agilent Technologies*, sendo 1 uL de DNA da biblioteca e 3 uL de *High Sensitivity D1000 Sample Buffer*. Em seguida, foi realizada a normalização e desnaturação do *pool* da Biblioteca sendo inseridas no cartucho de reagentes da Illumina. O sequenciamento foi realizado no sistema *NextSeq500 Illumina* com a corrida do tipo *single-end*.

ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Os arquivos *FastQ* gerados pelo sequenciador estavam armazenados na base de dados “*Base space*” da plataforma Illumina, tendo sido agrupados em único diretório por amostra. Posteriormente, foi utilizada a ferramenta *Trimmomatic*²² para análise da qualidade e limpeza dos dados utilizando como métrica o *PHRED quality score*^{23,24}. Na limpeza, foram retiradas os adaptadores (*Index*) e removidas 15 pb do início e do final das sequências, ficando com o comprimento de 133 pb e assim como exclusão das sequências menores que 40pb.

Os dados tratados foram convertidos para o formato BAM sendo alinhados e mapeados com os genomas completos de referência de *Leishmania (Leishmania) infantum* JPCM5 e *L. (L.) amazonensis* UA30, empregando a ferramenta *Samtools - stats* e *Samtools-coverage*.

RESULTADOS

As 18 amostras sequenciadas e alinhadas com os genomas de referência JPCM5 de *L. infantum* e UA301 de *L. amazonensis*, visando à identificação das espécies, revelaram que nove amostras corresponderam a *L. infantum*, uma amostra a *L. amazonensis*, e oito amostras apresentaram ambas as espécies (conforme demonstrado na Figura 1). Dezesete amostras, ao serem alinhadas com os genomas de referência, exibiram uma cobertura significativa,

abrangendo mais de 80% dos cromossomos presentes no genoma, com exceção da amostra LV033, que apresentou uma cobertura de aproximadamente 20%.

Durante a análise da profundidade, que representa o número médio de leituras mapeadas para cada posição do cromossomo, constatou-se que onze amostras apresentaram profundidade igual ou superior a 10 vezes para o genoma de *L. infantum*. Quatro amostras demonstraram profundidade maior para o genoma de *L. amazonensis*. A amostra LV089 exibiu profundidade de 10 vezes para ambas as espécies, enquanto LV033 apresentou profundidade abaixo de 0.25 vezes, como evidenciado na Figura 2.

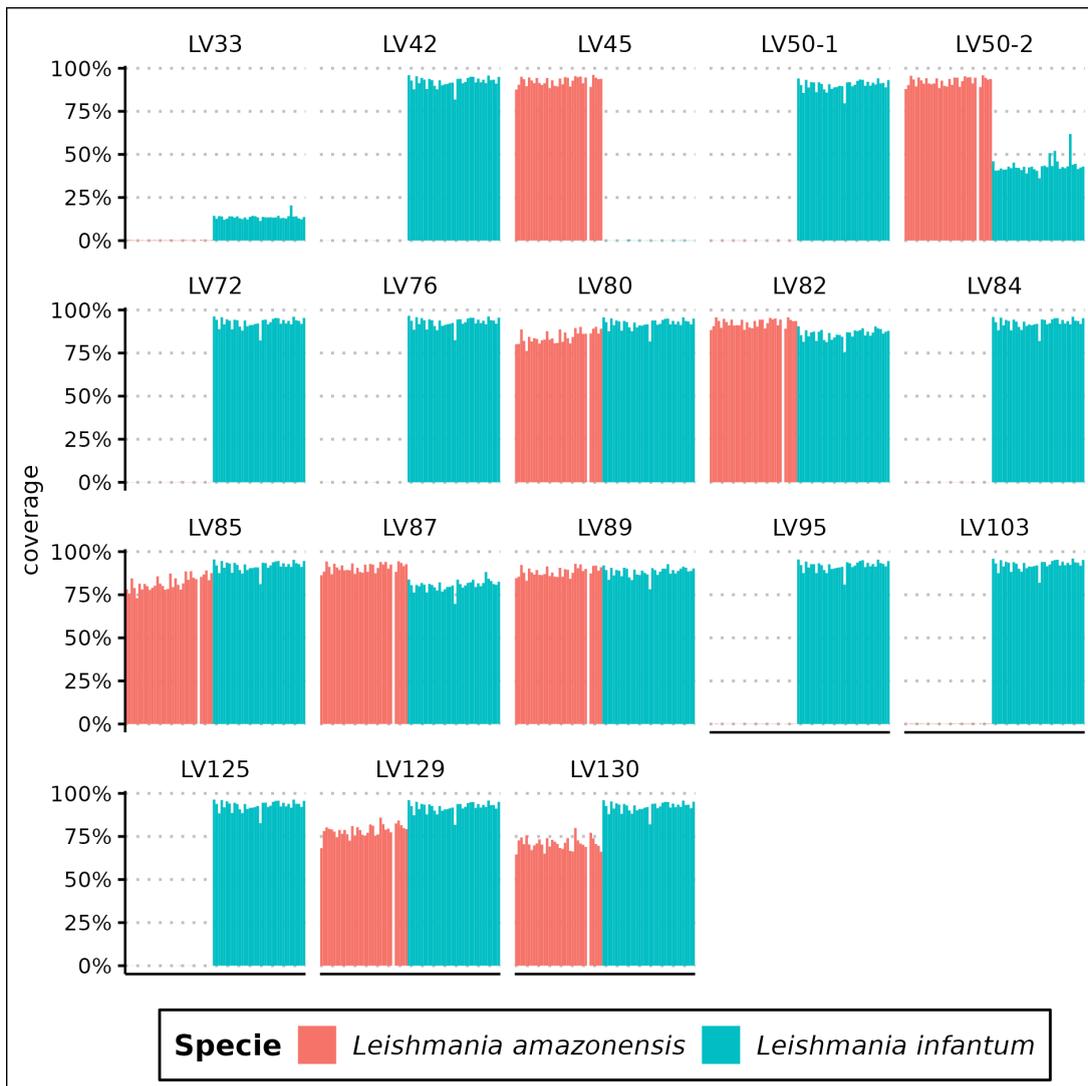


Figura 1. Representação gráfica do alinhamento genômico das espécies de *Leishmania* com os genomas de referência. O eixo “X” representa o alinhamento com o genoma de referência de *Leishmania infantum* JPCM5 e *L. amazonensis* UA30; o eixo “Y” apresenta porcentagem de concordância da amostra em relação à referência.

