

RESUMO

Introdução: O HIV é um vírus de infecção de progressão lenta capaz de desencadear infecção latente que a longo prazo suprime a resposta imune do hospedeiro. A leishmaniose visceral é considerada um fator de risco aumentado de morbimortalidade em indivíduos infectados por HIV-1, porém, não é reconhecida como critério para AIDS. A sobreposição geográfica das infecções por HIV-1 e *Leishmania spp.* apresentada nos últimos anos é identificada como um desafio emergente para o combate da pandemia em países endêmicos para leishmaniose.

Objetivo: Avaliar os fatores epidemiológicos, virológicos e imunológicos envolvidos em indivíduos soropositivos para HIV-1 e *Leishmania infantum* atendidos no Centro Estadual Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa, Salvador, Bahia. **Material e Métodos:**

Estudo de corte transversal, que incluiu amostras de 5.912 indivíduos com diagnóstico positivo para HIV-1 realizado entre os anos 1998 e 2015. Dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos através da revisão de prontuários e as amostras coletadas no momento do diagnóstico para HIV-1 foram utilizadas para *screening* sorológico para leishmaniose através de ELISA *in house* com antígeno SLA e proteína recombinante HSP70 de *L. infantum*. O grupo de indivíduos infectados por HIV-1 com sorologia positiva para anti-SLA e anti-HSP70 de *L. infantum* foram avaliados quanto a característica virológicas do HIV-1 (carga viral, subtipagem e resistência a antirretrovirais) e ativação imune (quantificação de células CD4⁺, CD8⁺ e CD45⁺ e quantificação de citocinas e quimiocinas inflamatórias). **Resultados:** O nosso estudo identificou um intervalo de prevalência de indivíduos HIV-1 com sorologia para *L. infantum* de 3,57% (duplo-positivo para SLA e HSP70) até 20,1% (positivo para SLA). Encontramos uma distribuição dos subtipos de HIV-1 com prevalência de subtipo B (68,0%), seguido de C (13,6%), F1 (6,8%), unidades recombinantes de BF (6,8%) e D (3,4%). Destaca-se que 31% apresentaram resistência para pelo menos um medicamento antirretroviral. Encontramos na avaliação de marcadores de imunoativação um aumento significativo das quimiocinas CXCL9/MIG ($p=0,0080$) e CXCL10/IP-10 ($p=0,0006$) e uma tendência de aumento de CCL2/MCP-1 ($p=0,0588$) nos indivíduos com sorologia duplo-positiva para *L. infantum*.

Conclusões: Este trabalho demonstrou uma alta prevalência de indivíduos infectadas com HIV-1 que apresentam sorologia positiva para *L. infantum*, o que pode indicar um número significativo de casos de coinfectados no estado da Bahia. Não houve diferença na distribuição viral e na presença de resistência à antirretrovirais em relação aos indivíduos com sorologia positiva para *L. infantum* em comparação com os mono infectados por HIV-1. No entanto, os indivíduos com sorologia positiva para *L. infantum* são mais velhos, apresentaram níveis significativamente mais baixos de células T CD4⁺, e uma tendência de maior nível de carga viral do HIV-1. Ademais, apresentaram concentrações mais altas das quimiocinas inflamatórias CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10, sugerindo uma maior imunoativação deste grupo quando comparado aos indivíduos mono infectados por HIV-1.

Palavras-chave: 1. HIV-1; 2. *Leishmania infantum*; 3. Leishmaniose visceral; 4. Coinfecção; 5. Imunoativação.

