

# ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO PARA DETERMINAR PREVALÊNCIA DE LEISHMANIA VISCERAL NA POPULAÇÃO HIV POSITIVA EM PORTUGAL

## - PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO -

### Investigadora Responsável

Professora Doutora Anabela Cordeiro da Silva

### Instituição proponente

Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC)- Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S),  
Universidade do Porto.

### Instituições Participante

Associação Portuguesa para o Estudo Clínico da SIDA (APECS)

### Equipa

Dra. Ana Isabel Pinto (IBMC/I3S)

Dr. Nuno Santarém (IBMC/I3S)

### **Introdução**

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitas protozoários pertencentes ao género *Leishmania*. O género *Leishmania* inclui aproximadamente 30 espécies, a maioria das quais infeta o Homem originando quatro apresentações clínicas diferentes, sendo a leishmaniose visceral (LV) a forma mais severa da doença. A transmissão da infeção ocorre na sequência da picada de moscas fêmea dos géneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* [1]. As estimativas mais recentes sugerem a existência de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos por ano em todo o mundo [2]. Em Portugal, apesar do contágio inter-humano ser possível, na sequência de transfusões ou de partilha seringas, o cão é o principal reservatório da doença e também o principal hospedeiro deste parasita [3].

Na ausência de tratamento a LV é fatal sendo por isso, face à inexistência de vacina humanas, essencial o tratamento dos pacientes. As abordagens terapêuticas para tratar a LV estão limitadas pela toxicidade dos fármacos e por um aumento da resistência às terapias de primeira linha. Consequentemente, a frequência de recidivas é significativa, podendo os pacientes sucumbir à patologia associada a LV ou tornarem-se mais vulneráveis a infeções oportunistas. O diagnóstico depende do exame microscópico (invasivo) de aspirados de baço e medula óssea com uma precisão variável, exigindo instalações bem equipadas e pessoal qualificado [4]. Vários testes serológicos foram avaliados e propostos para o diagnóstico de LV, contudo as abordagens existentes são de valor limitado no contexto de infeções assintomáticas e também na avaliação de sucesso terapêutico. Como tal, não há biomarcadores validados para prever a progressão de doença sorologicamente positiva para ativa, resposta ao sucesso do tratamento ou recaída pós-quimioterapia [5]. Consequentemente esta é uma das principais

prioridades de pesquisa destacada pelo comitê de especialistas da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre o controlo da LV [6].

Nos últimos anos, o crescimento económico, as mudanças climáticas e os movimentos migratórios em todo o mundo contribuíram para o surgimento da leishmaniose em locais cuja incidência era muito baixa. Consequentemente, o maior desafio para o controlo e eventual eliminação da doença é o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas não invasivas capazes de detetar pacientes com leishmaniose assintomática, monitorizar pacientes em um estágio diferente da doença e prever a resposta ao tratamento [4, 6].

A LV na Europa é um problema de saúde pública latente e os riscos de emergência incluem a emigração, o aumento do número de pessoas imunossuprimidas e as alterações na distribuição dos vetores de flebotómicos devido à mudança climática [7]. Em 2014, segundo a OMS, a Espanha apresentou uma alta taxa de incidência (> 100 casos / ano). Este risco de infeção é potenciado nas populações com maior susceptibilidade. Efetivamente em todo o sul da Europa, há uma alta incidência de portadores assintomáticos de LV, como demonstrado pelo aumento da prevalência de co-infeções com o VIH ou em outras condições imunodeprimidas desde os anos 80 [8]. De facto, a LV é uma das infeções parasitárias mais comuns em pacientes com VIH, a seguir à toxoplasmose e à criptosporidiose. As co-infeções por LV-VIH impõem um enorme desafio clínico, uma vez que as duas condições se reforçam mutuamente. Esta condição é agravada pelas dificuldades na deteção da infeção [9]. Efetivamente, em doentes imunocomprometidos os testes serológicos de LV são menos precisos e os testes moleculares, embora mais precisos, são mais raros em contextos de cuidados de saúde primários. Consequentemente, o diagnóstico geralmente depende de procedimentos invasivos, que não podem ser frequentemente repetidos, e que têm riscos acrescidos em grupos de doentes mais vulneráveis. Em contextos de imunossupressão o tratamento também é extremamente desafiante sendo muitas vezes mal sucedido com a maioria dos pacientes a recidivar após cura clínica inicial aparente. Como tal, seria extremamente importante identificar a infeção por LV antes do início da doença, visando a fase latente ou precoce da infeção (como para outras infeções oportunistas) e desenvolver ferramentas de prognóstico clínico (biomarcadores), integrando as informações clínicas relativas à infeção por VIH e *Leishmania* [10].

