

Artigo original

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

Daniela Moura Parente¹, Danielle Alves Zacarias¹, Carlos Henrique Nery Costa²

¹Laboratório de Pesquisa de Leishmaniose – Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella

²Universidade Federal do Piauí – UFPI

Submissão: 21/10/2014

Aceite: 07/11/2014

daniela_parente@hotmail.com

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma protozoonose de evolução lenta, grave, fatal quando não tratada e pode alcançar letalidade entre 10% e 98% em casos tratados inadequadamente e não tratados, respectivamente. Objetivo: Analisar o potencial da saliva na transmissão de *L. infantum* entre humanos de uma área endêmica de LV e a influência da presença do vírus HIV na transmissão do parasita. Método: Estudo transversal com 64 pacientes portadores de Leishmaniose visceral com e sem HIV e pessoas que residiam na mesma moradia desses pacientes. Resultados: Não houve associação estatística entre ter pelo menos um coabitante infectado e as variáveis sexo, CD4, Carga viral, Idade, qPCR saliva e qPCR sangue, mas houve associação estatística entre ter pelo menos um coabitante infectado e carga viral. Podemos observar na análise multivariada que a chance de um paciente com carga viral maior que 50 cópias virais/mm³ é 0,9734 vezes maior em relação aos pacientes com carga viral menor que 50 cópias virais/mm³. Conclusões: Os resultados não conseguiram mostrar uma correlação significativa da transmissão do parasita com sua presença na saliva, bem como não demonstrou a real importância da influência do HIV nessa dinâmica, talvez pelo reduzido número de indivíduos pesquisados. Mas a pesquisa foi importante na tentativa de entendimento de novas possibilidades de transmissão da *Leishmania* e sua relação com o HIV.

DESCRIPTORES: *Leishmania*. HIV. Transmissão. Saliva. qPCR. Montenegro.

INTRODUÇÃO:

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

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

O crescimento da epidemia ainda é pronunciado nas demais áreas do País. A epidemia vem atingindo, também, de maneira importante, os indivíduos com menor escolaridade e de cidades menores.⁵ Até junho de 2003, quase 100 casos de coinfeção de HIV com espécies de *Leishmania*

haviam sido notificados no País. A LV foi responsável por 37% destes casos.

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

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

Em áreas infectadas com Leishmania, normalmente o principal parâmetro para registrar a intensidade da infecção parasitária, é a contagem da densidade de Leishmania no intestino do flebótomo, além dessa análise é interessante também a quantificação de parasitas no organismo do indivíduo infectado. A intradermoreação idealizada por Montenegro representa o principal exame complementar para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em áreas endêmicas, sendo, portanto, de relevante importância para países como o Brasil.⁶

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

MÉTODOS

População de estudo

O estudo transversal foi realizado nos anos 2008-2010, com 64 indivíduos residentes em Teresina- Piauí e Timon-Maranhão, estados do Nordeste brasileiro, áreas endêmicas e de intensa transmissão da *Leishmania infantum*. Foram incluídos na pesquisa: (A) pessoas que fizeram teste anti-HIV no Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí (LACEN-PI) e tiveram o teste anti-*L. infantum* reagente. Esta população inclui (1) os pacientes internados no Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portella de Teresina (IDTNP) com Leishmaniose visceral (LV) com e sem HIV e também (2) as pessoas assintomáticas que fazem o teste anti-HIV e tiveram o teste anti-*L. infantum* com resultado reagente; (B) Pessoas que residam com as pessoas e pacientes com infecção por *L. infantum*.

Foram excluídos do estudo pessoas que não quiseram participar, índios e crianças menores de 01 ano ou que não se conseguiu fazer a coleta da quantidade de saliva suficiente.

Diagnóstico do estudo

Infecção por HIV: Utilizou-se dois testes comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA)

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

Diagnóstico molecular: extração e quantificação do DNA

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

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

Reação de Montenegro

Foi administrado 0,1ml do antígeno de Leishmania a 3cm da dobra cubital no antebraço dos indivíduos estudados, sendo a induração mensurada após 48 horas. A leitura foi realizada pela técnica de Sokal JE e cols (1975), e o teste considerado positivo quando a induração foi maior ou igual a 5mm. Os testes foram realizados em todos os indivíduos por ocasião da inclusão no estudo (dia 0), no dia 30, e repetido no dia 90 quando permanecia negativo.