SUMMARY

Background: HIV is a slowly progressing infection virus capable of triggering latent infection that in the long run suppresses the immune response of the host. Visceral leishmaniasis is considered an increased risk factor for morbidity and mortality in HIV-1 infected individuals, however, it is not recognized as a criterion for AIDS. A geographical overlap of HIV-1 and *Leishmania* spp. infections presented in last years is identified as an emerging challenge to the pandemic fight in endemic countries for leishmaniasis. **Objective:** To evaluate the epidemiological, virological and immunological factors involved in seropositive individuals for HIV-1 and *Leishmania infantum* attended at the Centro Estadual Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa (CEDAP), Salvador, Bahia. **Methods:** A cross-sectional study, which included samples from 5,912 individuals with a positive HIV-1 diagnosis performed between 1998 and 2015. Clinical and epidemiological data were obtained by reviewing medical records and samples collected at the time of diagnosis for HIV-1 were used for serological screening for leishmaniasis through an in-house immunoenzymatic assay (ELISA) with SLA antigen and recombinant HSP70 protein from *L. infantum*. The group of HIV-1 infected individuals defined as double-positive from the anti-SLA and anti-HSP70 serology of *L. infantum* were evaluated for the genetic distribution of HIV-1 and existence of antiretroviral resistance mutations associated with activation through the quantification of plasma levels of IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF, CCL2/MPC-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10. **Results:** Our study identified a prevalence range of HIV-1 individuals with serology for *L. infantum* of 3.57% (double-positive for SLA and HSP70) up to 20.1% (positive for SLA). We found a distribution of HIV-1 subtypes with subtype B prevalence (68.0%), followed by C (13.6%), F1 (6.8%), recombinant BF (6.8%) and D (3.4%). It is noteworthy that 31% had resistance to at least one antiretroviral drug. We found in the evaluation of immunoactivation markers a significant increase of chemokines as CXCL9/MIG ($p = 0.0080$) and CXCL10/IP-10 ($p = 0.0006$) and a tendency to increase CCL2/MCP-1 ($p = 0.0588$) in subjects with double-positive *L. infantum* serology. **Conclusions:** This study demonstrated a high prevalence of HIV-1 infected individuals presenting positive serology for *L. infantum*, which may indicate a significant number of cases of co-infected in the state of Bahia. There was no difference in viral distribution and in the presence of antiretroviral resistance in relation to individuals with positive serology for *L. infantum* compared to HIV-1 monoinfected. However, individuals with positive serology for *L. infantum* are older, have significantly lower levels of CD4 + T cells, and tend to a higher level of HIV-1 viral load and higher concentrations of CXCL9/MIG and CXCL10/IP-10 chemokines, suggesting a greater immunoactivation of this group when compared to individuals monoinfected by HIV-1.

Key words: 1. HIV-1; 2. *Leishmania infantum*; 3. Visceral leishmaniasis; 4. Coinfection; 5. Immunoactivation