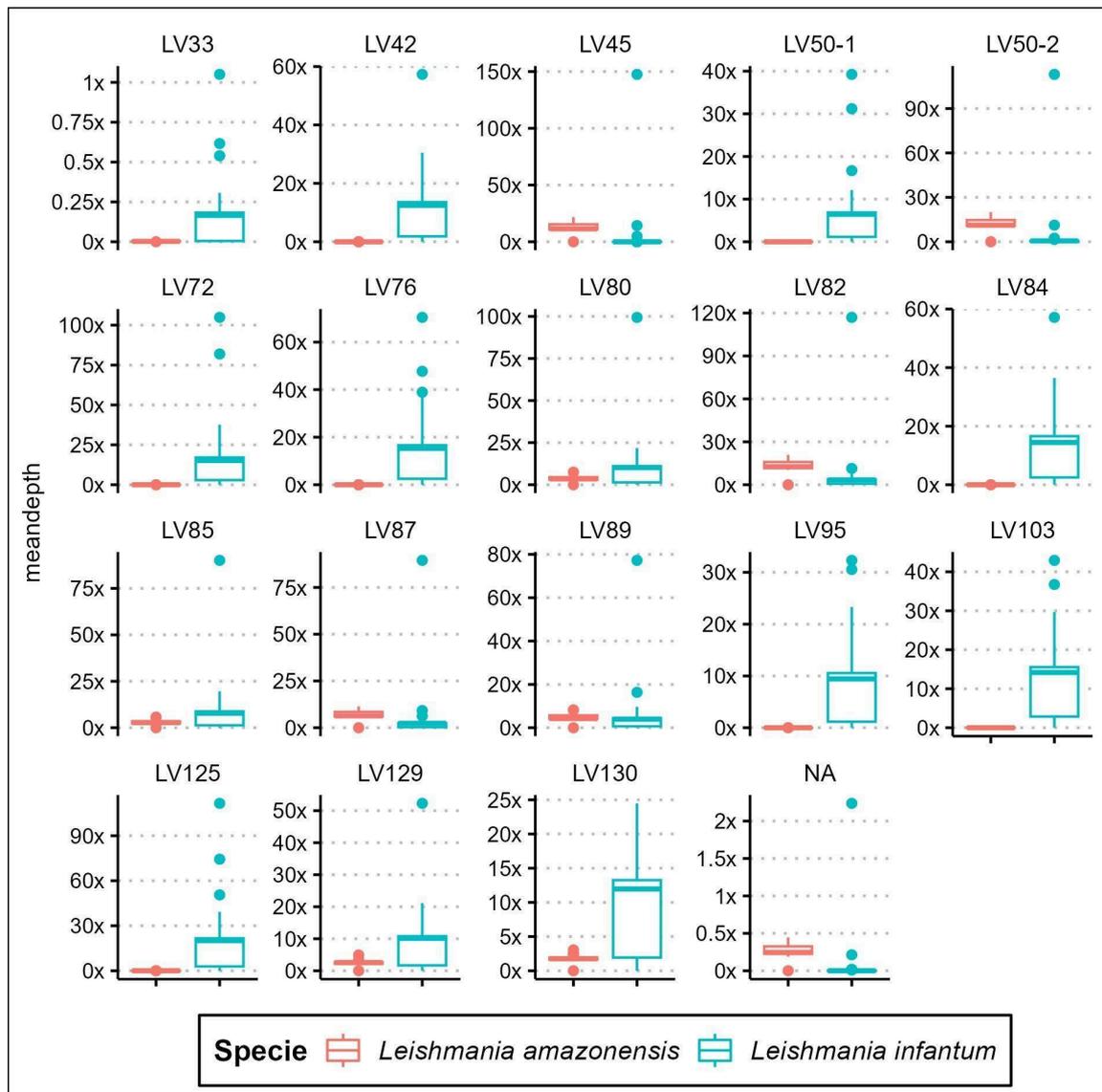


Figura 2. Representação da avaliação da profundidade do alinhamento genômico das espécies de *Leishmania* com os genomas de referência. O eixo “X” representa o alinhamento com o genoma de referência de *Leishmania infantum* JPCM5 e *L. amazonensis* UA30; o eixo “Y” apresenta a quantidade de vezes que as sequências de amostras alinharam com o genoma de referência.

ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Ao analisar os resultados do sequenciamento em conjunto com as informações dos prontuários dos 17 pacientes participantes do estudo, observou-se que nove pacientes apresentaram-se infectados com uma única espécie, enquanto oito pacientes foram diagnosticados com infecção mista por *L. amazonensis* e *L. infantum*. Houve a prevalência do sexo masculino e não branco, enquanto o sexo feminino (n= 2) foi observado exclusivamente no grupo de infecção mista. Quanto à média de idade, verificou-se que no grupo de infecção mista,

esse valor foi de 35.6 anos, enquanto no grupo com infecção única, foi de 42 anos (Tabela 1).

Quanto à residência dos participantes, 14 eram de Campo Grande, sendo oito do grupo com única infecção e seis de infecção mista. Um participante do grupo de única infecção era de Guia Lopes da Laguna, enquanto no grupo de infecção mista, um era de Ribas do Rio Pardo e outro de Jardim.

No conjunto total de amostras incluídas no estudo, com base nos diagnósticos fornecidos pelo Humap-UFMS/Ebserh e nos exames realizados pelo LPH/INBIO/UFMS, constatou-se que 16 dos casos receberam diagnóstico positivo para LV em ambos os métodos. Apenas um paciente teve resultado negativo no exame parasitológico direto (realizado pelo Humap-UFMS/Ebserh), mas positivo no exame parasitológico indireto (cultura) e no diagnóstico molecular (PCR). Quanto às recidivas, foram observados em cinco casos, sendo que o grupo de infecção mista apresentou recidivas mais frequentes, correspondendo a três casos (Tabela 1).

Dentro do contexto do quadro clínico característico da LV no grupo com infecção mista por *Leishmania*, fadiga/astenia/fraqueza (54.6%), hiporexia (55.6%), tosse (66.6%), vômito (60%) e linfadenomegalia (100%) foram mais frequentes em comparação ao grupo com apenas uma infecção. Estes achados estão representados na Figura 3.