Aspectos éticos

Os pacientes que participaram do estudo foram orientados sobre todos os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa e foi obtido Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos participantes, bem como dos responsáveis dos pacientes menores de idade. O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da Resolução do Conselho Nacional de Saúde - CNS 196/96, que trata das Diretrizes e Normas de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (BRASIL, 2010).

Análise estatística

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

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

RESULTADOS

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

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

No nosso estudo foram analisadas 152 pessoas que moravam na mesma residência dos pacientes infectados e realizada a Reação de Montenegro para determinar a presença de *L. infantum* nessas pessoas, desses em 59 a reação foi positiva.

Os dados demográficos (idade e sexo) foram analisados na busca de associação com a infectividade do parasita. Não teve diferença em relação ao sexo, do total 30 pessoas são do sexo masculino. Também não foi encontrada correlação entre a proporção de indivíduos infectados (Montenegro positivo) e a idade do paciente-fonte, essa variou de 21-45 anos na maioria dos pacientes (idade mediana de 36 anos).

Na análise dos resultados respeitou-se a situação clínica do paciente-fonte. Dos 59 residentes com reação de Montenegro positiva, 18 deles conviviam com pacientes com LV sintomática e sem HIV, 17 moravam com pacientes LV assintomática e sem HIV e 21 (75,8%) conviviam com pacientes LV/HIV positivos (Tabela1).

Tabela 1: Análise bivariada pelo método de regressão logística das variáveis associadas à presença de familiar infectado pela *L. infantum* detectado pelo método Montenegro. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010.

		MONTENEGRO		Total	Razão de chances ajustada (IC 95%)	Valor p
		Nenhum familiar	Pelo menos um familiar			
HIVpositivo/ LV presente	Sim	8 (38,1%)	13 (61,9%)	21 (100%)	1,463 (0,493; 4,336)	0,493
	Não	18 (47,4%)	20 (52,6%)	38 (100%)	1	
	Total	26(44,1%)	33 (55,9%)	59 (100,0%)		
HIVnegativo/ LV sintomática	Sim	6 (33,3%)	12 (66,7%)	18 (100%)	1,905 (0,600; 6,049)	0,247
	Não	20 (48,8%)	21 (51,2%)	41 (100%)	1	
	Total	26 (44,1%)	33 (55,9%)	59 (100%)		
HIVnegativo/ LV assintomática	Sim	10 (58,8%)	7 (41,2%)	17 (100%)	0,431 (0,137; 1,359)	0,151
	Não	16 (38,1%)	26 (61,%)	42 (100%)	1	
	Total	26 (44,1%)	33 (55,9%)	59 (100%)		

IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

O modelo de regressão logística bivariado mostra que não houve associação estatística entre os grupos de exposição e a presença de coabitantes infectados. A chance de um paciente LV/HIV ter pelo menos um coabitante infectado excede 1,463 a chance de um paciente sem HIV.

Como foram observados pacientes coinfectados LV/HIV infectaram mais pessoas. Para melhor compreender essa relação foi avaliado se a carga viral (n° de vírus/mm³ sangue) e a contagem de células CD4 poderiam influenciar na transmissão.

A relação da quantidade de carga viral e o potencial de transmissão apresentou associação (p valor = 0,062). Dessa maneira uma maior quantidade de vírus no sangue dos pacientes não foi importante na transmissão da *L. infantum* (Tabela 2). Não se verificou influência na quantidade de células CD4 na transmissão da doença.

Tabela 2: Associação do valor da carga viral de pacientes com LV/HIV com a positividade da Reação de Montenegro entre os coabitantes. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010.