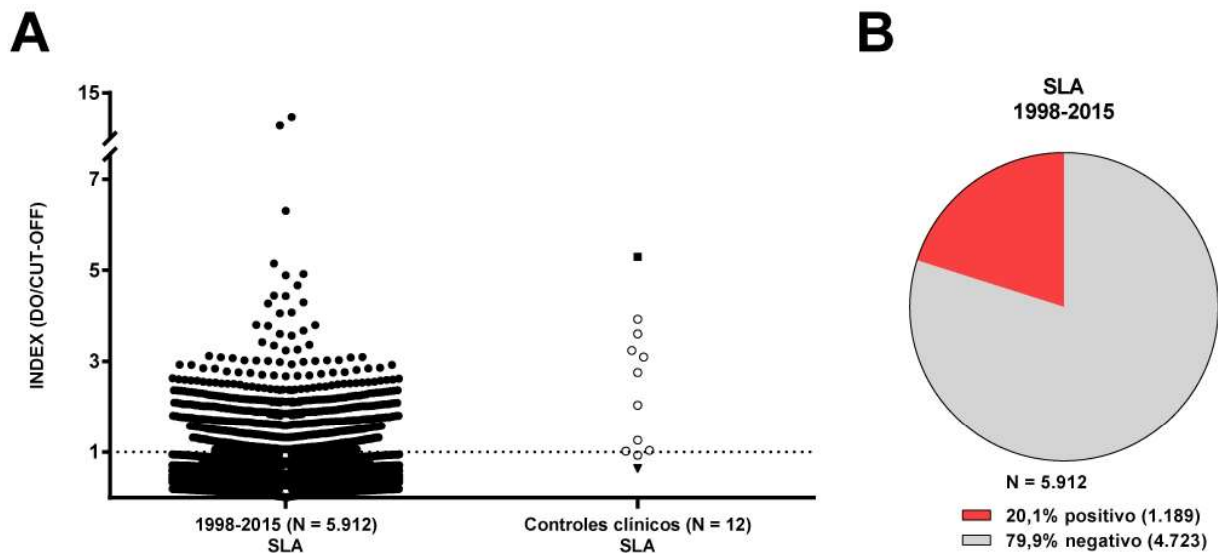


Figura 11. Sorologia IgG anti-SLA de *L. infantum* em indivíduos infectados por HIV-1 entre os anos de 1998-2015. A) Sorologia anti-SLA de *L. infantum* em gráfico de pontos (dot plot). Os valores foram plotados através de um index calculado pela divisão entre o valor da DO obtida de cada amostra pelo *cut-off* determinado de cada placa. O *cut-off* para definição das amostras positivas foi estabelecida pela média da DO dos controles negativos do experimento somado com 3 vezes o desvio-padrão. Círculo fechado (●): amostras do CEDAP; círculo aberto (○): controle clínico mono infectado com LV; quadrado fechado (■): controle clínico co infectado com HIV-1 e LV; triângulo fechado invertido (▼): controle clínico mono infectado com HIV-1. B) Gráfico de pizza para representação gráfica da porcentagem de amostras com sorologia positiva anti-SLA de *L. infantum* (vermelho) e negativa (cinza)

Tabela 4. Características epidemiológicas, virológicas e imunológicas dos indivíduos infectados por HIV-1 durante os anos de 2014 e 2015

	Total (N = 566)
Gênero (masculino)	72,1% (406/563)
Idade	32 (25–39,5) (N = 461)
¹ Carga viral	35.928 (5.335,5–138.336) (N = 389)
² Células T CD4⁺	370 (170–612,5) (N = 381)
² Células T CD8⁺	1.006 (693–1.428) (N = 381)
CD4/CD8	0,33 (0,15–0,61) (N = 381)
² Células T CD45⁺	2.126 (1.489–2.755) (N = 380)

¹cópias/mL; ²células/mm³

Os dados expressos nesta tabela representam os valores de medianas, intervalo interquartis (IIQ) e o número de indivíduos avaliados (N), ou os valores de proporção (%) com número de indivíduos avaliados entre parênteses.

