

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Medicina

Programa de doctorat en Medicina Interna

**Dificultades en el manejo de la
leishmaniosis visceral en pacientes
infectados por el Virus de la
Inmunodeficiencia Humana (VIH).**

Tesis presentada por

ISRAEL MOLINA ROMERO

Para optar al grado de Doctor.

Directores: **Vicenç Falcó Ferrer y Albert Pahissa Berga**

Enero de 2015

Vicenç Falcó Ferrer, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona y Médico Adjunto del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari Vall d'Hebrón

Y

Albert Pahissa Berga, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona y Exjefe de Servicio del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari Vall d'Hebrón

Certifican que la tesis titulada:

“Dificultades en el manejo de la leishmaniosis visceral en pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).”

Que presenta el licenciado **Israel Molina Romero**, ha sido realizada bajo su dirección en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari Vall d'Hebrón, la consideran finalizada y autorizan su presentación para que sea defendida ante el tribunal que corresponda.

Dr. Vicenç Falcó Ferrer

Dr. Albert Pahissa Berga

En Barcelona, 21 de enero de 2015

Agradecimientos

ABREVIATURAS

LV: leishmaniosis visceral.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran activad.

IFN- γ : Interferón gamma.

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

cell/mL: células por microlitro.

DNA: Ácido desoxi-ribonucleico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

DAT: test de aglutinación directa.

PBMC: capa de células mononucleares obtenidas de sangre periférica.

tC: ciclo umbral (del inglés threshold cycle).

LR: razones de verosimilitud (del inglés likelihood ratios)

SSU-rRNA: Subunidad pequeña del ARN (ácido ribonucleico) del ribosoma

INDICE

1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL Y CARGA DE ENFERMEDAD.	8
1.2 LEISHMANIOSIS E INFECCIÓN POR VIH.....	10
1.2.1 Interacciones entre parásito, virus y huésped.....	11
1.2.2 Paradigmas clínicos de una enfermedad oportunista.....	12
1.2.3 Tratamiento de la LV en pacientes coinfectados.....	13
1.2.4 El tratamiento de las recidivas y la necesidad de profilaxis secundaria.....	14
1.3 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS. UTILIDAD DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR.	17
2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
2.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	21
2.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	23
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	23
4 MÉTODOS.....	24
4.1 POBLACIÓN A ESTUDIO	24
4.2 DISEÑO DE LOS ESTUDIOS.....	25
4.3 PERIODO DE ESTUDIO	25
4.4 DEFINICIONES.....	25
4.4.1 Diagnóstico de episodio de leishmaniosis y su recidiva:	25
4.4.2 Clasificación de los episodios:.....	26
4.4.3 Definición de curación:.....	26
4.5 PROCEDIMIENTOS.....	27
4.5.1 Recogida de datos y seguimiento de los pacientes.....	27
4.5.2 Tratamiento y profilaxis.....	27
4.5.3 Cultivo de la capa de células mononucleares (PBMC).....	28
4.5.4 PCR.....	28
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
4.7 CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	30
5 RESULTADOS	31
5.1 TRABAJO 1:	31

5.2 TRABAJO 2:	33
6 DISCUSIÓN	47
6.1 <i>OBJETIVO 1: EVALUAR LA EFICACIA Y PERFIL DE SEGURIDAD DE AMFOTERICINA B LIPOSOMAL ADMINISTRADA DE MANERA MENSUAL COMO QUIMIOPROFILAXIS SECUNDARIA DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH.</i>	47
6.2 <i>OBJETIVO 2: DESCRIBIR LA CINÉTICA DE LEISHMANIA INFANTUM MEDIANTE LA DETECCIÓN DE SU DNA A TRAVÉS DE PCR EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH DIAGNOSTICADOS DE LEISHMANIOSIS VISCERAL.</i>	52
<i>OBJETIVO 3: EVALUAR LA UTILIDAD DE INCORPORAR LA REALIZACIÓN DE UNA PCR A TIEMPO REAL DE LEISHMANIA INFANTUM EN SANGRE PERIFÉRICA DURANTE EL SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH DIAGNOSTICADOS DE LEISHMANIOSIS VISCERAL.</i>	52
7 LIMITACIONES	57
8 CONCLUSIONES	59
9 BIBLIOGRAFIA	60
10 ANEXO	69

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la leishmaniosis visceral y carga de enfermedad.

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria producida por el protozoo intracelular *Leishmania* spp. El espectro clínico de esta enfermedad es variado contemplando desde formas subclínicas, formas localizadas (leishmaniosis cutánea) a formas diseminadas (algunas formas cutáneas, mucocutáneas y viscerales). Su expresividad clínica viene condicionada tanto por características inherentes al parásito como a la respuesta inmune presentada por el huésped (1).

Durante los últimos 10 años, las regiones endémicas se han extendido y se ha producido un fuerte incremento en el número de casos registrados de la enfermedad. A pesar del elevado grado de infranotificación de esta enfermedad, se estima que 2 millones de nuevos casos se producen anualmente (1,5 millones de casos de leishmaniosis cutánea y 500 000 de la leishmaniosis visceral), con cerca de 12 millones de personas infectadas en la actualidad, 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y unas 59 000 muertes anuales causadas por la leishmaniosis.

En la actualidad, la leishmaniosis se localiza en cuatro continentes y se considera que es endémica en 88 países, 72 de los cuales son países considerados en vías de desarrollo (2). (fig.1)

La leishmaniosis visceral (LV) está causada por los parásitos del complejo *L. donovani-infantum*. La mayoría de las infecciones producidas por estos parásitos son asintomáticas, considerándose un estado de portador asintomático. Serán estados de inmunodepresión (farmacológica, enfermedades, malnutrición...) los que favorecerán el desarrollo de la enfermedad clínica. Los niños han sido el grupo considerado clásicamente como de mayor riesgo para desarrollar esta forma clínica sin tener que asociarse a ninguna otra comorbilidad. Desde la aparición de la pandemia del VIH, más de la mitad de los casos son adultos.

En la cuenca del Mediterráneo, la LV se considera hipoendémica. La transmisión es zoonótica teniendo el perro como principal reservorio y se concentra en zonas rurales o periurbanas. Los casos registrados en esta región representan de un 5% a un 6% de

los casos totales de LV a nivel mundial con una incidencia de 1200 a 2000 casos anuales (3)

La forma clásica de LV en pacientes inmunocompetentes en esta región se encontraba en edad pediátrica. No fue hasta finales de la década de los 80 y de los 90 que la rápida diseminación de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) hizo cambiar el panorama epidemiológico de esta enfermedad, no sólo en esta zona, sino en todo el mundo.

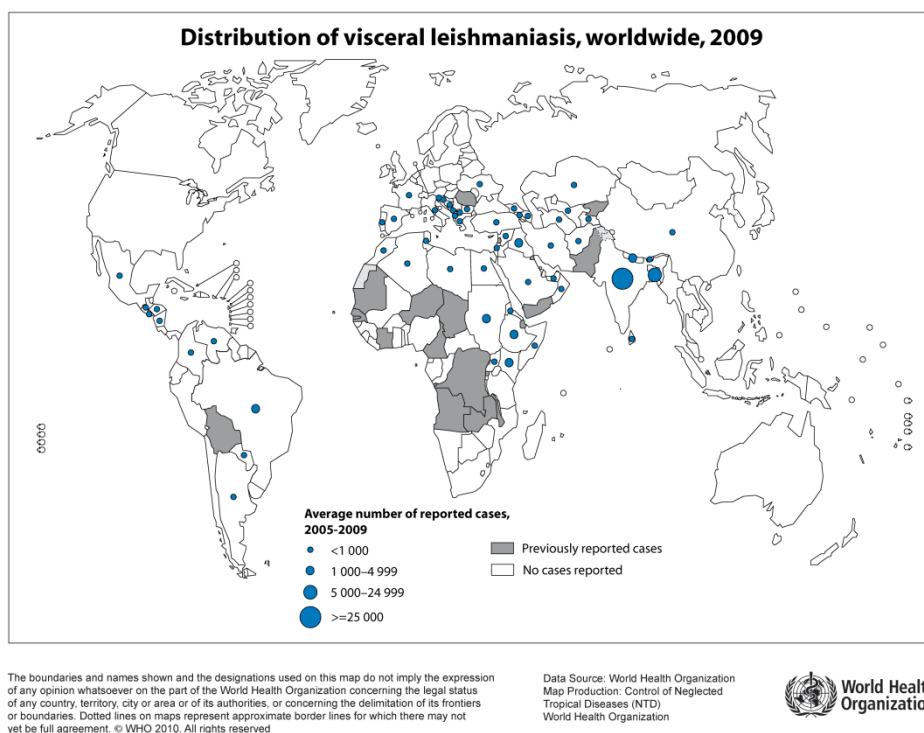


Figura 1 Distribución mundial de la leishmaniosis visceral

1.2 Leishmaniosis e infección por VIH.

A mediados de la década de los 90, aproximadamente un 50% de los casos de LV en la cuenca del mediterráneo eran pacientes con infección por VIH y en ese mismo periodo de tiempo de un 2% a un 9% de los pacientes con VIH padecerían una LV (4). Países como España, Francia, Italia y Portugal concentraban y lo siguen haciendo hasta la fecha, la mayoría de casos de esta región.

Un claro descenso en la incidencia de los casos coinfectados se observó a finales de los 90 con la introducción en los esquemas terapéuticos de estos pacientes los tratamientos antirretrovirales de gran actividad (TARGA)(5).

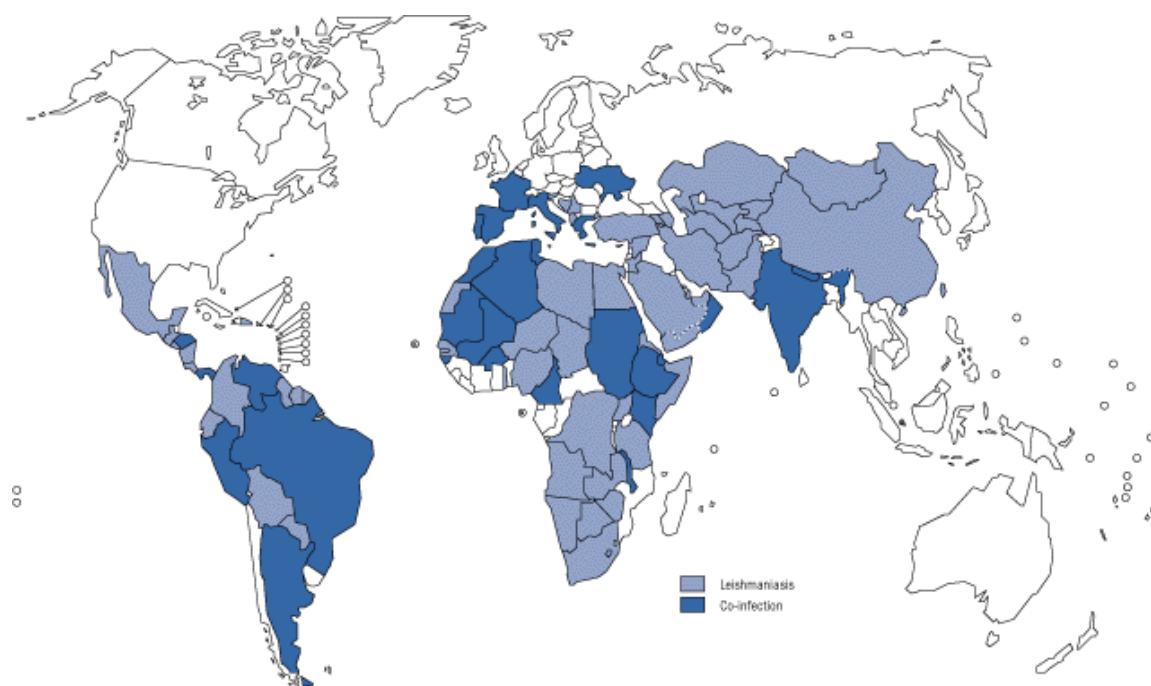


Figura 2. Mapa de distribución de los países que han reportado casos de coinfección VIH-Leishmaniosis. Fuente: OMS

1.2.1 Interacciones entre parásito, virus y huésped.

Dado que ambos patógenos son obligatoriamente intracelulares y tienen al macrófago como célula huésped en común, será fácil entender que existe una intensa y estrecha relación entre ellos.

Desde el punto de vista del huésped, en este caso el ser humano, la reacción inmunológica que va a presentar frente a leishmania va a modular su expresividad clínica y al mismo tiempo, el VIH representa una causa de inmunosupresión. Por tanto teniendo en cuenta este tipo de inter-relaciones será fácil entender el estrecho e intenso vínculo que existe entre VIH y Leishmania.

Uno de los principales problemas de la coinfección es que el parásito puede inducir una reactivación del virus en su forma latente y por tanto suponer un incremento en la carga viral y por tanto una más rápida progresión hacia SIDA(6). Numerosos estudios han demostrado la activación de la replicación del VIH inducida por la secreción de citoquinas promovidas por leishmania tanto a nivel del macrófago como de los propios linfocitos CD4 (7–10). Otro dato interesante sería la observación de que los pacientes coinfectados tienen una mayor expresión del co-receptor CCR5, receptor que es indispensable para la internalización del virus dentro de la célula. Este hecho además de relacionarse con un aumento de la replicación del virus y una aceleración de la progresión de la enfermedad, supondría una interesante diana terapéutica en pacientes coinfectados (11).

La interacción no es únicamente en este sentido, podríamos considerarla bidireccional. Los pacientes coinfectados tienen una mayor proporción de leishmaniosis diseminada y una mayor carga parasitaria debido a un mayor capacidad de replicación (12,13). Nuevamente la presencia del VIH podría por un lado dañar los mecanismos naturales de control del sistema linfomonocitarias (fagocitosis, lisis intracelular, quimiotaxis y producción de citoquinas) y por otro inducir la producción citoquinas que de manera indirecta podrían favorecer la multiplicación del protozoo a nivel intracelular (IFN- γ , prostaglandina E₂, TGF- β 1) (14–16).