			MONTENEGRO		
			Nenhum familiar	Pelo menos um	Total
CARGAVIRAL	menor igual a 50*	Contagem	5	2	7
		% dentro de montenegro	62,5%	16,7%	35,0%
	maior que 50**	Contagem	3	10	13
		% dentro de montenegro	37,5%	83,3%	65,0%
Total		Contagem	8	12	20
		% dentro de montenegro	100,0%	100,0%	100,0%

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

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

A técnica quantitativa de qPCR foi realizada para verificar a quantidade de parasitas no sangue e na saliva dos pacientes. A quantidade de parasitas teve uma maior variação quando a saliva foi utilizada como amostra. Mas a quantidade de parasitas no sangue e na saliva não influenciaram na transmissão da *L. infantum*, o que pode ser observado através do coeficiente de correlação entre as variáveis, 0,164 quando o sangue foi utilizado como amostra para qPCR e 0,105 quando a saliva foi utilizada (Figura 1). Mas, através da técnica foi possível avaliar que em ambas as amostras existiam uma grande quantidade de parasitas nos pacientes e que a saliva pode ser comparada com o sangue no potencial de parasitemia.

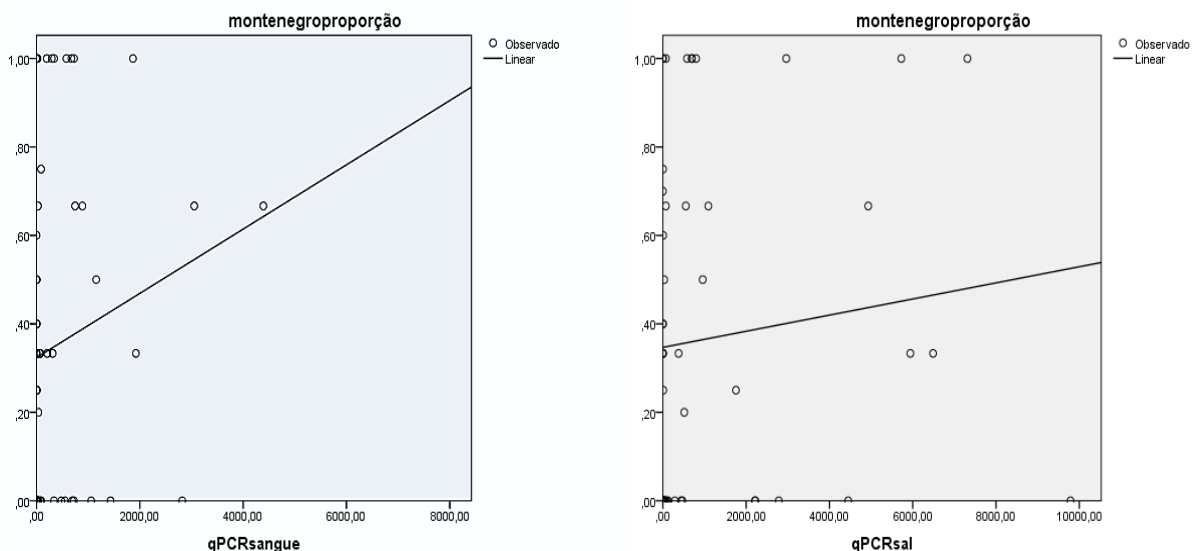


Figura 1: Representação da quantidade de parasitas por mililitro (ml) de sangue e de saliva nos pacientes-fonte associada com a proporção de pessoas positivas na reação de Montenegro. Na qPCR de saliva e de sangue foram removidos pacientes (outlier) com mais de 10000 parasitas/ml.

Não houve associação estatística entre ter pelo menos um coabitante infectado e as variáveis sexo, CD4, Carga viral, Idade, qPCRsaliva e qPCRsangue, mas houve associação estatística entre ter pelo menos um coabitante infectado e carga viral. Podemos observar que a chance de um paciente com carga viral maior que 50 cópias virais/mm³ é 0,9734 vezes maior ($1-0,0266=0,9734$) em relação aos pacientes com carga viral menor que 50 cópias virais/mm³ (Tabela 3).

Tabela 3: Regressão logística das variáveis associadas a ter pelo menos um familiar infectado detectado pelo método Montenegro. Teresina, PI, Brasil. 2008-2010.