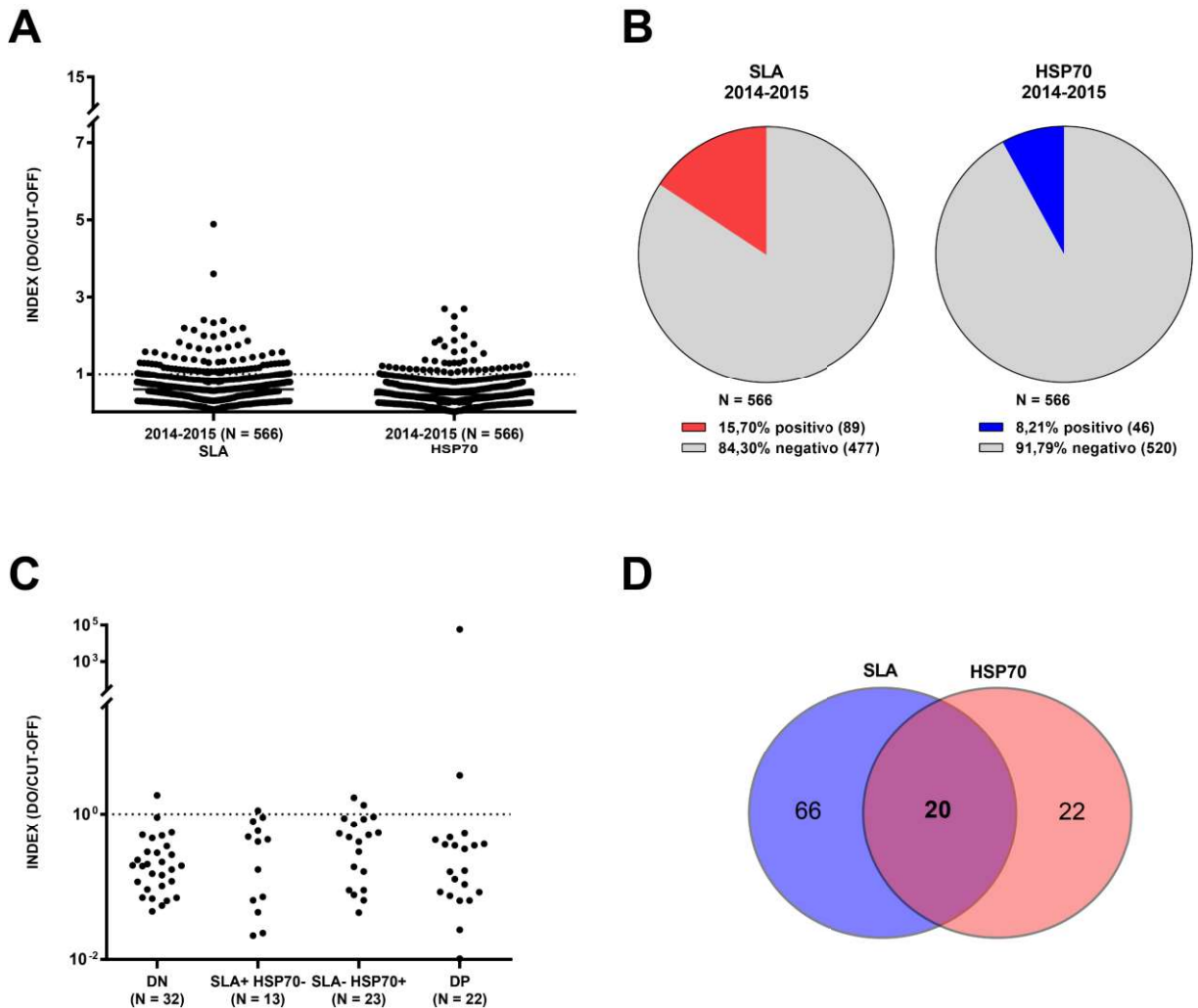


Figura 12. Sorologia anti-SLA e anti-HSP70 de *L. Infantum* em indivíduos infectados por HIV-1 durante os anos de 2014-2015. A) Sorologia anti-SLA de *L. infantum* em gráfico de pontos (dot plot). Os valores foram plotados através de um index calculado pela divisão entre o valor da DO obtida de cada amostra pelo *cut-off* determinado de cada placa. O *cut-off* para definição das amostras positivas foi estabelecida pela média DO dos controles negativos somado com 3 vezes o desvio-padrão. Círculo fechado (●): amostras do CEDAP. B) Gráfico de pizza para representação gráfica da porcentagem de amostras com sorologia positiva para anti-SLA de *L. infantum* (vermelho), anti-HSP70 de *L. infantum* (azul) e negativa (cinza). C) Sorologia anti-*T. cruzi* em gráfico de pontos (dot plot). O *cut-off* para definição das amostras positivas foi estabelecida como descrito no kit. Círculo fechado (●): amostras do CEDAP. D) Diagrama de Venn para determinar as populações DP e DN_{total} para anti-SLA e anti-HSP70 de *L. Infantum*. Em negrito, os grupos de interesse: duplo-positivo para anti-SLA e anti-HSP70 e negativo para anti-*T. cruzi* (DP, N = 20) e duplo-negativo para anti-SLA e anti-HSP70 e negativo para anti-*T. cruzi* (DN_{total}, N = 452)

Tabela 5. Características epidemiológicas, virológicas e imunológicas dos indivíduos infectados por HIV-1 durante os anos de 2014 e 2015 com sorologia duplo-positiva e duplo-negativa para anti-SLA e anti-HSP70 para *L. infantum*

	DP (N = 20)	DN_{total} (N = 452)	P
Gênero (masculino)	75,0% (15/20)	71,3 % (321/450)	
Idade	42 (30,5–52,8) (N = 20)	31 (25–39) (N = 359)	0,0014
¹Carga viral	147.580 (2.284–700.074,5) (N = 14)	30.521,5 (3.525–116.930,8) (N = 310)	0,0796
²Células T CD4⁺	166 (91–450,5) (N = 14)	406 (189–637) (N = 305)	0,0250
²Células T CD8⁺	1.008 (744–1.607) (N = 14)	1.005 (703–1.428) (N = 305)	0,7924
CD4/CD8	0,21 (0,058–0,39) (N = 14)	0,37 (0,16–0,65) (N = 305)	0,0204
²Células T CD45⁺	1.788 (1.262–3.054) (N = 14)	2.147 (1.538–2.777) (N = 304)	0,5744

¹cópias/mL; ²células/mm³; DP: duplo-positivo; DN_{total}: duplo-negativo.

Os dados expressos nesta tabela representam os valores de medianas, intervalos interquartis (IIQ) e o número de indivíduos avaliados (N), ou os valores de proporção (%) com número de indivíduos avaliados entre parênteses. O teste Mann-Whitney foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos DP e DN; os valores de *p* considerados estatisticamente significantes foram aqueles inferiores a 0,05 (em negrito).