Por tanto parece evidente que la interacción entre virus, parásito y huésped existe, y va a condicionar varios aspectos como la expresividad clínica, la respuesta terapéutica tanto de los antirretrovirales como de los antiparasitarios, el diagnóstico de ambas enfermedades y finalmente el pronóstico de los pacientes.

1.2.2 Paradigmas clínicos de una enfermedad oportunista.

El espectro clínico de esta enfermedad no difiere mucho entre los pacientes con y sin infección por VIH. Si bien la triada clásica de fiebre, pancitopenia y visceromegalia se encuentra en más del 75% de los casos, el grado de inmunosupresión puede modular su expresividad clínica, como sería la detección del parásito en localizaciones atípicas (intestino, cavidad oral, piel o incluso pulmón). La leishmaniosis cutánea post Kala Azar se da con más frecuencia en pacientes inmunosuprimidos que mejoran su condición inmunológica (17)

La mayoría de casos de LV en pacientes con el VIH aparecen en estados avanzados de la enfermedad. Entre un 80% y un 100% de los casos, la cifra de linfocitos CD4 al momento del diagnóstico está por debajo 200 cell/mL y de manera general un 50% aproximadamente de los pacientes tienen criterios definitorios de SIDA antes o durante el episodio de LV (18).

Un aspecto que viene claramente condicionado por la infección por VIH es el curso clínico de la LV, su pronóstico y las tasas de curación. La coinfección VIH-VL se caracteriza por la aparición de frecuentes recidivas (19–23). Respecto al tratamiento, los pacientes tienen mayor riesgo de sufrir efectos secundarios y tienen una menor tasa de curación (12,24).

Ha sido ampliamente demostrado que un buen estado inmunitario es el factor más importante para reducir la tasa de recidivas de LV en los pacientes con infección por VIH. Un 60% de los pacientes con coinfección VIH-VL, una vez tratado el primer episodio, en un 60% de los casos va a presentar una recidiva antes de los 6 meses y con un 90% de probabilidad en un plazo de 12 meses (5). Pero, a pesar de la disponibilidad de TARGA, la frecuencia de las recidivas en estos pacientes todavía sigue

siendo un motivo de preocupación a los clínicos. Actualmente, los pacientes que presentan recidivas y están recibiendo TARGA presentan un buen control virológico con cargas virales indetectables en un 80% de los casos (20). Aunque el papel del tratamiento antirretroviral no es del todo determinante para evitar la aparición de nuevos episodios de leishmaniosis, lo que sí parece, es que los pacientes tratados aumentan el intervalo entre recidivas, disminuyendo así el número total de las mismas (5,20,25,26). Por tanto, además del tratamiento antirretroviral, sería necesario tener un buen nivel de linfocitos CD4, que algunos expertos apuntan a 200 linfocitos CD4/mL mantenida por un mínimo de 6 meses, para poder garantizar una buena evolución clínica libre de recidivas (27–29).

A pesar de que claramente la prevalencia y la tasa de incidencia de la enfermedad han sido claramente modificadas con la pandemia del VIH y que precisamente el estado inmunitario del paciente es clave para el control de esta infección protozoaria, no se considera como enfermedad declaratoria de SIDA.

1.2.3 Tratamiento de la LV en pacientes coinfectados

El manejo terapéutico de la leishmaniosis visceral en pacientes coinfectados continúa siendo un reto para los clínicos. Como ya se ha mencionado previamente, los pacientes coinfectados tienen mayor riesgo de sufrir efectos secundarios y menores tasas de curación (12,24). No existe un consenso sobre el tratamiento de elección debido a la escasez de ensayos clínicos. Los dos compuestos que se disputarían el rango de tratamiento de elección son la anfotericina y las sales de antimonio.

Los únicos ensayos clínicos realizados con anfotericina en el área del Mediterráneo, son ya antiguos y utilizaban Anfotericina deoxicolato o Anfotericina complejo lipídico; formas actualmente en desuso y desbancadas por la Anfotericina B liposomal, con un perfil de seguridad mucho mejor. Las tasas de respuesta terapéutica inicial estaban en torno a un 40 % con unas elevadísimas tasas de recidiva cerca del 90% (30,31).

La experiencia terapéutica con sales de antimonio es muy parecida tanto en la respuesta terapéutica inicial como en tasa de recidiva, pero con un elevado índice de

efectos secundarios que obligaron a suspender de manera definitiva el tratamiento en cerca del 60% de los casos (31). Por tanto y pesar de la escasa evidencia científica, los pocos pacientes incluidos en los ensayos clínicos así como la antigüedad de los ensayos clínicos, tanto la OMS como las guías internacionales recomiendan el uso de la Amfotericina B liposomal como tratamiento de elección de la LV en pacientes coinfectados. Las experiencias con otros medicamentos como la miltefosina, paramomicina o pentamidina son todavía más escasas (32,33).

Ante este escenario terapéutico algunos expertos recomiendan el tratamiento con terapia combinada con la intención de aumentar su eficacia, pero la escasez de evidencia científica es aún más marcada. Únicamente algunos casos aislados y experiencias puntuales han sido publicados (18). En el momento actual existe un ensayo clínico promovido por la Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi) donde se está evaluando la combinación de Amfotericina B liposomal junto con Miltefosina en pacientes coinfectados de Etiopía.

1.2.4 El tratamiento de las recaídas y la necesidad de profilaxis secundaria.

Otro desafío terapéutico en el seguimiento, aparece al hacer frente a las numerosas recaídas clínicas que sufren estos pacientes. Puesto que el TARGA por sí sólo no parece ser una estrategia eficaz para la prevención de nuevos episodios, posiblemente sea la reposición de un buen estado inmunológico lo que suponga una verdadera garantía para evitarlos (5,20,27,34). Por tanto parecería razonable que, hasta que no se adquiriera ese nivel mínimo sería necesaria la instauración de una quimioprofilaxis secundaria (19–21,27).

¿Qué se considera por tanto esa situación ideal que una vez alcanzada garantizaría una buena evolución clínica?

Es conocido que por lo general las recaídas de LV ocurren sobretodo en pacientes con mala respuesta al tratamiento antirretroviral y que no presentan una mejoría de las cifras de CD4 observándose una asociación entre el incremento de las cifras de CD4 y la reducción de nuevos episodios de LV (19,27,34,35).

Establecer una cifra de corte de CD4 que permita predecir este buen control inmunológico no es fácil. Una cifra de linfocitos CD4 < 100 cell/mL reduce claramente el riesgo de recidivas y en nuestro entorno es bastante improbable encontrar nuevos episodios con cifras superiores a 200 CD4/mL (36). Otro factor que se ha querido tener en cuenta ha sido la buena respuesta virológica como marcador subrogado de un buen estado inmunitario. Aunque existen algunos datos contradictorios, los datos publicados relacionan una carga viral indetectable como un factor de protección contra nuevos episodios y de manera paralela, los pacientes que presentan una recidiva tienen cargas virales más elevadas que aquellos que no tienen nuevos episodios (19,37).

Teniendo todo esto en cuenta, podría plantearse una condición clínica que permita a los pacientes que están en esquema de profilaxis secundaria, poder suspenderla una vez superado ese umbral. Si era difícil poder establecer una condición ideal sobre la base de un buen nivel de protección, más complicado es establecer esta nueva condición por la escasez de estudios. Nuevamente los estudios llevados a cabo en España han sugerido un umbral comprendido entre 200 y 350 linfocitos CD4/mL como condición para plantearse la retirada de la quimioprofilaxis secundaria (27). La variabilidad en las cifras de CD4 en otras series, las diferencias observadas en otras regiones del mundo y los pocos pacientes analizados, arrojan un grado de incertidumbre tal que impide llegar a un consenso sobre esta situación.

Dejando de un lado todo este nivel de duda razonable relacionado con los ideales sobre la retirada de la quimioprofilaxis secundarias y de los requerimientos mínimos que permitan asegurar una evolución clínica libre de recidivas, pretendemos centrarnos sobre la quimioprofilaxis en sí misma.

De lo que sí existe suficiente evidencia, es sobre el hecho de instaurar una estrategia de quimioprofilaxis secundaria. La gran mayoría de estudios sobre profilaxis secundarias han sido llevados a cabo en el área del mediterráneo, presumiendo por tanto que el patógeno causante es *Leishmania infantum*. Estudios realizados por grupos españoles demostraron que hacer profilaxis es mejor que no hacerla, ya que disminuía el riesgo de recidiva, que podía llegar hasta el 90% de los casos en los

pacientes que no recibían profilaxis comparado con los que sí lo hacían a un año de seguimiento (21,38).

Numerosos medicamentos se han evaluado como profilaxis secundaria, pero una vez más, la falta de estudios aleatorizados y el bajo número de pacientes incluidos limita el nivel de recomendación para su uso generalizado (38–44,44–57). (tabla 1).

Es precisamente esta falta de datos acerca de la elección el mejor medicamento para ser utilizado como tratamiento preventivo, lo que motivó el diseño y la posterior ejecución del primer trabajo.

	Autor	Año	Esquema terapéutico	Resultado	Tiempo hasta recidiva
Allopurinol con "azoles"	Raffi et al.	1995	Allopurinol 25mg/kg/d + itraconazole 400mg/d	1 R / 1	7 meses
	Ribera et al.	1996	Allopurinol 300mg/8h	4E/9	15 meses de seguimiento
	Torrus et al.	1996	Allopurinol 300mg/d + fluconazol 200mg/d	2E/3	9 y 11 meses
	Derouin et al.	1998	Allopurinol 300mg/d	3E/3	9 meses
	Anganaro et al.	1998	Itraconazole 600mg/d	1E/5	41 meses
Pentamidina	Hamour et al.	1997	4 mg/kg/15d	1E/1	6 meses
	Pérez-Molina et al.	1996	4 mg/kg/15d vs 4 mg/kg/mes	3E/3 1R/3	7 semanas (8 meses de seguimiento)
	Patel et al.	2009	4 mg/kg/15d vs 4 mg/kg/3 sem	4E/4	seguimiento de 4 meses a 5 años
Antimoniales	Ribera et al.	1996	850 mg/mes	14E/17	8, 15 y 22 meses
Amfotericina complejo lipídico	López – Vélez et al.	2004	3mg/kg/21d	4R/8	12 meses
Amfotericina B Liposomal	Lazanas et al.	1993	1 mg/kg/15 d	1s/2, 1†	16 meses
	Mc Bride et al.	1994	200mg/m	1R/1	6 meses ²⁶
	Borrelli et al.	2000	2mg/kg/21d	1S/1	26 meses
	Mastroianni et al.	2000	3mg/kg/m	2S/2	10 y 22 meses
Miltefosine	Marques et al.	2008	50 mg 3 veces a semana	5E/5	12 a 24 m

E: Éxito de la profilaxis. R: Recidiva. †: Fallecido

Resultados están expresados como el número de éxitos o de recidivas en relación al número de pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 1. Regímenes terapéuticos utilizados como quimioprofilaxis secundaria en pacientes con coinfección VIH-LV.

1.3 Técnicas diagnósticas. Utilidad de la biología molecular.

Las técnicas directas que permiten visualizar el parásito se consideran las técnicas de elección para el diagnóstico de la leishmaniosis en cualquiera de sus formas (58).

Estas técnicas permiten demostrar la presencia del protozoo directamente sobre el tejido o mediante su cultivo. Una de las limitaciones que presentan estas técnicas sería las grandes variabilidades de sensibilidad y especificidad en función de la técnica escogida, el tejido examinado, las comorbilidades del paciente y las especies del parásito. Desde un 50 a 60% de sensibilidad en punciones con aguja fina de adenopatías, 50 a 70% en aspirados de médula ósea, del 77 al 91% en las biopsias hepáticas hasta la punción esplénica que sería la técnica con unas cifras de sensibilidad cercanas al 100% (59–61). Además de esas limitaciones técnicas, uno de las principales desventajas para los pacientes sería la necesidad de realizar técnicas y procedimientos invasivos, que además de ser dolorosos o molestos, en algunas ocasiones no están exentos de complicaciones graves (hemorragia hepática o rotura esplénica).

Las técnicas serológicas pueden ser realmente útiles en muchas ocasiones. El problema radica que en pacientes coinfectados con VIH, las técnicas serológicas tienen una cifras de sensibilidad muy bajas (<60%) y por tanto no útiles para el diagnóstico de estos pacientes (17,62).

Otras técnicas que se basan en la detección de antígeno de Leishmania han sido utilizadas para este propósito. Posiblemente la detección del antígeno rk39 es el que más ampliamente ha sido evaluado. La mayoría datos proviene de África del Este y subcontinente Indio. La mayor limitación de este test es la variabilidad de su sensibilidad en función de la prevalencia de la enfermedad en la zona geográfica donde se utiliza (sensibilidad en África del Este del 83% comparada con un 97% en India) (63). La detección de antígenos en orina mediante una aglutinación en látex (KAtex[®]) no ha acabado de ser del todo concluyente. Los datos preliminares de este test tan optimistas, no han podido ser corroborados en series mayores de pacientes, por lo que su uso no está generalizado (64–66).

Estrategias que han combinado el uso de diferentes técnicas como es el caso del test de aglutinación directa (DAT) y el test inmunocromatográfico rK-39 han demostrado ser útiles en pacientes coinfectados en Etiopía (67). Hasta la fecha, esta estrategia no ha sido evaluada en nuestra área.