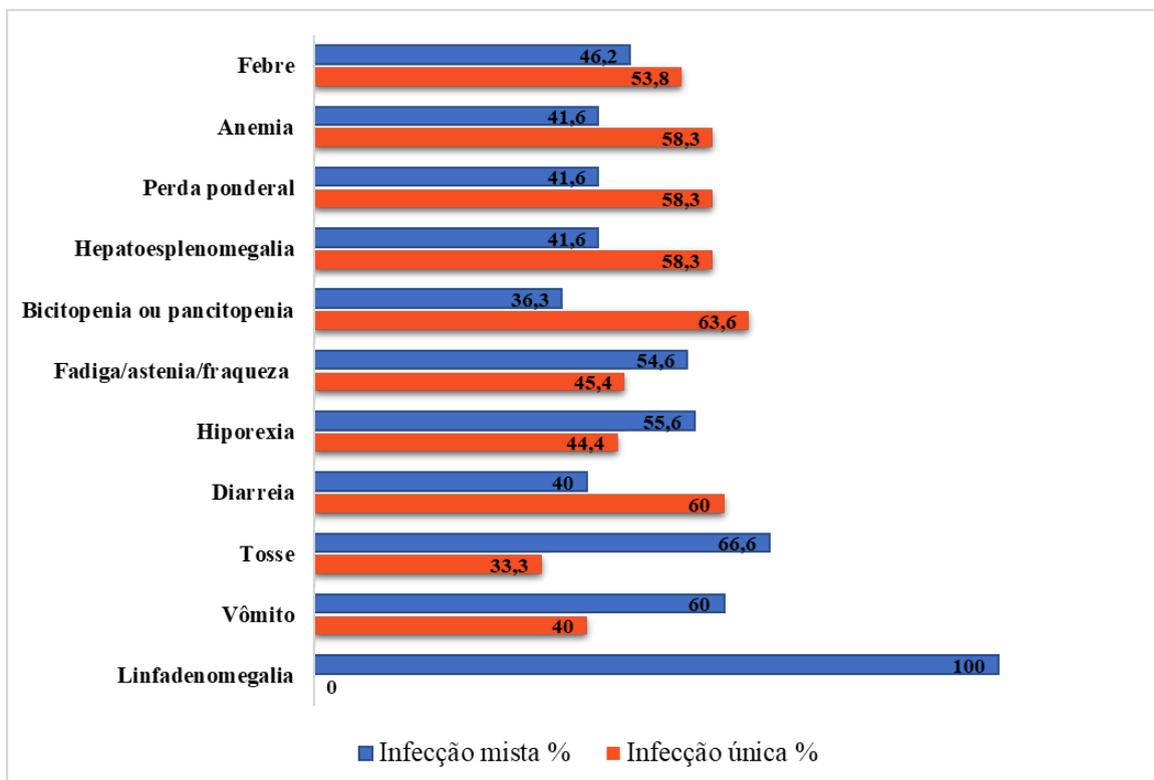


Figura 3. Frequência em porcentagem do quadro clínico comuns ao LV encontrados nos pacientes do estudo. A barra azul corresponde à infecção mista por *Leishmania* spp. e a vermelha escuro à infecção não mista.

O estudo investigou os hábitos de vida dos participantes, revelando que tabagismo (66,6%), etilismo (66,6%) e uso de drogas ilícitas (57,2%) foram mais frequentes no grupo com infecção mista (Figura 4).

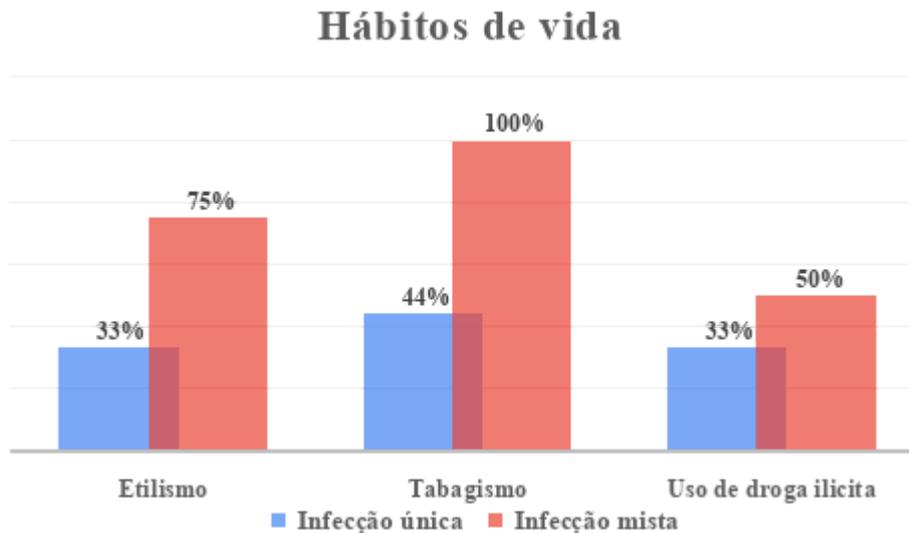


Figura 4. Frequência em porcentagem dos hábitos de vida dos pacientes participantes do estudo. A barra vermelha corresponde à infecção mista por *Leishmania* spp. e a azul à infecção não mista.

A presença de comorbidades também foi observada nesses indivíduos, em que Diabetes *mellitus* que foi identificada em um paciente do grupo com infecção única, enquanto no grupo de infecção mista foi constatada a presença de um paciente com doença cerebrovascular e outro com doença pulmonar (Tabela 1).

A coinfeção com o HIV foi prevalente em ambos os grupos: sete dos casos de infecção mista e seis dos casos de infecção única (Tabela 1). Verificou-se que apenas dois pacientes foram identificados como abertura de caso HIV/LV (um de cada grupo). Dos pacientes com coinfeção, apenas três estavam em tratamento regular com TARV (dois do grupo de infecção mista e um do grupo com infecção única); os demais não estavam em tratamento ou estavam com uso irregular. Em relação à carga viral, somente três pacientes apresentaram níveis indetectáveis (um do grupo de infecção mista e os outros do grupo com infecção única). Todos os registros que incluíam contagem de células CD4+ apresentaram valores abaixo de 110 células/mm³.

No aspecto do tratamento, somente um paciente do grupo de infecção mista não recebeu tratamento. Dentro desse mesmo grupo, observou-se que a administração medicamentosa foi conduzida da seguinte maneira: dois pacientes foram tratados exclusivamente com anfotericina B

desoxicolato, três apenas com anfotericina B lipossomal, um recebeu tratamento com ambos os fármacos e outro foi tratado com três medicamentos (anfotericina B lipossomal, desoxicolato e antimoniato de meglumina). Destes, três foram submetidos a tratamento prévio para LV. No grupo de infecção única de LV, seis pacientes receberam anfotericina B lipossomal, dois iniciaram o tratamento com anfotericina B desoxicolato e mudaram para a lipossomal, e um começou com antimoniato de meglumina e, devido à toxicidade, passou a utilizar anfotericina B lipossomal. Destes, dois pacientes já haviam sido tratados anteriormente para LV (Tabela 1),

Avaliando a questão da profilaxia secundária, a qual é recomendada pela OMS em todos os pacientes com coinfeção HIV-LV desde o primeiro episódio de LV (OPAS, 2022). A ocorrência da conduta foi similar em ambos os grupos, quatro casos da infecção mista e três casos de única infecção (Tabela 1).

No que diz respeito às internações pós-tratamento de LV, três pacientes do grupo de infecção única necessitaram desse serviço, com dois deles internados oito vezes. No grupo de infecção mista, três pacientes foram internados, e dois deles precisaram do serviço mais de uma vez.

Durante a infecção por LV, alguns indivíduos foram diagnosticados com outras infecções oportunistas concomitantes. Candidíase, pneumonia e toxoplasmose ocorreram com igual frequência em ambos os grupos. Por outro lado, histoplasmose, leishmaniose cutânea e sífilis foram mais prevalentes no grupo de infecção mista. Criptococose e pneumocistose foram mais frequentes no grupo com infecção única por *Leishmania*.