Tabela 6. Características epidemiológicas, virológicas e imunológicas dos indivíduos infectados por HIV-1 com sorologia duplo-positiva e duplo-negativa para anti-SLA e anti-HSP70 para *L. infantum* pareados para sequenciamento das regiões PR/RT do gene *pol* do HIV-1

	DP (N = 20)	DN_{pareado} (N = 31)	P
Gênero (masculino)	75,0% (15/20)	87,1% (27/31)	
Idade	42 (30,5–52,8) (N = 20)	33 (26–43) (N = 31)	0,0796
¹Carga viral	147.580 (2.284–700.074,5) (N = 14)	99.758 (15.703–143.863,5) (N = 21)	0,5605
²Células T CD4⁺	166 (91–450,5) (N = 14)	269 (119,5–442,5) (N = 21)	0,7459
²Células T CD8⁺	1.008 (744–1.607) (N = 14)	999 (881–1.421) (N = 21)	0,7523
CD4/CD8	0,21 (0,058–0,39) (N = 14)	0,25 (0,10–0,44) (N = 21)	0,7332
²Células T CD45⁺	1.788 (1.262–3.054) (N = 14)	1.939 (1.605–2.435) (N = 21)	0,7272

¹cópias/mL; ²células/mm³; DP: duplo-positivo; DN_{pareado}: duplo-negativo pareado com o grupo DP.

Os dados expressos nesta tabela representam os valores de medianas, intervalos interquartis (IIQ) e o número de indivíduos avaliados (N), ou os valores de proporção (%) com número de indivíduos avaliados entre parênteses. O teste Mann-Whitney foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos DP e DN_{pareado}; os valores de *p* considerados estatisticamente significantes foram aqueles inferiores a 0,05 (em negrito).

Tabela 7. Subtipagem do HIV-1 dos indivíduos infectados por HIV-1 com sorologia duplo-positiva e duplo-negativa para anti-SLA e anti-HSP70 para *L. infantum*

	Total (N = 29)	DP (N = 13)	DN_{pareado} (N = 16)	P
Subtipo				0,920
B	68,0% (20)	69,3% (9)	69,3% (11)	
C	13,6% (4)	15,4% (2)	12,6% (2)	
D	3,4% (1)	-	6,3% (1)	
F1	6,8% (2)	7,7% (1)	6,3% (1)	
BF	6,8% (2)	7,7% (1)	6,3% (1)	

Os dados expressos nesta tabela representam os valores de proporção (%) com número de indivíduos avaliados entre parênteses. As diferenças na distribuição de subtipos entre os grupos DP e DN_{pareado} foi testado usando teste qui-quadrado (X^2), considerando $p < 0,05$ como significativo.