Outra preocupação, enfatizada recentemente pela OMS, é a falta de vigilância e notificação de casos de LV, o que é fundamental para determinar a real prevalência e delinear estratégias globais para avaliar e gerir o risco de transmissão [11].

Em Portugal, a leishmaniose é endémica, causada pela espécie *L. infantum*, sendo a apresentação clínica predominante, a leishmaniose visceral. Entre 2008 e 2013, e segundo o último relatório das Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012 da Direção-Geral da Saúde (DGS), foram notificados 42 casos de leishmaniose (38 confirmados). Contudo estes valores representam, aparentemente, uma subestimação grosseira já que segundo o descrito por Serra E., entre 1999-2009, dos 375 indivíduos foram internados com LV em vários hospitais de Portugal continental, mas só 38,6% dos casos foram notificados [3, 12]. Por outro lado, de acordo com os dados da OMS, em 2011 e 2012, não foram declarados casos de leishmaniose em Portugal e o relatório anual de 2013 do European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) não refere quaisquer dados sobre a ocorrência de leishmaniose nos países europeus, informações que suportam a existência de subnotificação significativa desta parasitose em Portugal [12].

## JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

O aumento da incidência de doenças infecciosas transmitidas por vectores na Europa é um problema de saúde emergente. Neste contexto, vários estudos indicam um aumento na incidência de LV na bacia mediterrânica e o alastramento das zonas endêmicas [13, 14].

No entanto, dada a elevada percentagem de subnotificação da LV em Portugal é difícil estimar o impacto desta doença na saúde pública [14, 15]. Por exemplo num dos raros estudos focados na caracterização do perfil epidemiológico da Leishmaniose diagnosticada em Portugal entre 1999-2009 estimou-se uma subnotificação na ordem dos 61.4% [16]. É por isso premente determinar a real prevalência da coinfeção VIH-VL para que estratégias globais para avaliar e gerir o risco de transmissão sejam delineadas [11, 17, 18].

Nas últimas décadas, a LV surgiu como uma importante infeção oportunista associada ao VIH, o que tem importantes implicações clínicas, diagnósticas e epidemiológicas, constituindo um problema de saúde pública latente na Europa [19-21]:

- Os pacientes infectados pelo VIH são particularmente vulneráveis à LV, enquanto a LV acelera a progressão do VIH para a SIDA.
- Nos doentes co-infectados com LV-VIH, a quimioterapia é menos eficiente e as recaídas são frequentes (elevada taxa de morbilidade e mortalidade).
- As recaídas recorrentes, ao promoverem a seleção de clones resistentes, têm o potencial de contribuir para o aumento da resistência aos fármacos, particularmente em condições permissivas à transmissão leishmaniose antroponótica.
- Os pacientes co-infectados podem apresentar parasitemia elevada podendo atuar como reservatório, tornando-se uma fonte de infeção para o inseto vetor.

Levando em consideração o prognóstico desfavorável da coinfeção e o alto risco de recidivas, seria extremamente importante identificar a infeção VL antes do início da doença, visando o estágio latente ou precoce da infeção (assim como para outras infeções oportunistas) [10, 22].

Em doentes imunocomprometidos os testes serológicos para diagnosticar a LV são menos precisos e os testes moleculares, embora mais precisos, são mais raros em contextos de cuidados de saúde primários [5, 23]. Consequentemente, o diagnóstico geralmente depende de procedimentos invasivos, que não podem ser frequentemente repetidos, e que têm riscos acrescidos em grupos de doentes mais vulneráveis [10]. É por isso urgente desenvolver novos testes de detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, que sejam fidedignos no diagnóstico de LV em doentes VIH+.