No que diz respeito à gravidade, o grupo de infecção mista foi predominante (n=4), enquanto o grupo com infecção única todos os pacientes apresentaram sinais de alerta (Tabela 1). O LV082 foi o único caso com desfecho de óbito, esse pertencia ao grupo de infecção mista.

A Tabela 1 sumariza o perfil clínico-epidemiológico dos participantes incluídos no estudo.

Tabela 1. Perfil clínico-epidemiológico da população de estudo segundo o tipo de infecção por *Leishmania* atendidas no Humap-UFMS/Ebserh Campo Grande, Mato Grosso do Sul (n=17).

Cod. LPH	Procedência	Idade	Sexo	Cor	Diagn. HUMA P/UFMS	Diagn. LPH/U FMS	Infecção Mista	Espécie	TTO	TTO anterior	Profilaxia secundária LV após tto	Recidiva	Qntd. recidiva	Comorbidades	Sinais de alerta	Gravidade	Óbito
LV033	Campo Grande - MS	43	M	Parda	S	S	N	<i>L.infantum</i>	Anfotericina B Desoxicolato e lipossomal	S	S	S	1	HIV	S	N	N
LV042	Campo Grande - MS	28	M	Parda	S	S	N	<i>L.infantum</i>	Anfotericina B lipossomal	N	S	N	NA	HIV	S	N	N
LV045	Campo Grande - MS	44	M	Parda	S	S	N	<i>L. amazonensis</i>	Anfotericina B lipossomal	N	N	N	NA	HIV	S	N	N
LV050	Ribas do Rio Pardo -MS	23	F	Parda	S	S	N	<i>L. amazonensis/L. infantum</i>	Anfotericina B lipossomal	N	S	S	1	HIV	S	N	N
LV072	Campo Grande - MS	36	M	Parda	S	S	N	<i>L.infantum</i>	Anfotericina B lipossomal	N	N	N	NA	HIV	S	N	N
LV076	Campo Grande - MS	27	M	Parda	S	S	N	<i>L.infantum</i>	Antimonial pentavalente e Anfotericina B lipossomal	N	N	N	NA	N	S	N	N
LV080	Campo Grande - MS	31	M	Parda	S	S	S	<i>L. amazonensis/L. infantum</i>	Antimonial pentavalente, Anfotericina B Desoxicolato e lipossomal	N	N	N	NA	N	S	N	N
LV082	Jardim -MS	47	M	Parda	N	S	S	<i>L.</i>	N	N	N	N	NA	HIV	N	S	S

								<i>amazonensis/L. infantum</i>									
LV084	Campo Grande - MS	56	M	Parda	S	S	N	<i>L. infantum</i>	Anfotericina B lipossomal	N	N	N	NA	Diabetes mellitus	S	S	N
LV085	Campo Grande - MS	35	M	Parda	S	S	S	<i>L. amazonensis/L. infantum</i>	Anfotericina B lipossomal	N	S	N	NA	HIV	S	N	N
LV087	Campo Grande - MS	24	M	Parda	S	S	S	<i>L. amazonensis/L. infantum</i>	Anfotericina B Desoxicolato	N	N	N	NA	HIV	S	N	N
LV089	Campo Grande - MS	38	F	Parda	S	S	S	<i>L. amazonensis/L. infantum</i>	Anfotericina B Desoxicolato	S	N	S	1	HIV Doença pulmonar	S	S	N
LV095	Campo Grande - MS	50	M	Branca	S	S	N	<i>L. infantum</i>	Anfotericina B Desoxicolato e lipossomal	N	N	N	NA	N	S	N	N
LV103	Guia Lopes da Laguna - MS	47	M	Parda	S	S	N	<i>L. infantum</i>	Anfotericina B lipossomal	N	N	N	NA	HIV	S	N	N
LV125	Campo Grande - MS	47	M	Branca	S	S	N	<i>L. infantum</i>	Anfotericina B lipossomal	S	S	S	3	HIV	S		N
LV129	Campo Grande - MS	36	M	Parda	S	S	S	<i>L. amazonensis/L. infantum</i>	Anfotericina B Desoxicolato e lipossomal	S	S	S	4	HIV	S	S	N
LV130	Campo Grande - MS	51	M	Parda	S	S	S	<i>L. amazonensis/L. infantum</i>	Anfotericina B lipossomal	N	S	N	NA	HIV Doença cerebrovascular	S	S	N

Legenda: S: sim; N: não. M: sexo masculino; F: sexo feminino. Qnd.: quantidade. TTO: tratamento. HIV: vírus da imunodeficiência adquirida.

DISCUSSÃO

O presente estudo relata o primeiro achado de coinfeção de *Leishmania infantum* e *L. amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul. Os resultados demonstraram que das 18 amostras (Figura 1), oito apresentaram coinfeção *L. infantum/L. amazonensis*. O município de Campo Grande é identificado pelo Ministério da Saúde como uma área de alta transmissão dos agentes causadores de leishmaniose visceral (LV) e cutânea (LC)^{11,25}, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de infecções mistas.

Historicamente, pressupunha-se que hospedeiros vertebrados e invertebrados seriam suscetíveis à infecção por uma única espécie de parasita. No entanto, a literatura atual tem demonstrado eventos de coinfeção em ambos hospedeiros, particularmente em regiões onde a doença é endêmica²⁶⁻²⁸. Um estudo realizado em Governador Valadares, Minas Gerais, identificou a presença de mais de uma espécie de *Leishmania* em um inseto *Lutzomyia longipalpis*, vetor do agente de LV. Também já foram descritas trocas genéticas, resultantes de interações inter e intraespecíficas entre parasitas do gênero *Leishmania* em ambos hospedeiros, vertebrado e invertebrado²⁹. O impacto desta estratégia reprodutiva representa uma adaptação genética deste parasita³⁰.

Inicialmente, todos os pacientes manifestavam clínica para LV. No caso de um paciente específico (LV082), o diagnóstico parasitológico direto realizado por meio do aspirado de medula óssea (AMO) resultou negativo. Contudo, tanto as técnicas de PCR quanto a inoculação em meio de cultura (parasitológico indireto) executadas com o mesmo material apresentaram resultados positivos. O desfecho do paciente foi o óbito, seis dias após a realização do diagnóstico. Vale ressaltar que esse paciente integrava o grupo de infecção mista, o que sugere a possibilidade de uma complicação adicional. Tal contexto evidencia a importância crucial de um diagnóstico preciso e rápido.

O exame parasitológico direto, por meio da visualização de formas amastigotas, ainda é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da LV. Apesar de ser uma prática rotineira em hospitais, essa técnica requer profissionais altamente capacitados e experientes, o que pode resultar em uma subnotificação de casos³¹. Além disso, esse método não permite a identificação de infecções mistas¹⁴. A detecção de coinfeções é de extrema importância, pois contribui para a compreensão da epidemiologia, da fisiopatologia e do curso clínico da doença, além de orientar intervenções terapêuticas adequadas²⁶. Diante desse cenário, a utilização de ferramentas tecnológicas de sequenciamento de próxima geração torna possível a análise do genoma da espécie responsável pela infecção.