Durante los últimos años técnicas diagnósticas de biología molecular como las basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han ido posicionando dentro de las opciones diagnósticas y actualmente son ampliamente utilizadas en el diagnóstico de la leishmaniosis en general y del LV en particular hasta el punto que algunos autores recomiendan incorporarla en los algoritmos diagnósticos de los pacientes coinfectados (68).

En pacientes con infección por VIH existen numerosos datos de su uso en sangre periférica y en sangre de médula ósea para el diagnóstico inicial de LV, con unos datos de sensibilidad que van del 73 al 100% y unos datos de especificidad muy cercanos al 100% (13,69–79).

Nuestro grupo evaluó la realización de la PCR en orina. Para los casos agudos esta técnica mostró una sensibilidad del 88% y una especificidad del 100% (80). Estos datos están presentados en forma de anexo al final del compendio, ya que no ha podido ser presentado dentro del formato de la tesis.

Por otro lado, estas técnicas también han sido evaluadas para realizar el seguimiento de los pacientes coinfectados que tras presentar un primer episodio están en riesgo de desarrollar nuevos episodios. Algunos son los estudios que han intentado correlacionar la carga parasitaria detectada en sangre periférica con el riesgo de recidiva. Los datos parecen sugerir que una elevada carga parasitaria estaría directamente relacionada con el riesgo de presentar una recidiva clínica (28,68,81–85). (Tabla 2).

Un dato a tener en cuenta a la hora de escoger una técnica u otra sería la exposición natural que existe en algunas áreas. Es bien sabido que en las zonas endémicas, al menos de *Leishmania infantum*, la seroprevalencia puede ir de un 3% en población general hasta un 45% en personas con antecedentes de consumo de drogas por vía parenteral (86–88). En estas áreas dónde queda patente que la población puede estar

en contacto con el parásito pero sin llegar a desarrollar enfermedad, estudios realizados con técnicas mucho más sensibles como es la PCR, han evidenciado la existencia de parásito en sangre periférica. Un estudio realizado en el sur de España en pacientes con infección por VIH asintomáticos, demostró la presencia de DNA de *Leishmania* en sangre periférica detectado por PCR, en un 30% de los pacientes evaluados. Ninguno de ellos desarrolló enfermedad durante el desarrollo del estudio (89).

Este hecho es de vital importancia al tener que interpretar los resultados obtenidos por las técnicas diagnósticas. En zonas como la nuestra, donde *Leishmania* está presente en nuestro medio, y la población general y los pacientes inmunodeprimidos en concreto, están en contacto con el parásito de manera natural. La detección de DNA en sangre con técnicas altamente sensibles como lo sería la PCR, ha de ser tomada con precaución, ya que como hemos mencionado, una PCR positiva no siempre se relaciona con manifestaciones clínicas.

El poder aplicar una PCR en el manejo de estos pacientes resulta atractivo, pero teniendo en cuenta las dificultades de su interpretación en este tipo de pacientes y en un área geográfica como la nuestra donde la *leishmania* es endémica supone un desafío no resuelto por la comunidad científica. Intentar entender la cinética del parásito en pacientes con infección por VIH para así poder utilizar los valores de parásitos detectados en sangre periférica como un dato a incorporar en la práctica clínica, supuso la motivación para llevar a cabo el segundo de los trabajos.

Tabla 2. Resumen de los estudios clínicos dónde se ha realizado el seguimiento mediante PCR de los pacientes con VIH tras un episodio de LV.

Autor	Año	Pacientes	Tipo de PCR	Tiempo Seguimiento (meses)	Resultados
Lachaud et al	1999	19	18S SSU- rRNA	0.5 – 36	6PCR+ : 6R (only 3 microbiologically confirmed)
Pizzuto et al	2001	8	SSU- rRNA	7.5 - 27	3 † 1 PCR- : 1R 4 PCR+ : 4R
Cruz et al	2002	30	SSU- rRNA Nested PCR	6 -15	26 PCR+ : 21R (17 confirmed) 4 PCR- : 2R
Fisa et al	2002	8	Genomic Nested PCR	2 - 10	8 PCR+ : 4R
Bossolasco et al	2003	5	SSU- rRNA Real time PCR	0 – 11	4 PCR+ : 3R 1PCR- : 0R
Mary et al	2004	4	Kinetoplast DNA Real time PCR	7 - 15	4 PCR+ : 2R / 1 not treated / 1 NS
Riera et al	2005	20	Genomic Nested PCR	1 - 28	Patients PCR+ 50% relapsed in 24 months Patients PCR- 12% relapsed in 24 months
Mary et al	2006	6	Kinetoplast DNA Real time PCR	6-24	4 PCR+ : 3R / 1 not treated 2PCR- : 0R
Antinori et al	2007	17	SSU –rRNA Semi quantitative	13	11 PCR+ 7 PCR persistently +: 6R
Bourgeois et al	2008	27	18S SSU- rRNA	51 (51 -108)	7†, 2L 18 PCR- : 7R 9 PCR+ : 29R
Antinori et al	2009	6	18S SSU- rRNA Real time PCR	NS	NS

SSU-rRNA: Small subunit ribosomal RNA, R: Recidiva, SD: Sin datos †: Fallecido, P: Perdidos en el seguimiento.

2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

2.1 Justificación del estudio

El manejo de la leishmaniosis visceral sigue siendo un desafío sobre todo en los casos de coinfección con el VIH. El principal reto aparece una vez el paciente ha sido diagnosticado y tratado por primera vez de leishmaniosis visceral. La evolución natural de la enfermedad en estos pacientes, va a estar determinada por las recidivas clínicas en mayor o menor medida. La escasez de trabajos y por tanto de evidencia científica deja desamparados a los clínicos que han de hacer frente a esta realidad. El TARGA únicamente va a espaciar los periodos entre recidiva y recidiva, ya que no será hasta que el paciente adquiera una inmunidad protectora suficiente y mantenida (que se ha establecido en 200 linfocitos CD4/mL mantenidos durante un mínimo de 6 meses) que puede estar en riesgo de desarrollar un nuevo episodio. Por ese motivo parece razonable que hasta que no se alcance ese umbral los pacientes van a necesitar en primer lugar, la instauración de una quimioprofilaxis secundaria seguido de un estrecho seguimiento para así poder detectar los futuros nuevos episodios.

En nuestro medio, los medicamentos que tenemos disponibles con esta indicación son la Amfotericina B Liposomal y las sales de antimonio, en concreto el Antimoniato de meglumina. Estos medicamentos son diferentes tanto en mecanismo de acción, perfil de seguridad y sobre todo precio. No existen datos sobre la efectividad de Amfotericina B Liposomal como quimioprofilaxis secundaria para prevenir nuevos episodios de LV. Los argumentos para la elección de cualquiera de ellos se basan en experiencias marginales y comentarios de expertos.

El seguimiento de los pacientes y por tanto el diagnóstico de las nuevas recidivas se basa actualmente en la repetición de los procedimientos diagnósticos utilizados en el diagnóstico inicial (aspirado de médula ósea, cultivo de tejidos o diagnóstico histológico de biopsias). Estos métodos son cruentos, molestos para el paciente y no exentos de complicaciones. Desafortunadamente, técnicas menos invasivas como la serología no han demostrado su utilidad en este contexto. Incorporar técnicas de biología molecular como lo es la PCR ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico inicial de estos pacientes. El problema surge al interpretar los

resultados en pacientes que habitan en zonas endémicas del parásito, dónde la población general está naturalmente expuesta a través de la picadura del flebótomo.

La detección de DNA en sangre periférica de manera cualitativa, no representa por sí misma un riesgo para el desarrollo de manifestaciones clínicas. Conocer la cinética del parásito y por tanto una cuantificación del mismo una vez tratado el paciente, sería de gran utilidad para hacer un enfoque adecuado de su seguimiento.

2.2 Hipótesis de trabajo

El manejo clínico del paciente con infección por VIH que es diagnosticado de LV tiene que ser abordado mediante dos estrategias:

- Una quimioprofilaxis eficiente y segura
- Una monitorización de la carga parasitaria

Por tanto las hipótesis que nos han llevado a desarrollar este trabajo son:

- Que tanto sales de antimonio (Antimoniato de meglumina) como Amfotericina B Liposomal serían equivalentes como quimioprofilaxis secundaria.
- Incorporar una PCR ultrasensible y cuantitativa sería de gran utilidad para el manejo de los pacientes, ya que según la cinética de la carga parasitaria se podría llegar a predecir las recidivas clínicas y evitar someter a los pacientes a nuevas pruebas invasivas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Diseñar una estrategia mediante la combinación de quimioprofilaxis secundaria y técnicas diagnósticas no invasivas para optimizar el manejo y seguimiento de los pacientes infectados por VIH que sufren un primer episodio de leishmaniosis visceral.

3.2 Objetivos secundarios

- Evaluar la eficacia y perfil de seguridad de Amfotericina B Liposomal administrada de manera mensual como quimioprofilaxis secundaria de la leishmaniosis visceral en pacientes infectados por el VIH.
- Describir la cinética de *Leishmania infantum* mediante la detección de su DNA a través de una PCR realizada en sangre periférica de pacientes con infección por VIH diagnosticados de leishmaniosis visceral.
- Evaluar la utilidad de incorporar la realización de una PCR a tiempo real de *Leishmania infantum* en sangre periférica durante el seguimiento de los pacientes con infección por VIH diagnosticados de leishmaniosis visceral.

4 MÉTODOS

4.1 Población a estudio

Para la evaluación de la Amfotericina B Liposomal como quimioprofilaxis fueron seleccionados los pacientes con infección por VIH y leishmaniosis visceral atendidos en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebron durante el periodo comprendido entre enero de 2001 y diciembre de 2005 que cumpliesen los siguientes criterios de inclusión:

- Tener más de 18 años.
- Haber tenido al menos un episodio de leishmaniosis visceral tratado con Amfotericina B Liposomal.
- Haber recibido al menos una dosis de Amfotericina B Liposomal como profilaxis secundaria.
- Estar en tratamiento con TARGA. Los pacientes que en el momento del diagnóstico de LV no estuvieran recibiendo TARGA, una vez hayan recibido la quinta dosis de Amfotericina B Liposomal tendrán que iniciar tratamiento antirretroviral.

Para la evaluación de la incorporación de la PCR en el seguimiento de los pacientes fueron seleccionados los pacientes con infección por VIH y leishmaniosis visceral atendidos en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebron que cumpliesen los siguientes criterios de inclusión:

- Tener más de 18 años.
- Tener muestras recogidas para la realización de PCR como al diagnóstico del episodio y durante el seguimiento.
- Estar en tratamiento con TARGA. Los pacientes que en el momento del diagnóstico de LV no estuvieran recibiendo TARGA, una vez hayan recibido la quinta dosis de Amfotericina B Liposomal tendrán que iniciar tratamiento antirretroviral.

-

4.2 Diseño de los estudios

Ambos trabajos responden a un diseño de estudios prospectivos. El primero, al evaluar un medicamento además se consideró como no aleatorizado y no controlado.

4.3 Periodo de estudio

De manera general los pacientes incluidos en ambos estudios fueron aquellos diagnosticados de LV durante el periodo comprendido entre enero de 1999 a septiembre de 2010.

Para el caso de la evaluación de la Amfotericina B Liposomal, el periodo concreto de estudio fue el comprendido entre enero de 2001 a diciembre de 2005 (ya que a partir de esa fecha fue cuando se introdujo tal medicamento en la guía terapéutica del hospital)

4.4 Definiciones

Consideramos relevante proceder a la definición de algunos términos e intervenciones ya que en algunos contextos podría acarrear confusión. Por norma general las definiciones se establecieron siguiendo los criterios establecidos en la literatura. En algunos puntos nos hemos permitido la licencia de adaptar algunos términos a la realidad de nuestro centro y procedimiento, siempre sin faltar al rigor científico:

4.4.1 Diagnóstico de episodio de leishmaniosis y su recidiva:

El diagnóstico de todos los episodios de LV se han basado en la visualización directa de los amastigotes en sangre de médula ósea o en el aislamiento de promastigotes en los cultivos de sangre de médula ósea o cualquier otro tejido, cultivado en medio Novy-McNeal-Nicolle a temperatura de 26°C.

4.4.2 Clasificación de los episodios:

Los episodios de leishmaniosis fueron clasificados como episodio recidivante o no recidivante. Consideramos un episodio recidivante cuando una vez considerado como curado (según los criterios expuestos en el siguiente apartado) viene sucedido de un nuevo episodio. Un episodio fue clasificado como no recidivante cuándo, tras ser considerado como curado no se haya podido documentar ningún nuevo episodio en el periodo que dure el estudio. Dado que es posible que algunos episodios al final del estudio no hubieran tenido un seguimiento suficiente para poder clasificarlos de una forma u otra, todos aquellos episodios que no tuvieran un mínimo de 18 meses de seguimiento fueron excluidos del análisis.

4.4.3 Definición de curación:

Cuatro semanas después del tratamiento del episodio agudo, la curación fue documentada por la combinación de criterios clínicos y parasitológicos.

A su vez definimos criterio clínico de curación cuando se objetivó resolución de la fiebre y una mejora de los parámetros analíticos teniendo en cuenta los rangos de normalidad de nuestro laboratorio (eritrocitos $4.4-5.5 \times 10^{12}/L$, hemoglobina 13.1-16.3 g/dL, leucocitos $4.9-9.3 \times 10^9/L$ y plaquetas $150-386 \times 10^9/L$)

Para definir criterio parasitológico de curación se tuvo que documentar la ausencia de parásitos en el aspirado de médula ósea o la negatividad del cultivo de la capa de células mononucleares obtenidas de sangre periférica (PBMC) ambos realizados un mes después de haber acabado el tratamiento del episodio agudo. La decisión final de realizar un aspirado para documentar la curación recayó sobre el médico a cargo del paciente.