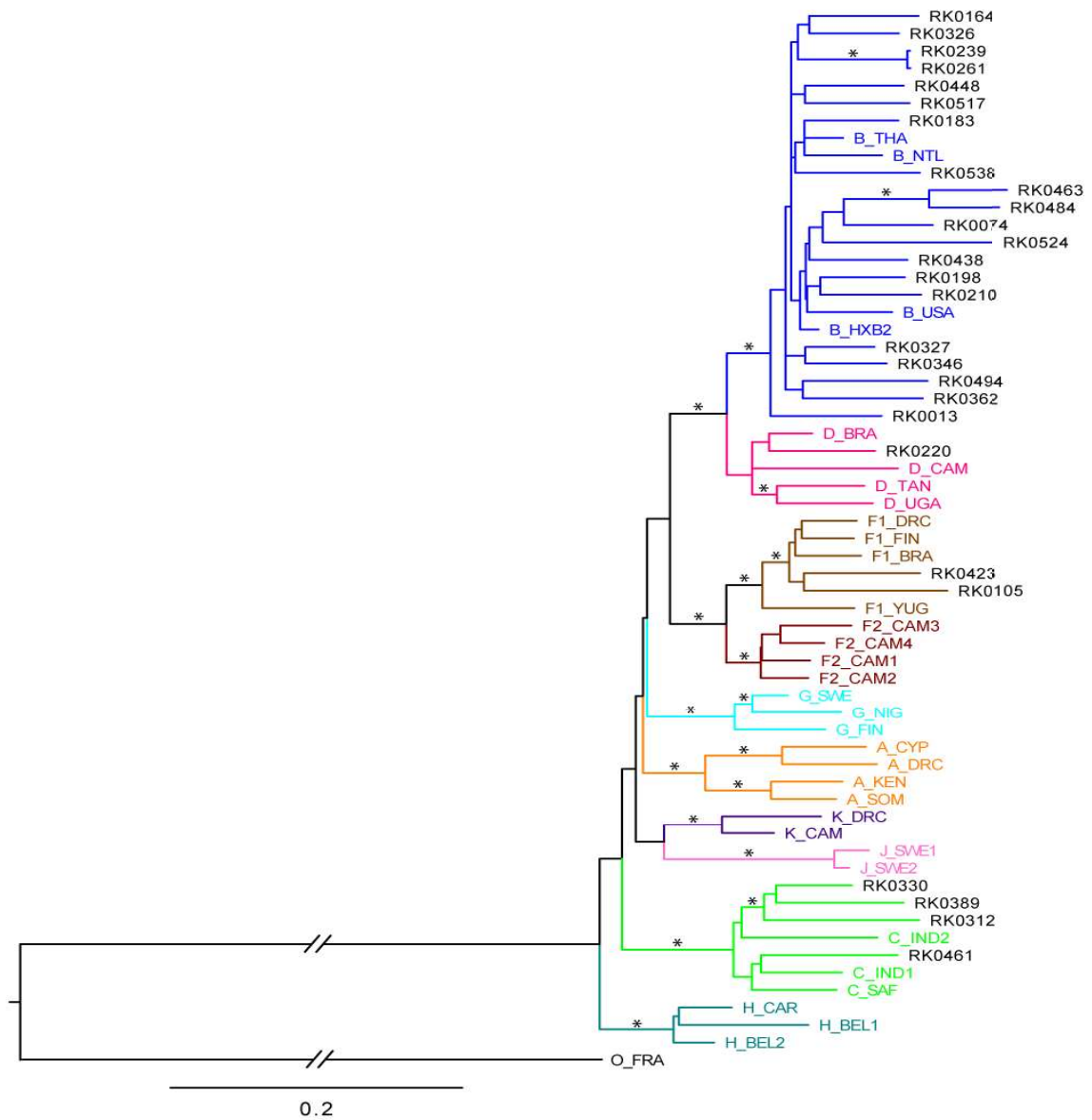


Figura 13. Árvore filogenética dos isolados dos subtipos puros. A árvore filogenética construída a partir do algoritmo Neighbor-joining e modelo de substituição de nucleotídeos GTR+I+G, mostra a relação filogenética entre as cepas do CEDAP (identificadas com prefixo RK) e as sequências referências do grupo M. Cada subtipo é identificado por uma cor. Foi utilizado como grupo externo, uma sequência pertencente ao grupo O. Os valores do bootstrap foram baseados em 1.000 reamostragens e mostram relação >70% entre os ramos, indicado por asteriscos (*)

Tabela 8. Mutações e resistência a antirretrovirais encontradas para inibidores de protease e transcriptase reversa em indivíduos infectados por HIV-1 com sorologia duplo-positiva e duplo-negativa para anti-SLA e anti-HSP70 para *L. infantum*

Isolado/Grupo	Classe antirretroviral		
	NRTI	NNRTI	PI
RK0105/DN _{pareado}	-	-	TPV/r (69Y 36I 89M)
RK0164/DP	-	NVP, EFV (K103N)	-
RK0312/DP	-	-	TPV/r (69K 36I 89M)
RK0330/DN _{pareado}	-	-	TPV/r (69K 36I 89M)
RK0389/DN _{pareado}	-	-	TPV/r (69K 36I 89I)
RK0438/DN _{pareado}	-	NVP (A98S)	-
RK0461/DP	-	-	TPV/r (69K 36I 89M)
RK0494/DP	ddI (T69N)	-	-
RK0517/DN _{pareado}	-	NVP (A98S)	-

ddI: didanosina; EFV: efavirenz; NRTI: inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeos; NNRTI: inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos/nucleotídeos; NVP: nevirapina; PI: inibidores de protease; TPV/r: tipranavir/ritonavir.