## OBJECTIVOS

- Determinar a prevalência de LV na população VIH+ em Portugal, por técnicas de biologia molecular e por técnicas serológicas (detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em circulação).
- Validar o uso de novos antígenos recombinantes no diagnóstico de LV em doentes VIH+ na população portuguesa.
- Criação de Biobanco de componentes sanguíneos para estudos longitudinais de doentes VIH-VL:
  - estabelecer uma assinatura de biomarcadores para diagnosticar e monitorizar o tratamento da LV em pacientes VIH+
  - estabelecer biomarcadores para identificação de casos VL assintomáticos e subclínicos

O projeto aqui apresentado insere-se num projeto maior, desenvolvido em parceria com o Instituto de Salud Carlos III – Espanha (laboratório de referência para o estudo de Leishmanioses na Europa), que tem por objectivo final definir assinaturas serológicas e celulares em sangue periférico para estratificação da doença.

### ***Metodologia tipo – Recrutamento de Participantes***

Pretende-se incluir neste estudo o número de participantes possível de doentes VIH+, co-infectados com VIH-LV ou LV, e tenham indicação para realização de análises de rotina periódicas, por um período de 8 meses desde o início do projecto. Os critérios de inclusão no estudo são: adultos (18-65 anos).

As amostras de sangue total e soro dos doentes sinalizados pelo serviço de Infeciologia e/ou Medicina Interna, à chegada ao laboratório serão identificadas com um número individual de amostra anonimizada. As amostras (sangue total e soro\plasma) serão fornecidas ao Grupo de Doenças Parasitárias (IBMC\i3S) pelos Laboratórios de Patologia Clínica, após conclusão do circuito de análise. Estas amostras serão depois caracterizadas para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* e DNA do parasita no laboratório de Doenças Parasitárias do IBMC\i3S.

Os investigadores do grupo de Doenças Parasitárias do IBMC\i3S não terão acesso a nenhum dado biográfico, epidemiológico ou clínico relativo ao doente, só acedida pelo médico assistente responsável pela seleção dos doentes (VIH+ com idade entre os 18-65 anos). Este estudo não implica métodos invasivos (será usado material recolhido no seguimento de análises de rotina após a conclusão do circuito de análise), nem deslocações específicas dos participantes.

### ***Financiamento***

Qualquer encargo inerente a este projeto será da responsabilidade do Grupo de Doenças Parasitárias do IBMC-i3S (<https://www.i3s.up.pt/content/research-group-detail?x=43>)

### ***Cronograma***

Estima-se o início da recolha das amostras biológicas a partir de Julho de 2019 durante um período de 8 meses. Seguir-se-á o processamento das amostras e análise de dados. A apresentação final dos resultados está prevista para 2021.

### **Colaboração da APECS:**

- Parceria Institucional na aplicação e divulgação do projecto.
- Facilitador no contacto com clínicos que possam colaborar no projeto.
- Plataforma para divulgação dos resultados junto dos seu associados e corpos clínicos relevantes.

### **Bibliografia**

1. Kaye, P. and P. Scott, (2011). *Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface*. Nature Reviews Microbiology, **9**(8): p. 604-615.
2. Pace, D., (2014). *Leishmaniasis*. Journal of Infection, **69**: p. S10-S18.
3. Serrada E. A leishmaniose visceral em Portugal continental (1999-2009), L.s.n. and p.-D.d.m. 2010).
4. Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, et al., (2007). *Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?* Nature Reviews Microbiology, **5**(11): p. 873-882.
5. Kip, A.E., M. Balasegaram, J.H. Beijnen, et al., (2015). *Systematic Review of Biomarkers To Monitor Therapeutic Response in Leishmaniasis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **59**(1): p. 1-14.
6. *World Health Organization (WHO). Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines. Geneva, Switzerland: WHO; 2012. Available at: [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis\\_worldwide\\_epidemiological\\_and\\_drug\\_access\\_update.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf) [accessed 11.12.13].*
7. Ready, P.D., (2010). *Leishmaniasis emergence in Europe*. Eurosurveillance, **15**(10): p. 29-39.
8. [https://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv\\_coinfection/burden\\_hiv\\_coinfection/en/](https://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/).
9. Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, et al., (2008). *The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years*. Clinical Microbiology Reviews, **21**(2): p. 334-+.
10. van Griensven, J., E. Diro, R. Lopez-Velez, et al., (2014). *A Screen-and-Treat Strategy Targeting Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Individuals in Endemic East African Countries: The Way Forward?* Plos Neglected Tropical Diseases, **8**(8).
11. [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1)).
12. <http://hdl.handle.net/10400.18/2291>).

Lisboa, 28 de Fevereiro

(Anabela Cordeiro da Silva, MSc, PhD)

(Ana Pinto, PhD)