4.5 Procedimientos

4.5.1 Recogida de datos y seguimiento de los pacientes

Para cada episodio se recogieron datos demográficos y datos relacionados con el VIH como conteo de linfocitos CD4, carga viral de VIH, tratamiento antirretroviral al inicio del episodio o iniciado una vez diagnosticado de LV, antecedentes de infecciones oportunistas previas.

Los pacientes fueron evaluados cada 3 semanas. En cada visita se les practicaba una exploración física, se les realizaba una extracción de sangre para hemograma, y bioquímica básica y se les recababa información acerca de efectos secundarios relacionados con la administración de la quimioprofilaxis secundaria. La extracción de sangre para recuento de CD4, carga viral de VIH, cuantificación de carga parasitaria y cultivo de PBMC se realizaba cada 4 meses.

4.5.2 Tratamiento y profilaxis

Cada episodio de leishmaniosis visceral fue tratado con Amfotericina B Liposomal (Ambisome®; Gilead Sciences) a dosis de 4 mg/kg de peso intravenosa durante 5 consecutivos seguidos de una vez a la semana durante 5 semanas, completando un total de 10 dosis y una dosis acumulada de 40 mg/kg de peso. La Amfotericina fue diluida en suero dextrosado al 5% hasta obtener una concentración final de 1-2 mg/mL. Seguidamente la solución fue administrada por vía intravenosa en perfusión continua durante un periodo aproximado de 120 minutos. El protocolo de tratamiento queda recogido en el protocolo del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebron y aprobado por la Comisión de Antibióticos del mismo hospital.

Una vez la curación fue determinada se indicó quimioprofilaxis secundaria. Los pacientes recibieron Amfotericina B Liposomal a dosis de 5mg/kg de peso intravenosa cada 3 semanas utilizando el mismo protocolo de reconstitución que el usado para el tratamiento o 20 mg/kg de peso de antimonioato de meglumina intravenoso cada 4 semanas.

4.5.3 Cultivo de la capa de células mononucleares (PBMC)

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de la sangre mediante el procedimiento de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las muestras de PBMC fueron sembradas en medios de cultivo de insecto de Schneider (Sigma, St. Louis, MO) con un suplemento de suero fetal de ternera al 20% inactivado por calor, orina humana estéril al 1% y gentamicina 25 µg/ml.

Los cultivos fueron mantenidos a 24-26°C, examinadas por microscopía invertida dos veces a la semana, y re-cultivados cada 2 semanas durante 6 meses antes de ser informado como negativo.

4.5.4 PCR

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó en ADN extraído de PBMC usando el kit High Pure PCR Template Preparation (Roche, Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección y cuantificación de ADN de *Leishmania* se analizó mediante amplificación de la secuencia de ADN del minicírculo del cinetoplasto con una PCR a tiempo real con algunas modificaciones(83).

Cada amplificación se realizó por triplicado, en 20 µl de una mezcla de reacción que contiene 1x iTaq Supermix con Rox (Bio-Rad , Hercules, CA, EE.UU.), 15 pmol de cebador directo (CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG), 15 pmol de cebador inverso (CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA), 50 pmol de la sonda marcada TaqMan (FAM-TTTTCGCAGAACGCCCTACCCGC- TAMRA) y 5 l de ADN de la muestra. Se utilizó el sistema ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) a 94°C y 55°C en un ciclador de más de 45 ciclos. El reactivo pre-desarrollado para el gen de la RNasa P humana (TaqMan Human RNase P detection reagent, Applied Biosystems) se incluyó en la reacción de PCR como control interno de la amplificación. El perfil térmico era idéntico a los de la amplificación de ADN del cinetoplasto. Un control sin plantilla se incluyó en cada ciclo como control negativo de la PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real se consideró positiva para *Leishmania* cuando el ciclo umbral (tC del inglés threshold cycle) estaba por debajo de 45.

El tC para una muestra dada fue el primer ciclo de la reacción PCR en la que se detecta la fluorescencia por encima de la línea basal. Por lo tanto una carga parasitaria mayor implica un tC menor.

Una serie de diluciones 1:10 de ADN estándar a partir de promastigotes (MHOM/ES/04/BCN-61, *L. infantum* ZMON-1) se utilizaron como calibradores (dilución en serie de 10^5 parásitos/ml a 10^{-3} parásitos/ml), lo que permite el trazado de una curva estándar, dónde además cada dilución se analiza por triplicado. El protocolo nuestra PCR a tiempo real utilizado en este estudio fue capaz de detectar cantidades muy bajas de Leishmania DNA, con un límite de detección de 5×10^{-5} parásitos por reacción de PCR.

4.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS para Windows (versión 15.0; SPSS, Chicago, IL).

Las variables categóricas se definieron como número de casos y proporción, y se compararon mediante la prueba de Chi-cuadrado o, en los casos que lo requerían, el Test Exacto de Fisher. Las variables cuantitativas se definieron como mediana y rangos o rango intercuartil, y se compararon con la prueba T de Student o, en los casos necesarios con la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney.

El análisis de la varianza para medidas repetidas (ANOVA) fue utilizado para comparar el recuento de CD4 y la carga parasitaria en función del tiempo de seguimiento.

El método de Kaplan Meier se utilizó para estimar el tiempo transcurrido hasta la recidiva. Además se comparó el tiempo hasta la recidiva entre los pacientes tratados con Amfotericina B Liposomal con una cohorte histórica de pacientes coinfectados con VIH y leishmaniosis visceral de nuestro centro que fueron tratados con sales de antimonio (los datos pertenecen a un artículo previamente publicado por Ribera y colaboradores (21). Las curvas de supervivencia (tiempo hasta la recidiva) fueron comparadas con los test de Breslow y long-rank.

Los valores para la PCR y para los incrementos de PCR que representen una mejor relación entre sensibilidad y especificidad para predecir recidiva fueron analizados en cada punto de corte del seguimiento utilizando las curvas ROC (Receiver Operating Curves).

También se calcularon la razones de verosimilitud positiva y negativa (likelihood ratios, LR) con el fin de medir el grado en que las probabilidades pre-test pueden modificar los resultados de las pruebas. Así un baja razón de verosimilitud negativa ($LR < 0.1$) y una alta razón de verosimilitud positiva ($LR > 10$), las consideramos útiles para descartar o fallar a favor de la técnica respectivamente.

Finalmente fue calculado el valor predictivo negativo de una PCR negativa.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo considerando un nivel de significación o valor de P menor de 0.05.

4.7 Confidencialidad de los datos y consentimiento informado

La recogida de datos se hizo con unos protocolos previamente establecidos y los datos se introdujeron en una base de datos con un sistema de codificación con el fin de proteger la información personal de cada paciente. En la hoja de recogida de datos el código se relacionó con el número de historia clínica. Estas hojas son custodiadas por el investigador responsable. Los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del hospital

5 RESULTADOS

5.1 TRABAJO 1:

Título: Eficacia de la Anfotericina B Liposomal como profilaxis secundaria de la leishmaniosis visceral en pacientes infectados por VIH.

Autores: Israel Molina¹, Vicenç Falcó¹, Manuel Crespo¹, Cristina Riera², Esteve Ribera¹, Adrià Curran¹, Jaume Carrio², Marjorie Diaz¹, Sara Villar del Saz¹, Roser Fisa², Paulo López-Chejade², Inma Ocaña¹ y Albert Pahissa¹

¹Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.

²Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

Antecedentes: La leishmaniosis visceral (LV) en los pacientes infectados por el VIH se caracteriza por frecuentes recaídas, incluso en aquellos que reciben profilaxis secundaria. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la eficacia de la anfotericina B liposomal (L-AMB) para la profilaxis secundaria de LV en pacientes infectados por el VIH.

Métodos: De enero de 2001 a diciembre de 2005 17 pacientes con VIH, con al menos un episodio previo de LV que recibieron L-AMB como profilaxis secundaria para la LV fueron incluidos en el estudio. La eficacia se midió como la proporción de pacientes libres de recaída de LV en diferentes momentos durante el seguimiento. Se compararon datos con una cohorte histórica de pacientes coinfectados VIH-LV tratados con sales de antimonio como quimioprofilaxis secundaria. Para el análisis de las recaídas se analizó la distribución de los episodios a lo largo del tiempo, y mediante una curva de supervivencia tipo Kaplan-Meier se analizó el tiempo hasta la recaída en función de la quimioprofilaxis utilizada.

Resultados: Veintiún episodios de VL fueron diagnosticados y nueve recayeron. El tiempo de seguimiento medio fue de 14 (5-44) meses. La probabilidad de permanecer

libre de recaída a los 6 meses fue del 89,7% (IC del 95%, 76,2 a 100%), a los 12 meses fue del 79,1% (IC del 95%, 61-97,2%), a los 24 y 36 meses fue del 55,9% (IC del 95%, 30,5 - 81,3%). En el grupo sin recaídas, los pacientes tenían un aumento significativo en los niveles de células CD4 de 102 (10-174) y 126 (4-159) a 12 y 24 meses, respectivamente ($p = 0,037$), mientras que en el grupo recurrente no se observó ningún aumento significativo. La profilaxis con L-AMB fue bien tolerada y sólo 3 pacientes tenían un leve deterioro de la función renal que no requirió ningún cambio en el tratamiento.

Conclusiones: L-AmB es bien tolerada y útil como profilaxis secundaria de la LV en pacientes con infección por VIH.

Trabajo publicado en: Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007; 60:837-42.

5.2 TRABAJO 2:

Título: PCR a tiempo real ultrasensible para el manejo clínico de la leishmaniosis visceral en pacientes infectados por el VIH.

Autores: Israel Molina¹, Roser Fisa², Cristina Riera², Vicenç Falcó¹, Aleix Elizalde¹, Fernando Salvador¹, Manel Crespo¹, Adrian Curran¹, Paulo López-Chejade², Silvia Tebar², Santiago Perez-Hoyos³, Esteban Ribera¹, Albert Pahissa¹.

¹ Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.

² Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona, España.

³ Unidad de apoyo a la investigación biomédica del Instituto de Investigación Vall d'Hebron

Antecedentes: La leishmaniosis visceral (LV) sigue siendo un reto diagnóstico y terapéutico de los pacientes infectados por el VIH. Métodos diagnósticos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han propuesto como una herramienta alternativa para el diagnóstico, pero no existen datos disponibles en cuanto a su uso para el seguimiento de la evolución clínica.

Métodos: Estudio prospectivo de cohortes de pacientes con LV y co-infección por VIH llevado a cabo en un hospital afiliado a la Universidad Autónoma de Barcelona, España. Para cada episodio, se registraron las variables relacionadas con la infección por VIH (recuento de células CD4 y la carga viral del VIH) cada 3 meses. La carga de parásitos de Leishmania se monitorizó usando una PCR a tiempo real al inicio y cada 3 meses. Los puntos de corte de la PCR para predecir la recaída se determinaron mediante curvas ROC.

Resultados: Del total de 37 episodios que finalmente fueron analizados, 25 fueron considerados como episodios recurrentes. El recuento de linfocitos CD4 fue inferior a 200 células/ml en 89,2% de los episodios. Se observó una disminución significativa en

la carga parasitaria en los episodios considerados como no recurrentes ($p < 0,01$). Un descenso significativo de la carga parasitaria a los 3 meses después del tratamiento podría ser útil para predecir una evolución clínica favorable de la LV. Una carga parasitaria de 0,5 parásitos/ml a los 12 meses después del tratamiento mostró una sensibilidad del 100% (IC del 95%: 0,77 a 1), una especificidad del 90,9% (IC del 95%: 0,63 a 0,98), una razón de verosimilitud positiva de 11 (IC 95% 1,7-71) y una razón de verosimilitud negativa de 0, para el diagnóstico de recaídas.

Conclusiones: Incorporar una PCR de leishmania ultrasensible y cuantitativa en la monitorización de los pacientes con infección por VIH que han tenido un episodio de LV, es útil para predecir futuras recidivas.

Trabajo publicado en:

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2013; 89:105-10.

Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients

I. Molina¹*, V. Falcó¹, M. Crespo¹, C. Riera², E. Ribera¹, A. Curran¹, J. Carrio², M. Diaz¹, S. Villar del Saz¹, R. Fisa², P. López-Chejade², I. Ocaña¹ and A. Pahissa¹

¹Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 14 March 2007; returned 24 April 2007; revised 30 April 2007; accepted 11 July 2007

Background and objectives: Visceral leishmaniasis (VL) is characterized by frequent relapses in HIV-infected patients, even in those who receive secondary prophylaxis. The aim of our study was to evaluate the efficacy of liposomal amphotericin B (L-AMB) for secondary prophylaxis of VL in HIV-infected patients.

Methods: From January 2001 to December 2005, 17 HIV patients, with at least one previous episode of VL who received L-AMB as secondary prophylaxis for VL, were included in the study. Efficacy was measured as the proportion of patients remaining free (non-relapse) of VL at different time points. Relapses were analysed as time-to-relapse distribution and were evaluated by survival analysis using the Kaplan–Meier method.

Results: Twenty-one episodes of VL were diagnosed and nine relapsed. The median follow-up time was 14 (5–44) months. The probability of remaining free of relapse at 6 months was 89.7% (95% CI, 76.2–100); at 12 months, the probability was 79.1% (95% CI, 61–97.2) and at 24 and 36 months, the probability was 55.9% (95% CI, 30.5–81.3). In the non-relapsing group, patients had a significant increase in CD4 cell levels of 102 (10–174) and 126 (4–159) cells/mm³ at 12 and 24 months, respectively ($P = 0.037$), whereas in the relapsing group, no significant increase was observed. Prophylaxis with L-AMB was well tolerated and only three patients had a mild impairment of renal function without requiring any change in treatment.

Conclusions: L-AMB is well tolerated and useful for secondary prophylaxis of VL.