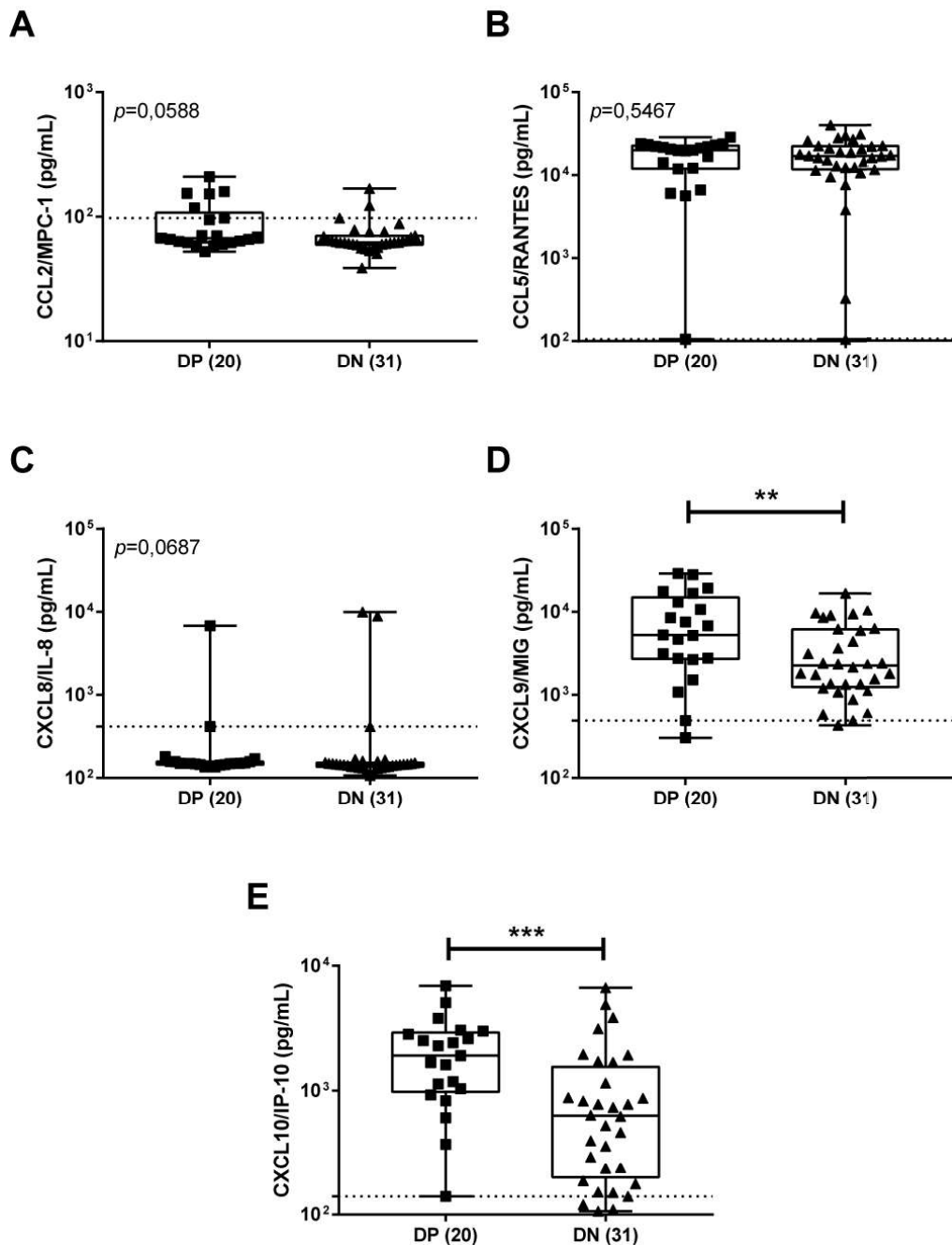


Figura 14. Perfil de quimiocinas em indivíduos infectados por HIV-1 diagnosticados durante os anos de 2014-2015 com sorologia duplo-positiva e duplo-negativa para anti-SLA e anti-HSP70 para *L. infantum*. A-E) Comparação estatística por teste de Mann-Whitney dos níveis plasmáticos (pg/mL) das quimiocinas CCL2/MPC-1 ($p = 0,0588$), CCL5/RANTES ($p = 0,5467$), CXCL8/IL-8 ($p = 0,0687$), CXCL9/MIG ($p = 0,0080$) e CXCL10/IP-10 ($p = 0,0006$). Os valores foram representados através de gráfico de box plot e dot plot. Quadrado fechado (■): grupo de indivíduos infectados por HIV-1 com sorologia duplo-positiva para anti-SLA e anti-HSP70 para *L. infantum*; triângulo fechado (▲): grupo de indivíduos infectados por HIV-1 com sorologia duplo-negativa para anti-SLA e anti-HSP70 para *L. infantum*