Com o advento da pandemia de COVID-19, muitos laboratórios têm investido em plataformas de sequenciamento, como o NGS, como uma ferramenta muito útil para diagnosticar

diversos microrganismos^{32,33}. Além de *Leishmania* spp., outros patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Histoplasma capsulatum* podem infectar a medula óssea^{34,35}. Nesses casos, o NGS pode ser usado para identificar o agente etiológico mais rapidamente.

Em relação ao perfil epidemiológico, os resultados corroboram achados de estudos anteriores, evidenciando a predominância de casos de LV em indivíduos do sexo masculino, não brancos e residentes em áreas urbanas³⁶. No entanto, destaca-se na análise da gravidade a maior frequência de casos com infecção mista, suscitando reflexões sobre a possível associação da infecção por dois patógenos do mesmo gênero e a gravidade da doença. Isso ressalta a importância de estudos mais detalhados sobre essa relação.

Os nossos achados podem estar em consonância com o estudo experimental realizado em hamsters por Celeste et al. (2017)³⁷, no qual as infecções mistas foram associadas a doenças clínicas mais graves do que as causadas por um único agente. Isso sugere uma possível supressão mais intensa da imunidade do hospedeiro, o que permite a multiplicação dos parasitas e prejudica a função efetora dos macrófagos, resultando em doenças mais graves³⁶.

Na análise das comorbidades, o grupo com infecção mista chamou a atenção devido à sua maior frequência, principalmente em relação ao HIV. Sete dos oito casos apresentavam coinfeção HIV/LV, sendo que, desses, o LV089 também sofria de doença pulmonar e o LV130 de doença cerebrovascular. Os nossos resultados estão em conformidade com os achados de Castilho-Castañeda et al. (2022)¹³, nos quais foi observada infecção mista pela mesma espécie em pacientes imunocomprometidos. Está bem estabelecido que, em pacientes com HIV, a diminuição dos linfócitos T CD4+ promove a replicação, disseminação e visceralização de *Leishmania* spp., e a coexistência desses patógenos acelera o avanço em direção à síndrome da imunodeficiência adquirida, falha terapêutica e recidiva^{38,39}.

O cultivo e isolamento das *Leishmania* spp. apresentam limitações significativas, sendo um procedimento extremamente laborioso e que exige um tempo considerável. Além disso, esse processo é vulnerável a contaminações, mesmo com a adoção de rigorosas medidas de controle e precauções³¹.

Em resumo, este estudo relatou oito casos de coinfeção *L. amazonensis*/*L. infantum* em paciente com diagnóstico clínico de LV, o que sugere que essa coinfeção não deve mais ser ignorada nas condutas clínicas. Além disso, foi necessário o sequenciamento por NGS para identificar as coinfeções.

CONCLUSÃO

O estudo relatou, pela primeira vez no Mato Grosso do Sul, a presença de coinfeção por *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* em amostras de pacientes atendidos no hospital

de referência do estado. Isso ressalta a importância da identificação e do uso de métodos genômicos para o diagnóstico dessas doenças. Esses resultados oferecem insights cruciais para orientar tanto o manejo clínico quanto o epidemiológico da enfermidade.

AGRADECIMENTOS

Manifestamos nosso mais sincero apreço à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo financiamento deste projeto. Igualmente, expressamos profunda gratidão ao Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pelo apoio fundamental concedido na coleta das amostras e dos dados essenciais para a realização deste estudo. Estendemos nossos agradecimentos ao laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e ao laboratório de Pesquisa e Análises Genéticas da Universidade Estadual de São Paulo (PANGENE/UNESP) pela colaboração inestimável e pelo suporte contínuo ao longo de todas as etapas do projeto. Por último, expressamos nossa gratidão ao York Biomedical Research Institute pela parceria nas análises de dados. Reconhecemos que, sem o respaldo e a colaboração dessas instituições, este trabalho não teria sido concretizado.

REFERÊNCIA

1. WHO world HO. Leishmaniasis [Internet]. 2023 [cited 2023 Jun 23]; Available from: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>
2. Lainson R. Especies neotropicales de Leishmania: una breve revisión histórica sobre su descubrimiento, ecología y taxonomía. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 2010;1(2):13–32.
3. Silva ES da, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2002;44:145–9.
4. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2017;10(1):82.
5. Tolezano JE, Uliana SRB, Taniguchi HH, et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2007;149(3):280–4.

6. Castro LS, França A de O, Ferreira E de C, et al. *Leishmania infantum* AS A CAUSATIVE AGENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN THE STATE OF MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2016;58:23.
7. Lyra MR, Pimentel MIF, Madeira M de F, et al. FIRST REPORT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* IN AN URBAN AREA OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2015;57:451–4.
8. Alves NO, Oshiro JA, Silva YC, et al. VL-HIV co-infection with *Leishmania* containing skin lesions resembling para-kala-azar dermal leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2024;18(8):e0012438.
9. PAHO/WHO. Leishmaniose visceral - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. 2023 [cited 2023 Jun 23]; Available from: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-visceral>
10. PAHO/WHO OP de la S. LEISHMANIOSES Informe epidemiológico das Américas [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2023 [cited 2024 Feb 4]. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/59170>
11. MATO GROSSO DO SUL. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA 2022 [Internet]. 2023; Available from: https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/02/Boletim_leish_visceral_023-Final.pdf
12. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2004;27(5):305–18.
13. Castillo-Castañeda A, Patiño LH, Muñoz M, et al. Amplicon-based next-generation sequencing reveals the co-existence of multiple *Leishmania* species in patients with visceral leishmaniasis. *Int J Infect Dis* 2022;115:35–8.
14. das Chagas BD, Pereira TM, Cantanhêde LM, et al. Interspecies and Intrastrain Interplay among *Leishmania* spp. *Parasites. Microorganisms* 2022;10(10):1883.
15. Bussotti G, Gouzelou E, Côrtes Boité M, et al. *Leishmania* Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification. *mBio* 2018;9(6):e01399-18.
16. Imamura H, Dujardin J-C. A Guide to Next Generation Sequence Analysis of

Leishmania Genomes [Internet]. In: Clos J, editor. Leishmania: Methods and Protocols. New York, NY: Springer; 2019 [cited 2024 Mar 3]. p. 69–94. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9210-2_3

17. Brasil M da Saúde S de V em S. Leishmaniose Visceral Grave: Normas E Condutas. MS; 2006.

18. Santos RC dos, Pinho FA de, Passos GP, Lorangeira DF, Barrouin-Melo SM. *Isolamento de Leishmania infantum* naturalmente infectante a partir de amostras caninas em meio Novy-MacNeal-Nicolle preparado com sangue desfibrinado de diferentes espécies animais. *Veterinary Parasitology* 2018;257:10–4.