Keywords: opportunistic infections, AIDS, AMB

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic infection endemic in the Mediterranean basin. The incidence of VL rose during the first years of the AIDS epidemic, and in the pre-highly active antiretroviral therapy (HAART) era, it was estimated that 2% to 9% of all HIV-infected patients had experienced an episode of VL.¹ The clinical course of VL in HIV-infected patients is characterized by frequent relapses.^{2–6} It is well known that intact immunity is the most important factor to reduce the incidence of VL and also to cure the infection. This explains why the incidence of VL has decreased, in the same way as other opportunistic infections, since the introduction of HAART.^{3,7–9} Nevertheless, despite the availability of HAART, the frequency

of VL relapses in HIV-infected patients remains high.^{2,3} It seems that HAART fails to prevent VL relapses unless the CD4 lymphocyte count reaches a high enough level to protect against them.^{3,9–11} Therefore, it seems that secondary prophylaxis is necessary until a satisfactory, maintained immunity status is achieved.^{2–4,11}

A previous study by Ribera *et al.*⁴ demonstrated that the probability of relapse was significantly higher in HIV-infected patients receiving no secondary prophylaxis for VL than in those receiving antimonial drugs. Since then, various agents have been used for secondary prophylaxis, but the lack of randomized studies and the low number of patients included in the existing published reports do not allow clear recommendations to be made on the best drug choice for this purpose.^{12–29}

*Corresponding author. Tel: +34-93-2746090; Fax: +34-93-4282762; E-mail: imolina@vhebron.net

Molina *et al.*

Liposomal amphotericin B (L-AMB) has been used successfully for treating VL even in patients unresponsive to antimonials.^{21–29} The pharmacokinetic properties of L-AMB provide high levels of the drug in bone marrow, liver and spleen, which are the reservoirs of *Leishmania*; hence, we decided to carry out a non-randomized pilot study to evaluate the efficacy of L-AMB for secondary prophylaxis of VL in HIV-infected patients.

Patients and methods

A prospective, non-randomized, non-controlled study of patients with VL and HIV co-infection was conducted from January 2001 to December 2005 in Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Inclusion criteria

- (i) Adult (≥ 18 years) should be HIV-infected patients with VL.
- (ii) Patients should have had at least one episode of VL treated with L-AMB.
- (iii) Patients should have received at least one dose of L-AMB for secondary prophylaxis.
- (iv) All patients should be under HAART. If patients were not receiving HAART when VL was diagnosed, this treatment was initiated after the fifth dose of L-AMB.

Diagnosis of VL and relapse

VL was diagnosed on the basis of identification of *Leishmania* amastigotes by direct bone marrow examination or by isolation of promastigotes in bone marrow or other tissues samples, cultured in Novy–McNeal–Nicolle medium at 26°C.

Treatment

Each VL episode was treated with 4 mg/kg/day of L-AMB (AmBisome[®]; Gilead Sciences) intravenously for 5 consecutive days and once per week thereafter for 5 more weeks (total, 10 doses=40 mg/kg). L-AMB was diluted with 5% dextrose injection to a final concentration of 1–2 mg/mL prior to administration. Subsequently, the drug was administered by intravenous infusion, using a controlled infusion device, over a period of ~120 min. This treatment was designed according to the Infectious Diseases Service protocol approved by our Hospital Committee of Antibiotics.

Follow-up, assessment and analytical methods

For each episode, we recorded variables related to HIV infection, such as demography, CD4 cell count, HIV viral load, antiretroviral therapy at diagnosis of VL and history of previous opportunistic infections. We also recorded the following clinical variables: fever, hepatosplenomegaly, weight loss and blood cell parameters. Finally, we recorded the time between cure of the acute episode and relapse or death.

Patients were assessed every 3 weeks. Physical examination, laboratory tests and adverse event assessment were carried out at each visit. CD4 cell count and serum HIV viral load were

measured every 4 months. Parasitological monitoring was performed by peripheral blood mononuclear cell (PBMC) culture, as described previously.³⁰

Definition of cure

Four weeks after treatment of the acute episode, cure was documented by a combination of clinical and parasitological criteria. Clinical criteria for cure required resolution of fever and improvement of the haematological parameters according to the normality values in our hospital (erythrocytes $4.4–5.5 \times 10^{12}/L$, haemoglobin 13.1–16.3 g/dL, leucocytes $4.9–9.3 \times 10^9/L$ and platelets $150–386 \times 10^9/L$). Parasitological criteria for cure required either an absence of parasites in bone marrow aspirate or negative PBMC culture, both performed 1 month after completing treatment of the acute episode. Assessment of cure by bone marrow aspiration was decided by the attending physician.

Prophylaxis

Once cure had been determined, all patients received 5 mg/kg of intravenous L-AMB every 3 weeks as secondary prophylaxis, applying the same reconstitution and administration conditions as used for treatment.

Statistical analysis

The primary endpoint was the proportion of patients remaining relapse-free at several time points (6, 12, 24 and 36 months). Each episode was analysed separately. Continuous variables were compared with the Mann–Whitney *U*-test and expressed as the median and range. Categorical variables were compared with the χ^2 test, or Fisher's test when the expected frequency was ≤ 5 . The Kaplan–Meier method was used to estimate the time to relapse.

In addition, we compared the time to relapse between our patients treated with L-AMB and a historical cohort of HIV-infected patients with VL diagnosed in our hospital, who received secondary prophylaxis with pentavalent antimonials. These data have been published previously.⁴ The curves of both series of patients were compared by the log-rank and Breslow tests.

A *P* value ≤ 0.05 was considered to indicate statistical significance. Statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (version 12.0).

Results

From January 2001 to December 2005, 29 episodes of VL were diagnosed in 17 HIV-infected patients. Eight episodes were excluded from the study. In four cases, because the acute episode was not treated with L-AMB (two patients received pentavalent antimonial salts and two pentamidine), one patient refused to receive secondary prophylaxis, two patients were lost to follow-up before ending treatment and one patient died from an unrelated cause during treatment of the acute episode. The final study group consisted of 21 episodes of VL in 15 HIV-infected patients, who were treated with L-AMB and also received secondary prophylaxis with L-AMB.

Amphotericin B for secondary prophylaxis of VL

Patients

There were 14 males and 1 female with a median age of 36 (26–53) years. Thirteen (86.7%) patients were former drug users and 2 (13.3%) acquired HIV infection by heterosexual transmission. Two of fifteen subjects included in the study were lost to follow-up: one at the 8th month of follow-up and the other after the first dose of L-AMB for secondary prophylaxis had been administered. One patient died because of bacteraemic pneumococcal pneumonia at the 5th month of follow-up.

Episodes

In all cases, *Leishmania* amastigotes were identified in bone marrow and PBMC culture was positive. In 13 of 21 (62%) episodes, patients were receiving HAART at diagnosis of the VL episode. Median CD4 cell count at the time of diagnosis was 100 cells/mm³ (4–300). In 20 of 21 episodes, CD4 lymphocyte count was <200 cells/mm³. Plasma HIV RNA was <50 copies/mL in eight episodes (38.1%). An opportunistic disease had been diagnosed previously in 15 (71.4%) episodes.

All episodes included in the study achieved clinical cure and had negative PBMC cultures 4 weeks after treatment. In all episodes in which bone marrow aspiration was performed (12 of 21), parasitological cure was also documented.

Relapses

Nine out of 21 (42.9%) relapses were diagnosed during follow-up; in 8 cases, *Leishmania* was identified in bone marrow samples and in 1 in a duodenal biopsy. The median time to relapse was 14 months (5–44). Parasitological monitoring showed that peripheral blood culture was positive at each relapse.

The Kaplan–Meier estimate of the probability of remaining relapse-free was 89.7% (95% CI, 76.2–100) at 6 months, 79.1% (95% CI, 61–97.2) at 12 months and 55.9% (95% CI, 30.5–81.3) at 24 and 36 months. No significant differences were found when comparing the evolution of our patients with a historical cohort of 17 patients who received 850 mg once-a-month of pentavalent antimony for secondary prophylaxis of VL (Figure 1).

Table 1 shows baseline characteristics related to HIV infection in patients who relapsed and in patients who did not. No significant differences were found between the two groups.

In the non-relapsing group, patients showed a significant increase in CD4 cell counts of 102 (10–174) and 126 (4–159) cells/mm³ at 12 and 24 months, respectively ($P = 0.037$), whereas in the relapsing group, no significant increase was observed (Figure 2).

All patients who did not relapse achieved a viral load <50 copies/mL at 24 months of follow-up, compared with 33.3% of patients who had relapses (Figure 3).

Adverse events and toxicity

No adverse events were documented during the period of prophylaxis. A mild impairment of renal function was observed in three episodes (14%) during the treatment period. Creatinine serum levels normalized in all three patients once treatment was

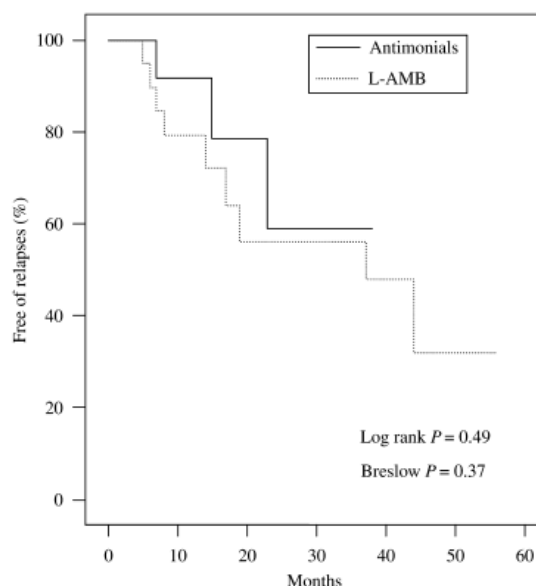


Figure 1. Kaplan–Meier estimates of cumulative percentage of patients free of relapse after the end of treatment of the acute episode of VL in HIV-infected patients receiving secondary prophylaxis with L-AMB when compared with a historical cohort of patients who received antimonials.

completed. No treatment was suspended because of adverse events.

Discussion

The introduction of HAART has led to a sharp reduction in the incidence of VL in HIV-infected patients.^{8,9} Nonetheless, once an HIV-infected patient develops VL, frequent relapses are common unless cellular immunity is restored; thus, secondary prophylaxis seems to be mandatory. In the present study, in

Table 1. Baseline characteristics of HIV-infected patients with and without VL relapse

	Relapsing group (n = 9)	Non-relapsing group (n = 12)	P value
CD4 cells/mm ³	126 (5–300)	82 (4–210)	0.39
CD4 < 200 cells/mm ³	8 (88.8%)	12 (100%)	0.42
Viral load < 50 copies/ mL	4 (44.4%)	4 (33.3%)	0.67
HAART	8 (88.8%)	5 (41.6%)	0.06
Previous opportunistic diseases	8 (88.8%)	7 (58.3%)	0.17
Risk factors for HIV infection			
former drug user	8 (88.8%)	10 (83.3%)	1
sexual transmission	1 (11.1%)	2 (16.6%)	

Molina *et al.*

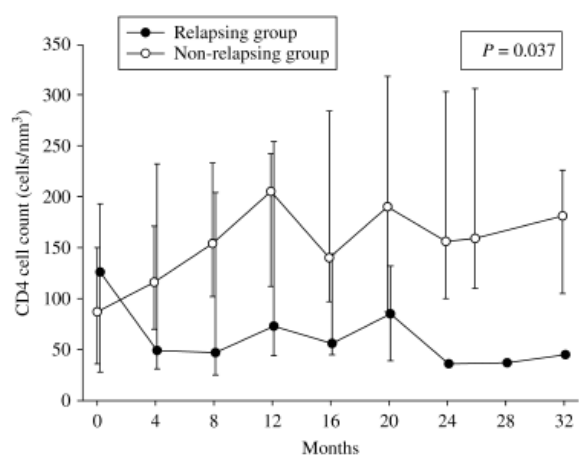


Figure 2. Comparison of changes in CD4 cell count in the VL relapsing and non-relapsing groups.

which all patients received HAART and most of them achieved good virological response (10 of 15), there was also a high rate of recurrence. It seems that an interaction between leishmaniasis and HIV infection exists. The absence of a specific T cell response against *Leishmania* in HIV-infected patients prevents its elimination and the persistence of *Leishmania* does not allow reconstitution of the patients' immune status. This negative interaction between the two infections leads to a high rate of recurrence.³¹

Various drugs (allopurinol, itraconazole, pentamidine and antimonials) have been used to prevent recurrent episodes of VL, but their value is still controversial because of the lack of adequately designed related studies.¹²⁻¹⁹ To the best of our knowledge, only one randomized comparative clinical trial focusing on secondary VL prophylaxis has been reported and the trial included only 17 patients.²⁰ Most of the remaining data

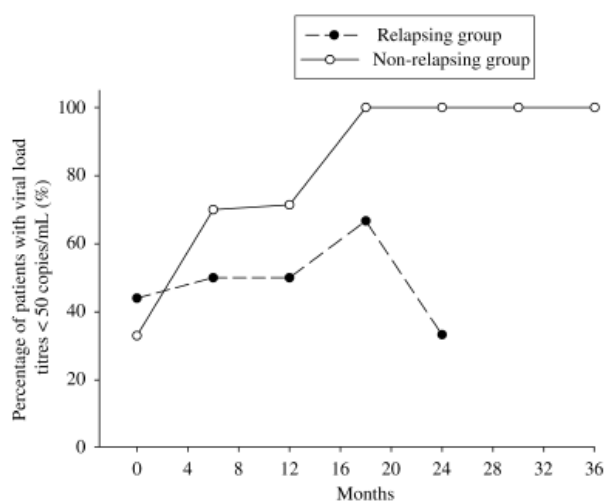


Figure 3. Proportion of patients with viral load < 50 copies/mL during follow-up in VL relapsing and non-relapsing groups.

come from observational and non-randomized retrospective studies; hence, the current recommendations for the prevention of VL relapses in HIV-infected patients are based on low grades of evidence.