	MONTENEGRO		Total	Razão de chances não Ajustada (IC 95%)	Valor p
	Nenhum coabitante	Pelo menos um coabitante			
Masculino	12 (46,2%)	18 (54,5%)	30 (50,8%)	1,248 (0,051; 30,769)	,892
Feminino	14 (53,8%)	15 (45,5%)	29 (49,2%)		
Total	26 (100%)	33 (100%)	59 (100%)		
CD4 ¹					
Até 150	6 (75%)	8 (61,5%)	14 (66,7%)	0,516 (0,008; 33,743)	,756
Acima de 150	2 (25%)	5 (38,5%)	7 (33,3%)		
	8 (100%)	13 (100%)	21 (100%)		
Carga Viral ²					
menor igual a 50	5 (62,5%)	2 (16,7%)	7 (35%)	0,0266 (0,001; 0,818)	,038
maior que 50	3 (37,5%)	10 (83,3%)	13 (65,0%)		
	8 (100%)	12 (100%)	20 (100%)		
Idade				1,031 (0,874; 1,217)	,715
qPCR ³ saliva				1,000 (1,000; 1,001)	,295
qPCR ³ sangue				0,999 (0,999; 1,000)	,292

1- Quantidade de células CD4/ml³ de sangue; 2- Cópias virais/mm³; 3- Reação em cadeia de polimerase quantitativa; IC 95%: intervalo de confiança de 95%;

DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) está largamente distribuída pelo mundo.^{7,8,9} No Brasil, a LV clássica acomete a pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas, cerca de 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos.¹⁰

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

O diagnóstico de LV em pacientes com HIV é difícil, uma vez que os pacientes apresentam sinais não específicos de LV e os sintomas podem ser parecidos com os de outras doenças oportunistas.¹¹ A LV em pacientes com AIDS pode representar um enigma para clínicos pouco experientes, principalmente se a AIDS é diagnosticada primeiro ou se os seus sintomas também estão presentes.

Globalmente, a maioria dos casos de leishmaniose acontecem na população HIV-negativo, onde é considerada principalmente uma doença da infância, no entanto, a associação de infecção por *Leishmania* e HIV resultou numa alteração significativa na idade da população em risco, levando a um maior número de casos em pessoas com idade entre 31-50 anos atualmente^{12,13}, os pacientes estudados tinha a maioria idade entre 21-45 anos.

Não foi pesquisado a presença de HIV nos coabitantes que foram contaminados pela *Leishmania*, mas sabe-se que infecção pelo HIV pode aumentar o risco de desenvolvimento LV em 10-100 vezes em áreas endêmicas. É possível que o parasita na forma amastigota possa induzir a replicação de vírus HIV- 1 em macrófagos e facilitar a interação com célula hospedeira.¹⁴

No início do ano de 1930, investigações sobre a LV, afirmavam que a *L. donovani* tinha sido encontrada nos fluidos corporais de pacientes com calazar, por exemplo, na urina, fezes, sêmen e secreção nasal e mucosa orofaríngea. Baseado nestes estudos, o potencial de diagnóstico de secreções nasais, swabs da mucosa orofaríngea foi verificado.¹⁶

Ao contrário de *L. donovani*, que é antroponótica, a *L. infantum* é antroponótica e é transmitida para o homem através da picada de um flebótomo contaminado a partir de um reservatório animal, principalmente cães, mas existe a possibilidade de que os portadores humanos saudáveis são reservatórios em potencial.¹⁷ Com esse pensamento, que nosso estudo pesquisou a

possibilidade dos líquidos corporais humanos serem fontes de infecção entre homens, principalmente a saliva, pela facilidade de contato e troca desse fluido entre as pessoas, principalmente as que vivem em uma relação de convivência mais íntima.