19. Arruda CCP, Haroim D de J, Rizk YS, et al. A Triazole Hybrid of Neolignans as a Potential Antileishmanial Agent by Triggering Mitochondrial Dysfunction. *Molecules* 2020;25(1):37.

20. Carvalho KSS, da Silva Júnior WJ, da Silveira Regueira Neto M, et al. Application of next generation sequencing (NGS) for descriptive analysis of 30 genomes of *Leishmania infantum* isolates in Middle-North Brazil. *Sci Rep* 2020;10(1):12321.

21. Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2003;47(1):349–58.

22. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30(15):2114–20.

23. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res* 1998;8(3):175–85.

24. Ewing B, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Res* 1998;8(3):186–94.

25. MATO GROSSO DO SUL S de E de S. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO: LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA 2022. Campo Gande: 2023.

26. Patiño LH, Castillo-Castañeda AC, Muñoz M, et al. Development of an Amplicon-Based Next-Generation Sequencing Protocol to Identify *Leishmania* Species and Other Trypanosomatids in Leishmaniasis Endemic Areas. *Microbiol Spectr* 2021;9(2):e0065221.

27. Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls A-L, Le Pont F. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum*/*L. chagasi* in a case of diffuse

cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002;96(5):529–32.

28. Veland N, Valencia BM, Alba M, et al. Simultaneous Infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) lainsoni* in a Peruvian Patient with Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2013;88(4):774–7.

29. Gibson W. The sexual side of parasitic protists. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2021;243:111371.

30. Grünebast J, Clos J. *Leishmania*: Responding to environmental signals and challenges without regulated transcription. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2020;18:4016–23.

31. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011;105(1):1–6.

32. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology* 2023;12(7):997.

33. Miller S, Chiu C. The Role of Metagenomics and Next-Generation Sequencing in Infectious Disease Diagnosis. *Clinical Chemistry* 2022;68(1):115–24.

34. Pathak L, Das B. Initiation of Post-Primary Tuberculosis of the Lungs: Exploring the Secret Role of Bone Marrow Derived Stem Cells. *Frontiers in Immunology* [Internet] 2021 [cited 2024 Mar 3];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.594572>

35. An DTV, Tung NT, Ha BTV, Tam VM, Cuong DD. A Case of Histoplasmosis Detected Through Bone Marrow Analysis. *Clin Med. Insights Pathol* 2023;16:2632010X231180798.

36. Bruhn FRP, Werneck GL, Barbosa DS, et al. Spatio-temporal dynamics of visceral leishmaniasis in Brazil: A nonlinear regression analysis. *Zoonoses and Public Health* 2024;71(2):144–56.

37. Celeste JLDL, Moura APV, França-Silva JC, et al. Experimental mixed infection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*L.*) *infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology* 2017;144(9):1191–202.

38. Okwor I, Uzonna JE. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol*

Res 2013;56(1):163–71.

39. Lindoso JAL, Moreira CHV, Celeste BJ, Oyafuso LKM, Folegatti PM, Zijlstra EE. Para-kala-azar dermal leishmaniasis in a patient in Brazil: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018;51(1):105–7.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho originou-se inicialmente em um artigo e dois manuscritos, abordando uma série de casos, o perfil epidemiológico dos pacientes adultos atendidos no hospital de referência e uma análise genômica das espécies circulantes no estado;

A série de casos relatou três casos de Leishmaniose Dérmica Para-Kala-azar (Para-KDL) em Mato Grosso do Sul, de pacientes atendidos Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Humap-UFMS/Ebserh), descrevendo a conduta médica e terapêutica até o desfecho final.

O estudo analisou minuciosamente as características clínicas e epidemiológicas da leishmaniose visceral, utilizando dados dos prontuários médicos para traçar o perfil epidemiológico dos pacientes adultos atendidos no Humap-UFMS/Ebserh, um importante centro de referência para a doença.

O trabalho identificou a coexistência de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* em isolados de cultura provenientes de amostras de pacientes do hospital de referência, utilizando sequenciamento genômico completo por meio da tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS).

REFERÊNCIAS

- AGABIAN, N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1157–1160, jun. 1990.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, mar. 2016.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, 2017.
- ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, p. 175–180, 1962.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- ALVES, Natália O.; OSHIRO, Jéssica A.; SILVA, Yunna C.; *et al.* VL-HIV co-infection with Leishmania containing skin lesions resembling para-kala-azar dermal leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 8, p. e0012438, 2024. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0012438>>. Acesso em: 6 out. 2024.
- ALVES SOUZA, N. et al. Detection of mixed Leishmania infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 193, p. 12–17, maio 2019.
- BACKES, Marli Terezinha Stein; ROSA, Luciana Martins da; FERNANDES, Gisele Cristina Manfrini; *et al.* Conceitos de saúde e doença ao longo da história sob o olhar epidemiológico e antropológico. **Rev. enferm. UERJ**, 2009. Disponível em: <<http://www.revenf.bvs.br/pdf/reuerj/v17n1/v17n1a21.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2024.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, set. 2004.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007.
- BAXTER, S. W. et al. Linkage Mapping and Comparative Genomics Using Next-Generation RAD Sequencing of a Non-Model Organism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, abr. 2011.
- BOITÉ, M. C. et al. New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of Leishmania (Viannia) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1888, 1 nov. 2012.
- BRASIL. **Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 26 nov. 2023.
- BRASIL, M. DA A. **Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS**. Brasília, DF: [s.n.].

BRASIL, M. DA S. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Editora MS, 2014.

BRASIL, M. DA S. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV. n. 1º, p. 109, 2015.

BRASIL, M. DA S. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**. , 2018. . Acesso em: 2 fev. 2024

BRASIL, Ministério da Saúde. **NOTA TÉCNICA Nº 49/2024-CGZV/DEDT/SVSA/MS**. 2024. Disponível em: <file:///C:/Users/UFG.DESKTOP-UE7KDBS/Downloads/SEI_0042165050_Nota_Tecnica_49.pdf>

BRASIL, M. DA S. **Gráfico e mapas dos casos de Leishmaniose Visceral 2022**. , 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-graficos-e-mapas.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2024

BRASIL, M. DA S. **Estratificação de risco da leishmaniose visceral por município de infecção. Brasil, 2020 a 2022**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/estratificacaolv_20a22.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2024.

BRASIL, M. DA S. S. DE V. EM S. D. DE V. **Leishmaniose Visceral: Recomendações clínicas para a redução da letalidade**. [s.l.] Ms, 2011.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. Em: **Flebotomíneos no Brasil**. [s.l: s.n.]. p. 257–274.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, set. 2018.

CARNIELLI, J. B. T. et al. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **EBioMedicine**, v. 36, p. 83–91, out. 2018.

CARVALHO, M. C. DA C. G. DE; SILVA, D. C. G. DA. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735–744, 2010.

CARVALHO, K. S. S.; SILVA JÚNIOR, W. J.; SILVEIRA R. N. M; *et al.* Application of next generation sequencing (NGS) for descriptive analysis of 30 genomes of *Leishmania infantum* isolates in Middle-North Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12321, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-68953-9>. Acesso em: 27 fev. 2024.