Although the experience with L-AMB for the treatment and secondary prophylaxis of VL is limited,²¹⁻²⁹ new lipid formulations of amphotericin, with a better toxicity profile and higher tissue diffusion, make them an attractive option for secondary prophylaxis. In addition, some experimental data suggest that amphotericin could be a better drug for patients with immunodeficiency. Experimental models have shown that the antileishmanial activity of pentavalent antimonials is T cell-dependent and that could explain why these drugs have shown little activity in immunodeficient mouse models.³² In contrast, the antileishmanial activity of amphotericin B is T cell-independent and this property offers an additional theoretical advantage of L-AMB over antimonials and pentamidine for treatment and prophylaxis of VL.^{33,34}

With L-AMB, the proportion of patients in our cohort remaining relapse-free at 12 months was 80%. These results are better than those obtained by López Vélez *et al.*²⁰ in their randomized study with amphotericin B lipid complex, in which only 50% of patients remained free of relapse at 12 months. The most relevant experience with secondary prophylaxis of VL in HIV-infected patients was reported by Ribera *et al.*⁴ in 1996. In that study, the benefit of secondary chemoprophylaxis with pentavalent antimony over no prophylaxis or prophylaxis with allopurinol was clearly demonstrated. The proportion of relapse-free patients at 12 months was 93% in that study.

However, this optimistic vision of the efficacy of L-AMB for secondary prophylaxis should be balanced by the fact that ~20% of patients at 12 months and 45% at 24 months still have relapses despite HAART and L-AMB. In the long-term follow-up, the efficacy of antimonials also decreased in the study by Ribera *et al.*⁴ with 24 month relapse rates similar to those obtained in our study with L-AMB.

These failures do not seem to be related to the initial condition of the patient. We examined variables related to cellular immunity, such as the baseline CD4 lymphocyte count, viral load and HAART, and there were no differences between patients who relapsed and those who did not. However, during follow-up, the group of patients who had relapses showed a poorer immunological response, with the CD4 lymphocyte count persistently under 200 cells/mm³. These data confirm the importance of the host immune status to eradicate *Leishmania* infection.

Perhaps the answer to the high frequency of relapses lies in the parasite itself. Selection of drug-resistant pathogens is a well-known consequence of drug pressure; although there are only two small, inconclusive studies on the emergence of *Leishmania* strains resistant to amphotericin B in HIV co-infected patients, this possibility cannot be ignored in long-term recipients of the drug.³⁵ Carrió *et al.*³⁶ recently demonstrated that leishmaniasis relapses in patients treated with L-AMB are associated with high inhibitory concentrations (IC₅₀) and that resistance to this drug increases after secondary prophylaxis. If the *in vitro* resistance of *Leishmania* strains is confirmed and has a real clinical correlation, several queries will be open and will offer novel and promising strategies of treatment and secondary prophylaxis of VL. If continuous use of L-AMB results in the development of resistance and L-AMB is not more effective than antimonials in preventing relapses, it would be reasonable to use a different drug for prophylaxis than for treatment.

Amphotericin B for secondary prophylaxis of VL

Table 2. Comparison of relapses in which parasitological cure was or was not documented by bone marrow aspiration

	Parasitological cure not determined by bone marrow aspiration	Parasitological cure determined by bone marrow aspiration	P value
Number of episodes	9	12	
Number of relapses	3/9 (33.3%)	6/12 (50%)	0.58
Time to relapse (median and range)	5, 8 and 37 months, 8 (5–37)	6, 7, 14, 17, 19 and 44 months, 14 (6–44)	0.61

Our study is limited by the small number of cases, which is due to the fact that the incidence of symptomatic VL is low since the implementation of HAART. However, to the best of our knowledge, this is the largest series in which the efficacy of L-AMB chemoprophylaxis and the clinical outcome of the cohort have been investigated.

Another limitation of our study is the fact that documentation of parasitological cure by bone marrow aspiration was only performed in 57.1% (12 of 21) of the cases. It is possible that episodes of relapse in the group of patients in which parasitological cure was not documented by bone marrow study were treatment failures rather than relapses. Table 2 shows the number of relapses and the time to relapse, depending on whether parasitological cure was documented by bone marrow aspiration or not. There were no significant differences in the number of relapses or the time to relapse between the two groups. In the three patients with a relapse, in whom bone marrow aspiration was not performed, the relapse occurred at 5, 8 and 37 months after the primary episode, similar to what occurred in those in whom microbiological cure was confirmed by bone marrow aspiration. This period of time is long enough, in our opinion, to consider these new episodes as relapses rather than acute treatment failures. Moreover, despite not having bone marrow confirmation in 42.8% (9 of 21) of the episodes, all the episodes considered cured had negative PBMC cultures, and all the relapsing episodes had positive PBMC cultures. These results agree with Riera *et al.*,³⁰ who observed that the presence of viable parasites during post-treatment follow-up increases the probability of relapses. This suggests, in our series, the good clinical correlation of that technique.

In conclusion, L-AMB is well tolerated and useful for secondary prophylaxis of VL. Therefore, L-AMB seems to be an alternative to pentavalent antimonials in preventing new VL relapses. However, an immune reconstitution is also required to warrant an effective and durable response. Randomized trials to compare the efficacy of both drugs and their role either in treatment or in prophylaxis are required.

Funding

This study was supported in part by ISCIII-RETIC RD06/006.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B *et al.* Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10**: 298–319.
- Mira JA, Corzo JE, Rivero A *et al.* Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am J Trop Med Hyg* 2004; **70**: 298–301.
- Fernández-Cotarelo MJ, Martínez Abellan J, Vales Guerra JM *et al.* Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 973–7.
- Ribera E, Ocaña I, de Otero J *et al.* Prophylaxis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus infected patients. *Am J Med* 1996; **100**: 496–501.
- Pasquau F, Ena J, Sanchez R *et al.* Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; **24**: 411–8.
- Ribera E, Cucurull E, Ocaña I *et al.* Visceral leishmaniasis in patients with HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; **13**: 73–9.
- De la Rosa R, Pineda JA, Delgado J *et al.* Incidence of and risk factors for symptomatic visceral leishmaniasis among human immunodeficiency virus type 1-infected patients from Spain in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 762–7.
- De la Rosa R, Pineda JA, Delgado J *et al.* Influence of highly active antiretroviral therapy on the outcome of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 2001; **32**: 633–5.
- López-Velez R. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are coinfecting with HIV. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; **97**: S143–7.
- Casado JL, Vélez López R, Pintado V *et al.* Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; **20**: 202–5.
- Berenguer J, Cosin J, Miralles P *et al.* Discontinuation of secondary anti-Leishmania prophylaxis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *AIDS* 2000; **14**: 2946–8.
- Angarano G, Maggi P, Coppola SL *et al.* Itraconazole as a maintenance therapy for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; **17**: 365–7.
- Lafeuillade A, Chaffanjon P, Delbeke E *et al.* Maintenance itraconazole for visceral leishmaniasis in HIV infection. *Am J Med* 1992; **92**: 449.
- Raffi F, Merrien D, Le Pape P *et al.* Use of an itraconazole/allopurinol combination for the treatment of visceral leishmaniasis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995; **21**: 1338–9.

Molina *et al.*

15. Torrus D, Boix V, Massa B *et al.* Fluconazole plus allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 1996; **37**: 1042–3.
16. Derouin F, Gangneux JP. Changing patterns of disease and treatment of parasitic opportunistic infections. *Curr Opin Infect Dis* 1998; **11**: 711–6.
17. Perez-Molina JA, Lopez-Velez R, Montilla P *et al.* Pentamidine isethionate as secondary prophylaxis against visceral leishmaniasis in HIV-positive patients. *AIDS* 1996; **10**: 237–8.
18. Hamour AA, Skelly R, Jowitt SN *et al.* Visceral leishmaniasis (Kala-azar) in two patients with HIV-1 infection: atypical features and response to therapy. *J Infect* 1998; **36**: 217–20.
19. Laguna F, Adrados M, Alvar J *et al.* Visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; **16**: 898–903.
20. López-Vélez R, Videla S, Márquez M *et al.* Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 540–3.
21. Mastroianni CM, d’Ettore G, Forcina G *et al.* Long-term remission of human immunodeficiency virus-associated visceral leishmaniasis after initiation of potent combination antiretroviral treatment: report of two cases. *J Infect* 2000; **40**: 94–6.
22. Borrelli P, Imperato A, Murdaca G *et al.* Liposomal amphotericin B as first line and secondary prophylactic treatment for visceral leishmaniasis in a patient infected with HIV. *Ann Ital Med Int* 2000; **15**: 169–71.
23. Murdaca G, Setti M, Campelli A *et al.* Liposomal amphotericin B for treatment of acute phase and secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in a HIV positive patient. *Infez Med* 2000; **8**: 241–4.
24. Orlando G, Del Sorbo F, Corbellino M *et al.* Secondary prophylaxis for *Leishmania* infection in an HIV-positive patient. *AIDS* 1998; **12**: 2086–7.
25. Lopez Dupla M, Gil Aguado A, Uriol Lavilla P *et al.* Efficacy of liposomal amphotericin B in the treatment and secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV infected patients: report of two cases. *J Antimicrob Chemother* 1993; **32**: 657–9.
26. Montana M, Chochoi N, Monges P *et al.* Liposomal amphotericin B in secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: report of five clinical cases. *Pathol Biol* 2004; **52**: 66–75.
27. Lazanas MC, Tsekas GA, Papandreou S *et al.* Liposomal amphotericin B for leishmaniasis treatment of AIDS patients unresponsive to antimonium compounds. *AIDS* 1993; **7**: 1018–9.
28. MacBride M, Linney M, Claydon EJ *et al.* Visceral leishmaniasis following treatment with liposomal amphotericin B. *Clin Infect Dis* 1994; **19**: 362.
29. Barratt G, Legrand P. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2005; **18**: 527–30.
30. Riera C, Fisa R, Ribera E *et al.* Value of culture and nested PCR of blood in prediction of relapses in patients co-infected with *Leishmania* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg* 2005; **73**: 1012–5.
31. Berhe N, Wolday A, Hailu Y *et al.* HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS* 1999; **13**: 1921–5.
32. Murray HW, Oca MJ, Granger AM *et al.* Requirement for T cells and effect of lymphokines in successful chemotherapy for an intracellular infection experimental visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1253–7.
33. Murray HW, Oca MJ, Granger AM. Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T-cell-deficient host: response to amphotericin B and pentamidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 1504–5.
34. Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient *scid* mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1872–5.
35. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 111–26.
36. Carrió J, Riera C, Ribera E *et al.* *In vitro* susceptibility of *Leishmania* strains isolated from HIV coinfecting patients to liposomal amphotericin B and pentavalent antimony (oral communication). In: *Programme of the Third World Congress on Leishmaniasis, Palermo, Sicily*, 2005, p. 128.

Ultrasensitive Real-Time PCR for the Clinical Management of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients

Israel Molina,* Roser Fisa, Cristina Riera, Vicenç Falcó, Aleix Elizalde, Fernando Salvador, Manuel Crespo, Adrian Curran, Paulo López-Chejade, Silvia Tebar, Santiago Pérez-Hoyos, Esteban Ribera, and Albert Pahissa

Infectious Disease Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; Parasitology Department, Faculty of Pharmacy, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; Unit of Methodologic Support in Biomedical Research, Vall d'Hebron Research Institute, Spain

Abstract. Molecular methods have been proposed as an alternative tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL), but no data are available regarding use for monitoring clinical outcome. A prospective cohort study of human immunodeficiency virus (HIV) and VL-coinfected patients was conducted in a university-affiliated hospital in Barcelona, Spain. *Leishmania* parasite load was monitored using a real-time polymerase chain reaction (PCR) at baseline and every 3 months. Cutoff values for PCR were determined using receiver operating characteristic (ROC) curves. Overall, 37 episodes were analyzed, and 25 of these episodes were considered as relapsing episodes. A significant decrease of parasite load measured 3 months after treatment could predict the clinical evolution of VL. A parasite load over 0.9 parasites/mL measured 12 months after treatment could predict relapse with a sensitivity of 100% and a specificity of 90.9%. Monitoring parasite load by an ultrasensitive quantitative *Leishmania* PCR is useful to predict the risk of relapse after a VL episode in HIV-infected patients.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) remains a diagnostic and therapeutic challenge among human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. The clinical course of VL in these patients is characterized by frequent relapses.^{1,2} Despite the availability of highly active antiretroviral therapy (HAART), the frequency of VL relapses in HIV-infected patients remains high.^{3,4} Because of this high risk of relapse despite appropriate treatment, secondary prophylaxis and close follow-up are mandatory until a satisfactory maintained immunity status is achieved.⁵

In countries where the disease is endemic, standard diagnosis of VL is based on direct observation and/or culture of the parasite in tissue samples (bone marrow, lymph node, liver, or spleen), which requires invasive procedures in most of cases.^{2–4} Diagnosing each relapsing episode with such invasive techniques can be unpleasant for patients. In recent years, there has been growing interest in the use of samples obtained through less-invasive procedures, such as peripheral blood (conventional culture, serologic tests, and microculture method among others), for both VL diagnosis and follow-up after treatment.⁶

Over the past decade, molecular diagnostic methods such as polymerase chain reaction (PCR) have been increasingly used for the diagnosis of VL, and PCR amplification has been proposed as an alternative tool to be incorporated in diagnostic algorithms. Data exist regarding its use in peripheral blood and bone marrow samples, with sensitivities ranging from 73% to 100% and specificity close to 100% for the diagnosis of the initial VL episode, mainly in HIV-infected patients.^{7–18} However, its value as a useful tool for monitoring VL in HIV-infected patients remains to be proven. Various published studies seem to correlate the presence of a high parasite load level in peripheral blood measured by PCR after an initial episode treated and cured with a higher risk of future clinical relapse (Table 1).^{19–25} However, it is well-known that, in

Leishmania infantum-endemic areas, because of the natural exposure to *Leishmania* parasites, the seroprevalence ranges from 3% in the general population to 45% in former drug users.^{26–28} In these settings, PCR methods have revealed up to 30% of coinfection with *Leishmania* in asymptomatic HIV-infected patients.²⁹

The lack of knowledge on parasite kinetics, the scarce number of patients studied, and the short follow-up period are the main limitations of most published data on this topic.