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

Não foi encontrada associação significativa entre a quantidade *Leishmania* na saliva e no sangue com a positividade da reação de Montenegro. No entanto, a saliva parece desempenhar um importante papel na proteção de um indivíduo da infecção por HIV. A saliva de pessoas não infectadas pelo HIV contém inibidores endógenos não imunes de HIV, tais como mucinas, defensinas, trombospondin, e várias proteínas salivares, em especial, inibidor secretório de peptidases de leucócitos.¹⁸ Há também evidências de que a hipotonia da saliva exerça um efeito inibidor significativo sobre a replicação do vírus HIV¹⁹ e como a *Leishmania* e o vírus possuem mecanismos sinérgicos na infecção do homem, essas evidências na saliva também dificultariam a contaminação pelo parasita.

Existem suspeitas da transmissão da *L. Infantum* entre cães, sem a participação do *Lutzomia longipalpis*. No final do verão de 1999, cães de caça em um clube Foxhunting, em New York começaram a mostrar sinais e sintomas de Leishmaniose, mas naquele tempo, a leishmaniose autóctone não tinha sido relatada em cães, outros animais ou seres humanos em Nova York, o que levantou a suspeita da transmissão de cão para cão.²⁰

CONCLUSÕES

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

Os resultados não conseguiram mostrar uma correlação significativa da transmissão do parasita com sua presença na saliva, bem como não demonstrou a real importância da influência do HIV nessa dinâmica, talvez pelo reduzido número de indivíduos pesquisados. Mas a pesquisa foi importante na tentativa de entendimento de novas possibilidades de transmissão da *Leishmania* e

sua relação com o HIV. Sendo assim, pesquisas futuras devem ser desenvolvidas para uma maior explicação do assunto.

Outra potencial limitação desse estudo são as múltiplas variáveis envolvidas na qualidade da saliva coletada, como estado nutricional do paciente, alimentação, uso de medicamentos, idade, estresse, hidratação, dentre outros. Fato que deve ser levado em consideração em estudos futuros na busca de uma padronização dessa coleta.

REFERÊNCIAS

1. Desjeux P, Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-18.
2. Roselino AM, Chociay MF, Costa R, Machado A, Figueiredo J. L. (L.) chagasi in aids and visceral leishmaniasis (kala-azar) co-infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2008; 50:251-54.
3. Magill A. J. Epidemiology of the leishmaniasis. In: Brabin L. *dermatologic Clinics* 1995; 13(3):505-23.
4. Nathalie B, Lachaud L et al. Long-Term Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Patients With AIDS Relapse Risk Factors, Value of Polymerase Chain Reaction, and Potential Impact on Secondary Prophylaxis. *Immune Defic Syndr* 2008; 48(1).
5. Chequer P, et al. AIDS research in Brazil. *AIDS* 2005; 19(4):51-53.
6. Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilis* 1926; 13:184-87.
7. Arora S. K. et al. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Tr. Roy. Soc. Of Trop. Med. and Hyg* 2008; 102: 41-45.
8. Leifso K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2007; 152:35-46.
9. Salotra P. et al. Parasite detection in patients with post Kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular immunological methods. *J Clin Pathol* 2003; 56:840-43.
10. Gontijo C, Melo M. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7 (3):338-49.
11. Lachaud, L. et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 236-40.
12. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-18.
13. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 2006; 123:357-88.
14. Wolday, D., H. Akuffo, G. Fessahaye, A. Valantine, and S. Britton. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intra- cellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scand. J. Infect. Dis.* 1998; 30:29–34.
15. Fichoux Y, Jean-Franc, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France . *J. of Clinical Microbiol* 1999; 37.

16. Mebrahtu Y. et al. *Leishmania donovani* parasites in the nasa secretions, tonsillo-pharyngeal mucosa, and urine centrifugates of visceral leishmaniasis patients in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:530.
17. Herwalt BL. Leishmaniasis. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's principles of internal medicine* 2006; 17th ed. New York: McGraw-Hill; 1095–107.
18. Campo J, Perea MA, del Romero J, Cano J, Hernando V, Bascones A. Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. *Oral Dis.* 2006;12:219–28.
19. Stahl-Hennig C, Steinman RM, Tenner-Racz K, Pope M, Stolte N, Mätz-Rensing K, et al. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science.* 1999;285:1261–5.
20. Zandra D, Francis J, et al. Canine Visceral Leishmaniasis, 2000–2003