CASADO, J. L. et al. Relapsing Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients Undergoing Successful Protease Inhibitor Therapy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 202–205, 1 abr. 2001.

COHEN, C. et al. Leishmaniasis acquired in Belgium. **The Lancet**, v. 338, n. 8759, p. 128, 13 jul. 1991.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 361–372, out. 1990.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil**, v. 75, n. 1, p. 3–17, 2005.

COTA, G. F.; SOUSA, M. R. DE; RABELLO, A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-Infected Patients: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1153, 7 jun. 2011.

COX, F. Classification and introduction to the parasitic protozoa. Em: D, C. F.; GILLESPIES; DESPOMMIER (Eds.). London: Hodder Headline, 2005. v. 6p. 186–199.

CROFT, S.; YARDLEY, V. Chemotherapy of Leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 319–342, fev. 2002.

CRUZ, I. et al. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1124–1125, 30 mar. 2002.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 264, maio 2016.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **Hospital**, v. 47, p. 75–87, 1954.

DESJEUX, P. Global control and Leishmania HIV co-infection. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 317–325, maio 1999.

DOWNING, T. et al. Genome-wide SNP and microsatellite variation illuminate population-level epidemiology in the Leishmania donovani species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 1, p. 149–159, jan. 2012.

EJAZI, S. A.; ALI, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 1, p. 79–98, 1 jan. 2013.

ERBER, A. C. et al. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 34, 24 jan. 2022.

FILHO, J. A. D. S.; MOL, M. P. G.; MEDEIROS, F. A. C. **Assessment of Diagnostic Assays for Visceral Leishmaniasis: A Diagnostic Test Validation Study**. [s.l.] In Review, 24 jul. 2023. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-3178823/v1>>. Acesso em: 9 fev. 2024.

FRAGA, D. B. M. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting Leishmania infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3, p. 591–594, 21 dez. 2012.

FREIRE, M. L.; ASSIS, T. M.; OLIVEIRA, E. *et al.* Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007484, 2019. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007484>>. Acesso em: 13 set. 2024.

GALATI, E. A. B.; RODRIGUES, B. L. A Review of Historical Phlebotominae Taxonomy (Diptera: Psychodidae). **Neotropical Entomology**, v. 52, n. 4, p. 539–559, ago. 2023.

GIBSON, W. C.; SWINKELS, B. W.; BORST, P. Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in Trypanosoma brucei. **Journal of Molecular Biology**, v. 201, n. 2, p. 315–325, maio 1988.

GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during

the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, Host–Microbe Interactions: Fungi/Parasites/Viruses. v. 13, n. 4, p. 473–479, 1 ago. 2010.

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

GOURBAL, B. et al. Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31010–31017, 23 jul. 2004.

HOTEZ, P. J. et al. What constitutes a neglected tropical disease? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0008001, 30 jan. 2020.

HURISSA, Z. et al. Clinical characteristics and treatment outcome of patients with visceral leishmaniasis and HIV co-infection in northwest Ethiopia. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 7, p. 848–855, 2010.

INCEBOZ, T. **Current Topics in Neglected Tropical Diseases**. [s.l.] IntechOpen, 2019. v. 3

JARVIS, J. N.; LOCKWOOD, D. N. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 1, fev. 2013.

KAPLAN, J. E.; MASUR, H.; HOLMES, K. K. **Diretrizes para Prevenção de Infecções Oportunistas entre Pessoas Infectadas pelo HIV – 2002** </P>. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/MMWR/preview/MMWRhtml/tr5108a1.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2023.

KARIMI, A.; ALBORZI, A.; AMANATI, A. Visceral Leishmaniasis: An Update and Literature Review. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, 2016.

KATAKURA, K. et al. Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2173–2177, ago. 1998.

KERR, S. F. Palaeartic origin of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 75–80, jan. 2000.

KOEHLER, J. W. et al. Aspartic protease activities of schistosomes cleave mammalian hemoglobins in a host-specific manner. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 83–85, fev. 2007.

KRAFT, L. et al. Comparison of amphotericin B lipid complex, deoxycholate amphotericin B, fluconazole, and anidulafungin activity against *Candida albicans* biofilm isolated from breakthrough candidemia. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 41, n. 10, p. 596–603, 1 dez. 2023.

KU, C.-S.; ROUKOS, D. H. From next-generation sequencing to nanopore sequencing technology: paving the way to personalized genomic medicine. **Expert Review of Medical Devices**, v. 10, n. 1, p. 1–6, jan. 2013.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, mar. 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, dez. 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology**, p. 1–120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world Leishmaniasis. Em: **Parasitology**. Topley & Wilson's microbiology & microbial infections. 10. ed. London: Hodder Arnold, 2005. p. 313–344.

LEPROHON, P. et al. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 5, p. 1387–1399, abr. 2009.

LEPROHON, P. et al. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 1, p. 26–35, abr. 2015.

LIU, L. et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–11, abr. 2012.

LIVELY, C. M.; DYBDAHL, M. F. Parasite adaptation to locally common host genotypes. **Nature**, v. 405, n. 6787, p. 679–681, jun. 2000.

LLANES, A. et al. Genomic diversity and genetic variation of *Leishmania panamensis* within its endemic range. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 103, p. 105342, 1 set. 2022.

MABEY, D. et al. Towards a comprehensive research and development plan to support the control, elimination and eradication of neglected tropical diseases. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 115, n. 2, p. 196–199, 28 jan. 2021.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941–2947, dez. 2008.

MALECELA, M N; DUCKER, C. **A road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article/115/2/121/6121890?login=true>>. Acesso em: 29 nov. 2023.

MARUF, S. et al. Revisiting the diagnosis and treatment of Para Kala-azar Dermal Leishmaniasis in the endemic foci of Bangladesh. **PLOS ONE**, v. 18, n. 1, p. e0280747, 20 jan. 2023.

MARY, C. et al. REFERENCE VALUES FOR LEISHMANIA INFANTUM PARASITEMIA IN DIFFERENT CLINICAL PRESENTATIONS: QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THERAPEUTIC MONITORING AND PATIENT FOLLOW-UP. **The**

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 75, n. 5, p. 858–863, 1 nov. 2006.

MATO GROSSO DO SUL, S. DE S. DO M. G. DO S. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA 2022. 16 fev. 2023.

MAURÍCIO, I. L. *Leishmania Taxonomy*. Em: BRUSCHI, F.; GRADONI, L. (Eds.). **The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 15–30.

MAURYA, R. et al. Evaluation of Blood Agar Microtiter Plates for Culturing *Leishmania* Parasites To Titrate Parasite Burden in Spleen and Peripheral Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1932–1934, maio 2010.

MAZIRE, P.; AGARWAL, V.; ROY, A. Road-map of pre-clinical treatment for Visceral Leishmaniasis. **Drug Development Research**, v. 83, n. 2, p. 317–327, abr. 2022.