The main objectives of our study were to understand the parasite kinetics and therefore, evaluate the usefulness of a real-time PCR (rt-PCR) alone during the follow-up of HIV-infected patients with VL.

MATERIALS AND METHODS

A prospective cohort study of patients with VL and HIV coinfection was conducted from January of 1999 to September of 2010 in the Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Patients. Inclusion criteria for the study were (1) adult (≥ 18 years) patients with HIV infection with an initial episode of VL, (2) samples available to perform PCR for *Leishmania* detection at baseline and during follow-up, and (3) patients receiving HAART. If patients were not receiving HAART when VL was diagnosed, this treatment was initiated.

There were 3 females and 13 males. Thirteen (81.2%) patients were former drug users, and three (18.8%) patients acquired HIV infection by sexual transmission. The median age of the patients at the time of the first leishmaniasis episode was 36 years (range = 27–48). One patient was excluded from the study, because he was lost during follow-up after the first episode.

Ethics statement. The study protocol was approved by the institutional review board of the hospital, and informed written consent was obtained from all patients.

Diagnosis of VL and relapse. VL was diagnosed on the basis of *Leishmania* identification by direct bone marrow examination and/or isolation of culture in bone marrow or other tissue samples.

*Address correspondence to Israel Molina, P^o Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: imolina@vhebron.net

TABLE 1
Summary of clinical studies of parasitological follow-up of VL in HIV-infected patients measured by PCR

Authors	Year	Patients followed with PCR	Type of PCR	Follow-up time (months)	Results
Lachaud and others ¹⁹	1999	19	18S SSU-rRNA	0.5–36	6 PCR+: 6R (only 3 microbiologically confirmed)
Pizzuto and others ¹¹	2001	8	SSU-rRNA	7.5–27	3 died; 1 PCR–: 1R; 4 PCR+: 4R
Cruz and others ¹³	2002	30	SSU-rRNA nested PCR	6–15	26 PCR+: 21R (17 confirmed); 4 PCR–: 2R
Fisa and others ¹²	2002	8	Genomic nested PCR	2–10	8 PCR+: 4R
Bossolasco and others ¹⁶	2003	5	SSU-rRNA rt-PCR	0–11	4 PCR+: 3R; 1 PCR–: 0R
Mary and others ²¹	2004	4	Kinetoplast DNA rt-PCR	7–15	4 PCR+: 2R (1 not treated; 1 NS)
Riera and others ²²	2005	20	Genomic nested PCR	1–28	Patients PCR+: 50% relapsed in 24 months; patients PCR–: 12% relapsed in 24 months
Mary and others ²³	2006	6	Kinetoplast DNA rt-PCR	6–24	4 PCR+: 3R (1 not treated); 2 PCR–: 0R
Antinori and others ²⁴	2007	17	SSU-rRNA semiquantitative	13	11 PCR+: 7 PCR persistently +: 6R
Bourgeois and others ²⁵	2008	27	18S SSU-rRNA	51 (51–108)	7 died; 2L; 18 PCR–: 7R; 9 PCR+: 29R
Antinori and others ²⁰	2009	6	18S SSU-rRNA rt-PCR	NS	NS

L = lost to follow-up; NS = not shown; R = relapse.

Four weeks after treatment of the acute episode, cure was documented using a combination of clinical and parasitological criteria.

Clinical criteria for cure were both (1) resolution of fever and (2) improvement of the hematological parameters according to our hospital's normality values. Parasitological criteria for cure were either an absence of parasites in bone marrow aspirate or negative peripheral blood mononuclear cell (PBMC) culture as previously described performed 1 month after completing treatment of the acute episode.²² Cure assessment by bone marrow aspiration was decided by the attending physician.

VL episodes. VL episodes were classified as relapsing or non-relapsing episodes. A relapsing episode was defined when a subsequent episode occurred after initial cure. A non-relapsing episode was considered when there was no clinical and parasitological evidence of relapse by the end of the study.

Because of the possibility that some episodes at the end of the study could have short follow-up periods, those episodes classified as non-relapsing were required to have a minimum of 18 months follow-up.

Follow-up, assessment, and analytical methods. For each episode, variables related to HIV infection, such as demography, CD4 cell count, and HIV viral load, were recorded every 3 months. The *Leishmania* PCR values at baseline and every 3 months were also recorded in addition to the duration of each episode. Patients were assessed every 4 weeks with physical examination; laboratory tests and adverse event assessment were carried out at each visit.

Treatment and prophylaxis. Each VL episode was treated with either 4 mg/kg per day Liposomal Amphotericin B (L-AmB) intravenously for 5 consecutive days and one time per week thereafter for 5 more weeks (total of 10 doses = 40 mg/kg) or amphotericin B lipid complex 3 mg/kg per day for 10 days. After cure was determined, all patients received 5 mg/kg intravenous L-AmB every 3 weeks or 20 mg/kg intravenous meglumine antimoniate every 4 weeks as secondary prophylaxis.

PCR procedure. PCR was performed on DNA extracted from PBMCs using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) using the manufacturer's instructions. The detection and quantification of *Leishmania* DNA were analyzed by amplification of kinetoplast mini-circle DNA sequence by a rt-PCR with some modifications.²¹ Each amplification was performed in triplicate in a 20 µL reaction mixture containing 1 × iTaq supermix with Rox (Bio-Rad, Hercules, CA), 15 pmol direct primer (CTTTT

CTGGTCCTCCGGGTAGG), 15 pmol reverse primer (CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA), 50 pmol labeled TaqMan probe (FAM-TTTTCGCAGAACGCCCTACC CGC-TAMRA), and 5 µL sample DNA. The ABI Prism 7700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA) at 94°C and 55°C cycling over 45 cycles was used. The pre-developed reagent for the RNase P human gene (TaqMan Human RNase P detection reagent; Applied Biosystems) was included in the PCR reaction as an internal control of amplification. The thermal profile was identical to those profiles of kinetoplast DNA amplification. A non-template control was included in each run as the rt-PCR negative control. rt-PCR was considered positive for *Leishmania* when the threshold cycle (tC) was < 45. The tC for a given sample was the first cycle of the PCR reaction where fluorescence is detected above the baseline. Therefore, a higher parasite load implies a lower tC.

A 10-fold dilution series of standard DNA from promastigotes (MHOM/ES/04/BCN-61; *L. infantum* ZMON-1) was used as a calibrator (serial dilution from 10⁵ parasites/mL to 10⁻³ parasites/mL), allowing for the plotting of a standard curve; each dilution was tested in triplicate. The rt-PCR protocol used in this study was able to detect very low amounts of *Leishmania* kDNA, with a detection limit of 5 × 10⁻⁵ parasites per PCR reaction tube.

Statistical analysis. Each episode was analyzed separately. Continuous variables between relapsing and non-relapsing episodes were compared with the Mann-Whitney *U* test and expressed as the medians and ranges or interquartile ranges (IQRs). Categorical variables were compared with the χ^2 or Fisher's test when the expected frequency was ≤ 5. Repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used to compare CD4 cell count with PCR values along time. A *P* value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Cutoff values for PCR values and PCR increases that resulted in the best compromise between sensitivity and specificity for predicting relapse were determined every 3 months using receiver operating characteristic (ROC) curves. The positive and negative likelihood ratios (LRs) were calculated as a measure of the extent to which pre-test odds were altered by the test results. Low negative LR (< 0.1) and high positive LR (> 10) are considered useful for ruling out and ruling in decisions, respectively. Finally, the negative predictive value of a negative PCR was also calculated.

Statistical analysis was performed with the SPSS statistical package (version 15.0).

RESULTS

Forty-seven episodes of VL in 16 HIV-infected patients were recorded. Of 47 episodes of VL, 10 episodes were not evaluated, because PCR determination was not performed during follow-up. Therefore, 37 episodes were finally analyzed, and 25 of these episodes were considered as relapsing episodes. The remaining 12 episodes were non-relapsing episodes at the end of the study. Median CD4 cell count was 100 cells/mL (IQR = 4–300) at the time of diagnosis. The CD4 lymphocyte count was lower than 200 cells/mL in 33 of 37 (89.2%) episodes, and plasma HIV RNA was lower than 50 copies/mL in 19 (51.3%) episodes. The median parasite load at the time of diagnosis was 50 parasites/mL (IQR = 4–130 p/mL). All 37 episodes were considered cured by clinical criteria and had negative PBMC cultures 4 weeks after treatment. In 17 of 37 (45.9%) episodes, parasitological cure was also documented by a negative bone marrow aspiration 1 month after treatment.

The main clinical and HIV characteristics in respect to both types of episodes are shown in Table 2. No significant differences regarding initial CD4 lymphocyte count and percentage, proportion of patients with viral load under 50 copies/mL, and parasite load were observed between either group at the time of diagnosis. In contrast, during follow-up, those episodes that finally relapsed presented a lower increase in the number and percentage of CD4 lymphocytes, showed a scarce variation in the parasite load, and showed less time free of relapse than those episodes that did not.

Concerning parasite kinetics measured by PCR, a significant decrease in parasite load was seen in those episodes considered as non-relapsing, mainly occurring from the third month on ($P < 0.001$) (Figure 1).

We analyzed the best PCR cutoff to predict relapse at different points in time (3, 6, 9, and 12 months after initial treatment) using an ROC curve. The best area under the curve (0, 983) was found at the point of 12 months. A cutoff value of 0.9 parasites/mL (-0.05 log) measured in this moment showed sensitivity of 100% (95% confidence interval [95% CI] = 0.77–1), specificity of 90.9% (95% CI = 0.60–0.98), a positive likelihood ratio of 10 (95% CI = 1.5–64), and a negative likelihood ratio of 0 (Table 3).

Interestingly, the parasite load variation observed in both groups during the first 3 months of follow-up was, at this point, different enough to allow prediction of who was not going to relapse. At the third month, a parasite load above 0.03 parasites/mL (-1.5 log) estimates (with 90% sensitivity and 75% specificity) the patients who are not going to relapse, with 82% negative predictive value and almost 87% positive predictive value, a positive likelihood ratio of 3.7 (95%

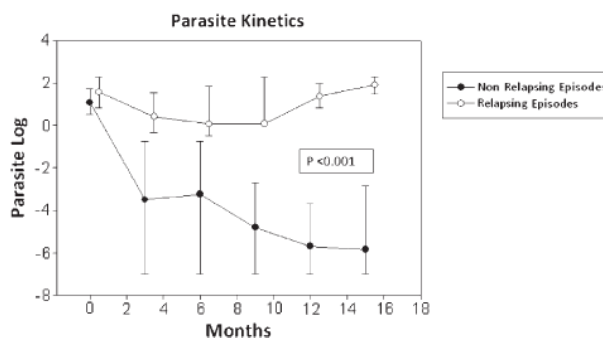


FIGURE 1. Parasite kinetics (expressed in logarithm of parasite load) according to the type of episode. Black circles represent non-relapsing episodes. White circles represent relapsing episodes.

CI = 1,353–9,775), and a negative likelihood ratio of 0.1 (95% CI = 0.03–0.47) (Table 3).

Although the CD4 progression showed an increasing trend in the non-relapsing group, no significant differences between the groups were observed (Figure 2).

When the non-relapsing episodes were analyzed, all had at least two consecutive negative PCR determinations, whereas in the relapsing episode, this condition occurred in only one case. Therefore, when considering two consecutive negative PCRs as parasitological cure condition, a negative predictive value of 92.3% is obtained. In our series, the only patient who had a relapsing episode despite having two consecutive negative PCR was one who interrupted the HIV treatment and suffered an important immunovirological impairment (CD4 cell count dropped from 120 to 0 cells/mm³ and viral load increased from undetectable level to 670.000 copies/mL).

After treatment of VL, patients required a median of 19.5 months (range = 3–57 months) to achieve two consecutive negative PCR.

DISCUSSION

The chronic nature and frequent relapses of leishmaniasis in patients infected with HIV require close follow-up.

Conventional methods used to monitor these patients, such as serology, antigen detection in urine, and peripheral blood cultures, have not proven useful with HIV-infected patients in predicting recurrence because of either low sensitivity and specificity or the time needed to obtain a result.^{30,31}

Although molecular biology techniques have proven valuable as diagnostic tools because of their relatively easy implementation and high sensitivity and specificity, their role in

TABLE 2
Comparison between relapsing and non-relapsing episodes with baseline characteristics of VL in HIV-infected patients

	Relapsing episodes (median [IQR])	Non-relapsing episodes (median [IQR])	P
Number of episodes	25	12	–
Time free of relapse (relapsing episodes)/time to end of study (non-relapsing episodes; months)	16 (9–18)	67.5 (28.5–89)	< 0.001
CD4 lymphocyte count/CD4 %	101 (50–174)/11% (10–17)	98 (68–108)/16% (11–17)	0.64/0.49
Patients with HIV viral load < 50 copies/mL (number/%)	12/48%	7/58%	0.73
<i>Leishmania</i> PCR at diagnosis of episode (parasites/mL)	40 (4–50)	10 (5–50)	0.19
ΔCD4	14	135.5	< 0.001
Δ% CD4	1	5.5	0.026

ΔCD4 = CD4 increase is the median of the CD4 count at the end of the episode minus the CD4 count at diagnostic; % CD4 = CD4% increase is the median of the CD4% at the end of the episode minus the CD4% at diagnostic.