MEINECKE, C. K. et al. Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala Azar) From an Asymptomatic Mother to Her Child. **Pediatrics**, v. 104, n. 5, p. e65, 1 nov. 1999.

MIGONE, L. E. Un caso de Kalazar a Assuncion (Paraguay). **Bulletin De La Societé De Pathologie Exotique**, v. 6, p. 118–120, 1913.

MOHAMMADI, J. et al. Review and A Brief Report on the Health Perspective, Causative Agents, Vectors, and Reservoirs of Visceral Leishmaniasis in Iran. **Journal of Health Sciences & Surveillance System**, v. 10, n. 3, p. 257–265, 1 jul. 2022.

MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 8, p. 919–944, 1 ago. 2010.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Para Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Case Report. **Cureus**, 12 jan. 2023.

MONTALVO, A. M. et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World. **Parasitology**, v. 137, n. 8, p. 1159–1168, jul. 2010.

MUKHERJEE, A. et al. Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant Leishmania. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 189–202, mar. 2013.

MÜLLER, M. et al. Rapid decay of unstable Leishmania mRNAs bearing a conserved retroposon signature 3'-UTR motif is initiated by a site-specific endonucleolytic cleavage without prior deadenylation. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 17, p. 5867–5883, set. 2010.

MÜLLER, M.; PADMANABHAN, P. K.; PAPADOPOULOU, B. Selective inactivation of SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay contributes to stage- and species-specific gene expression in Leishmania. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 471–491, jun. 2010.

MYLER, P. J.; STUART, K. D. Recent developments from the Leishmania genome project. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 412–416, ago. 2000.

OLIVEIRA, E. F. DE et al. Experimental infection and transmission of Leishmania by Lutzomyia cruzi (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005401, 24 fev. 2017.

PAHO/WHO. **Leishmaniose visceral - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 23 jun. 2023a.

PAHO/WHO, O. P. DE LA S. **Leishmanioses - Informe Epidemiológico das Américas**. Washington, D.C.: OPAS, 2019. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=>>>. Acesso em: 19 jul. 2020.

PAHO/WHO, O. P. DE LA S. **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição**. [s.l.] Pan American Health Organization, 2022.

PAHO/WHO, O. P. DE LA S. **LEISHMANIOSES Informe epidemiológico das Américas**. Washington, D.C.: OPAS, 2023b. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/59170>>. Acesso em: 4 fev. 2024.

PEDROSA, CELIA M. S. **The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**. [s.l.] BoD – Books on Demand, 2017.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 18, p. 949–950, 1934.

PICCICA, M. et al. Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and

visceral human leishmaniasis: a systematic review. **Journal of Travel Medicine**, v. 28, n. 6, p. taab065, 1 ago. 2021.

POINAR, G.; POINAR, R. Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese Amber. **Protist**, v. 155, n. 3, p. 305–310, 1 set. 2004.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, dez. 2017.

PORTO, V. B. G. et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* associated with Hodgkin's lymphoma. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, p. e51, 5 set. 2022.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 3 maio 2014.

REIMÃO, J. Q. et al. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, nov. 2020.

ROGERS, M. B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, jan. 2011.

SAGAERT, X. et al. Macrophage-related diseases of the gut: a pathologist's perspective. **Virchows Archiv**, v. 460, n. 6, p. 555–567, 1 jun. 2012.

SALARI, S. et al. Global distribution of treatment resistance gene markers for leishmaniasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 8, p. e24599, 2022.

SALOTRA, P. et al. Development of a Species-Specific PCR Assay for Detection of *Leishmania donovani* in Clinical Samples from Patients with Kala-Azar and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 849–854, mar. 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, dez. 1977.

SANTI, A. M. M.; MURTA, S. M. F. Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of *Leishmania* spp. in Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.

SANTOS, R. C. DOS et al. *Isolamento de Leishmania infantum* naturalmente infectante a partir de amostras caninas em meio Novy-MacNeal-Nicolle preparado com sangue desfibrinado de diferentes espécies animais. **Veterinary Parasitology**, v. 257, p. 10–14, 15 jun. 2018.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 1 maio 2021.

SCARPINI, S. et al. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, 21 set. 2022.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349–358, set. 2003.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 466–469, 1 out. 2010.

SHAHEEN, Mohamed N. F. The concept of one health applied to the problem of zoonotic diseases. **Reviews in Medical Virology**, v. 32, n. 4, p. e2326, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.2326>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

SHANKAR, E. M. et al. Common protozoans as an uncommon cause of respiratory ailments in HIV-associated immunodeficiency | *Pathogens and Disease* | Oxford Academic. v. 57, p. 93–103, 2009.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. **J VECTOR BORNE DIS**, 2008.

SINGH, O. P. et al. Envisioning the innovations in nanomedicine to combat visceral leishmaniasis: for future theranostic application. **Nanomedicine**, v. 14, n. 14, p. 1911–1927, jul. 2019.

SOUZA, A. A. et al. Diagnostics and the neglected tropical diseases roadmap: setting the agenda for 2030. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 115, n. 2, p. 129–135, 28 jan. 2021.

SOUZA-FILHO, Job Alves; MOL, Marcos Paulo Gomes; MEDEIROS, Fernanda Alvarenga Cardoso. An algorithm for visceral leishmaniasis diagnosis in Brazil from a 10-year analysis of National Reference Laboratory data. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p. 87, 2024. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00436-023-08105-w>>. Acesso em: 13 set. 2024.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2011.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 fev. 2017.

SUNDAR, S. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1739–1746, 28 nov. 2002.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2 jan. 2019.

SUNYOTO, T.; BOELAERT, M.; MEHEUS, F. Understanding the economic impact of leishmaniasis on households in endemic countries: a systematic review. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 17, n. 1, p. 57–69, jan. 2019.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, n. 2, p. 107–108, 1993.

UBEDA, J. M. et al. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. **Genome Biology**, v. 9, n. 7, p. R115, jul. 2008.

VALDIVIA, H. O. et al. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40804, 16 jan. 2017.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, 15 jul. 2011.

VAN BELKUM, A. Molecular diagnostics in medical microbiology: yesterday, today and tomorrow. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 5, p. 497–501, 1 out. 2003.

WAMAI, R. G. et al. Visceral leishmaniasis: a global overview. **Journal of Global Health Science**, v. 2, n. 1, 14 maio 2020.

WHO, WORLD H. O. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 23 jun. 2023a.

WHO, W. H. O. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. **Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010**, WHO technical report series ; 949. 2010.

WHO, W. H. O. **Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

WHO, W. H. O. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals A road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. , 2020. . Acesso em: 16 dez. 2023

WHO, W. H. O. **Neglected tropical diseases -- GLOBAL**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases>>. Acesso em: 29 nov. 2023b.

ZIJLSTRA, E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 87–98, 1 fev. 2003.

ZIJLSTRA, E. E. PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3258, 20 nov. 2014.

ZIJLSTRA, E. E. Biomarkers in Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 2019.