TABLE 3
Accuracy of PCR to predict the outcome of VL episodes at 3 and 12 months using different cutoff values calculated with ROC curves

	Parasite load at 3rd month (cutoff value = 0.03 parasite/mL)	Parasite load at 12th month (cutoff value = 0.9 parasite/mL)
Test is positive in relapsing group	20 of 22	12 of 12
Test is positive in non-relapsing group	3 of 12	1 of 10
Sensitivity	90.9%	100%
Specificity	75%	90%
Positive predictive value	86.9%	92.3%
Negative predictive value	81.8%	100%
Positive likelihood ratio	2, 720	10
Negative likelihood ratio	0, 136	0

monitoring patients remains to be defined. The published studies listed in Table 1 showed that, after the initial episode is cured, a group of patients with detectable parasite burden would be at risk to develop new relapses. Thus, it could be thought that, despite receiving a treatment capable of controlling the clinical symptoms, a residual parasite load only detectable by sensitive techniques, such as PCR, could justify the subsequent recurrences. However, as mentioned in the literature, the PCR positivity alone could not be considered clinically relevant. This finding has been called active chronic VL or cryptic *Leishmania* infections by some authors.^{29,32,33} Therefore, interpretation of PCR in monitoring these patients must be taken with caution. It is for this reason that ultrasensitive quantitative PCR was incorporated into our study to understand the kinetics of the *Leishmania* parasite in HIV-coinfected patients and assess its usefulness in monitoring clinical outcome.

There are many factors determining the clinical expression of leishmaniasis in patients with residual parasitemia: some depending on the immune system of the host, others depending on virulence factors of the parasite, and others depending on the relation with the HIV itself.^{31,33} However, it seems logical that, independent of all these factors, a patient who is going to present a clinical event will suffer an increase in parasite load high enough to lead them to relapse.

After analyzing all VL episodes, we found that, regardless final outcome, they had similar baseline characteristics. There were no differences in the immune status at the time of diagnosis or the parasite load. After the acute process of the episode passed and after having been treated, two very different patterns are observed among the cases that resulted in relapse and

cases that did not. In keeping with previous data, those episodes that, on receiving appropriate treatment, could not eliminate the parasite burden, showing a persistently positive PCR, finally developed a new clinical relapse, whereas in those episodes without relapse, the parasite load tends to be eliminated.

Considering that the parasite load itself may be a factor in determining recurrence, it would be very useful to find out whether there is a cutoff point at which, with the highest reliability, the clinical evolution could be predicted. As shown in Figure 1, the trend of parasite load seems to significantly differ beyond the third month. Using the ROC curve, it could be said that a parasite load above 0.03 parasite/mL at this time point estimates (with almost 90% probability) the risk of having a relapsing course. If the parasite load decreases below that cutoff, the clinical outcome will be favorable with 82% likelihood. However, for those episodes in which such a parasite clearance could not be achieved, a parasite load of 0.9 parasites/mL at 12 months showed the most favorable sensitivity and specificity (100% and 90%, respectively) for predicting recurrence.

Correspondingly, one would expect that those episodes achieving complete elimination of parasite load after treatment, defined as negative PCR performed on two consecutive occasions over a 6-month period, could be those episodes that cure. Indeed, all the episodes without relapse satisfy this condition. Only one of the relapsing episodes fulfils this premise. However, on analyzing this case individually, it corresponds to a patient who, after an episode of VL and achievement of a negative PCR, discontinued HAART two times, suffering a deep immunosuppression (0 CD4 cell/mL), which led the patient to a new clinical episode. The *Leishmania* strain identification in that particular case could not be done, therefore making it impossible to determine whether it was, in fact, a relapse or reinfection. Nevertheless, the determination of two consecutive negative PCRs in a 6-month period after appropriate treatment correlates well with no recurrence, with a negative predictive value of 92.3%. For this reason, because of its high negative predictive value, this condition could be used to withdraw chemoprophylaxis.

In our series, it took a median of 19 months to obtain a negative result for the parasite load. This result differs from some previous publications, where much less time was required to achieve a negative PCR: from 17.5 days (8 days to 21 weeks) in the article by Antinori and others²⁴ to 3 months (2 weeks to 7 months) in the work by Lachaud and others¹⁹ to 6 months according to Bourgeois and others²⁵ to between 6 and 21 weeks in the work by Pizzuto and others.¹¹ The reason justifying this difference is precisely the type of PCR used. In our case, the kinetoplast DNA was used as a target of amplification, which has a much lower detection threshold than small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA). Using an ultrasensitive quantitative PCR, such as the one used in our study, may not pose a great advantage in VL episode diagnosis given that the circulating parasite load is so high that it can easily be detected by another PCR that amplifies other targets as ribosomal DNA.²⁰ However, if we intend to use PCR to determine whether the parasite load has been removed and predict the clinical outcome, an ultrasensitive technique such as the technique that we propose should be used.

It would have been expected that, in those episodes that did not relapse, the increase in the number of CD4 lymphocytes and therefore, the patient's immunity would play a decisive role. Although the trend of CD4 lymphocytes suggests that this

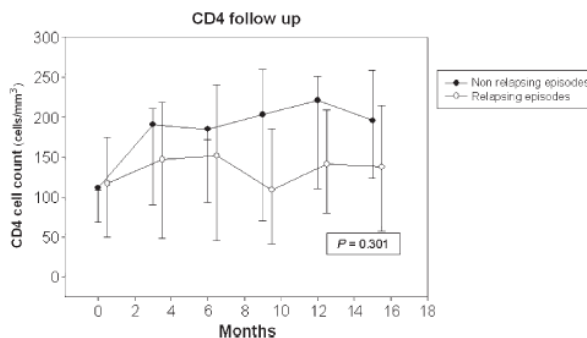


FIGURE 2. CD4 count cells follow-up according to the type of episode. Black circles represent non-relapsing episodes. White circles represent relapsing episodes.

hypothesis is correct, no statistically significant differences were found in either group, possibly because of sample size.

The antiretroviral therapy or secondary chemoprophylaxis has not been analyzed, because all patients were under treatment and received prophylaxis; however, the aim of the study was to analyze the parasite kinetics independently of these factors related to the treatment.

One of the main limitations presented by this study is the difficulty in cataloguing episodes into relapsing and non-relapsing at the time of analysis, because at this point, future recurrences cannot be determined. Hence, those episodes that, at the time of evaluation, had no reasonable monitoring period (minimum of 18 months) were excluded from the study. Likewise, we consider the differences in both duration of episodes (Table 2) and the parasite load kinetics (Figure 1) enough to acknowledge them as different episodes.

Another limitation presented by our study is the fact that documentation of parasitological cure by bone marrow aspiration was only performed in 45.9% (17 of 37 episodes) of cases. However, despite not having bone marrow confirmation, all those episodes considered cured had negative PBMC cultures, and all relapsing episodes had positive PBMC cultures.

CONCLUSION

In summary, we think that incorporating an ultrasensitive quantitative *Leishmania* PCR in the monitoring of HIV-infected patients suffering from VL may be useful.

During patient follow-up, if the parasite burden is significantly reduced during the first 3 months and medical conditions are maintained (HAART and correct follow-up), a good clinical evolution could be predicted, allowing the cessation of performing follow-up PCR. If this reduction is not achieved, a PCR follow-up is recommended. A parasite load equal to or higher than 0.9 parasites/mL 12 months after the episode requires a closer monitoring of the patient, because the next clinically compatible febrile episode will most likely correspond to a leishmaniasis relapse, at which point other invasive techniques could be avoided.

In addition, after an episode of treated and cured leishmaniasis, if the patient has two consecutive negative PCRs in a 6-month period, the patient may be considered disease-free with a probability above 90%, and the withdrawal of secondary prophylaxis could be considered. It would seem reasonable to add maintenance of a good immunovirological status to this last condition. However, this finding has not been entirely proven within this study. Additional larger studies are required to analyze classical factors of relapse in addition to new factors, such as quantification of parasite load.

Received August 27, 2012. Accepted for publication January 21, 2013.

Published online April 29, 2013.

Acknowledgment: The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) assisted with publication expenses.

Financial support: This study was partially supported by Red Temática de Investigación en Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (RIS G03/173-RETIC RD06/0006/0039).

Disclaimer: The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Authors' addresses: Israel Molina, Vicenç Falcó, Aleix Elizalde, Fernando Salvador, Manuel Crespo, Adrian Curran, Esteban Ribera,

and Albert Pahissa, Infectious Disease Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, E-mails: imolina@vhebron.net, vfalco@vhebron.net, ealeix@hotmail.com, medinano@yahoo.es, mcrespo@vhebron.net, acurran@vhebron.net, eribera@vhebron.net, and apahissa@vhebron.net. Roser Fisa, Cristina Riera, Paulo López-Chejade, and Silvia Tebar, Parasitology Department, Faculty of Pharmacy, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, E-mails: rfisa@ub.edu.es, mcriteria@ub.edu.es, pllch@yahoo.com, and stebar@ub.edu.es. Santiago Pérez-Hoyos, Unit of Methodologic Support in Biomedical Research, Vall d'Hebron Research Institute, Spain, E-mail: santi.perezhoys@vhir.org.

REFERENCES

- Ribera E, Ocaña I, de Otero J, Cortes E, Gasser I, Pahissa A, 1996. Prophylaxis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus infected patients. *Am J Med* 10: 496–501.
- Ribera E, Cucurull E, Ocaña I, Vallespí T, Gasser I, Juste C, 1995. Visceral leishmaniasis in patients with HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 13: 73–79.
- Mira JA, Corzo JE, Rivero A, Macías J, De Leon FL, Torrecisneros J, Gómez-Mateos J, Jurado R, Pineda JA, 2004. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am J Trop Med Hyg* 70: 298–301.
- Fernández-Cotarelo MJ, Martínez Abellan J, Vales Guerra JM, Martínez Sánchez P, Rodrigo Gómez De La Bárcena M, Salto Fernandez E, 2003. Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 37: 973–977.
- Molina I, Falcó V, Crespo M, Riera C, Ribera E, Curran A, Carrio J, Diaz M, Villar del Saz S, Fisa R, López-Chejade P, Ocaña I, Pahissa A, 2007. Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 60: 837–842.
- Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabas E, Koksall F, 2005. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. *Am J Trop Med Hyg* 73: 276–280.
- Mathis A, Deplazes P, 1995. PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from human and dogs. *J Clin Microbiol* 33: 1145–1149.
- Piarroux R, Gambarelli F, Toga B, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Qulici M, 1996. Interest and reliability of a polymerase chain reaction on bone marrow samples in the diagnosis of visceral leishmaniasis in AIDS. *AIDS* 10: 452–453.
- Costa JM, Durand R, Deniau M, Rivollet D, Izri M, Houin R, Vidaud M, Bretagne S, 1996. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 34: 1831–1833.
- Campino L, Cortes S, Pires R, Oskam L, Abranches P, 2000. Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 396–398.
- Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalomogna C, Calattini S, Corsico L, Persico T, Adriani B, Magni C, Guaraldi G, Gaiera G, Ludovisi A, Gramiccia M, Galli M, Moroni M, Corbellino M, Antinori S, 2001. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 39: 357–361.
- Fisa R, Riera C, Ribera E, Gallego M, Portus M, 2002. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 (Suppl 1): S191–S194.
- Cruz I, Canavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J, 2002. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 (Suppl 1): S185–S189.
- Martin-Sanchez J, Pineda JA, Andreu-Lopez M, Delgado J, Macías J, De la Rosa L, Morillas-Márquez F, 2002. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous

- and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 669–677.
15. Deniau M, Canavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P, 2003. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (Suppl 1): S115–S133.
 16. Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, Bossi L, Germagnoli L, Lazzarin A, Uberti-Foppa C, Cinque P, 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 41: 5080–5084.
 17. Fissore C, Delaunay P, Ferrua B, Rosenthal E, Del Giudice P, Aufeuvre JP, Le Fichoux Y, Marty P, 2004. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 42: 5332–5333.
 18. Gatti S, Gramegna M, Klersy C, Madama S, Bruno A, Maserati R, Bernuzzi AM, Cevini C, Scaglia M, 2004. Diagnosis of visceral leishmaniasis: the sensitivities and specificities of traditional methods and a nested PCR assay. *Ann Trop Med Parasitol* 98: 667–676.
 19. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, Dedet JP, Bastien P, 2000. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 38: 236–240.
 20. Antinori S, Calattini S, Piolini R, 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, Corbellino M, 2009. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg* 81: 46–51.
 21. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H, 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 42: 5249–5255.
 22. Riera C, Fisa R, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Gállego M, Moner L, Molina I, Portús M, 2005. Value of culture and nested PCR of blood in the prediction of relapses in patients co-infected with *Leishmania* and HIV. *Am J Trop Med Hyg* 73: 1012–1015.
 23. Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, Dumon H, 2006. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 75: 858–863.
 24. 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, Corbellino M, 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. *Clin Infect Dis* 44: 1602–1610.
 25. Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P, 2008. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48: 13–19.
 26. Gutiérrez J, Maroto MC, Piédrola G, Higuera A, 1993. Prevalence of anti-*Leishmania* antibodies in parenteral drug addicts. Yield value of 2 study techniques. *Med Clin (Barc)* 100: 168–170.
 27. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez M, Muncunill J, Sedeño M, Mascaró M, Udina M, Gállego M, Carrió J, Forteza A, Portús M, 2008. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 48: 1383–1389.
 28. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portús M, 2004. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 102–110.
 29. García-García JA, Martín-Sánchez J, Gállego M, Rivero-Román A, Camacho A, Riera C, Morillas-Márquez F, Vergara S, Macías J, Pineda JA, 2006. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 44: 4455–4458.
 30. Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Molina I, Gállego M, Portús M, 2004. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 899–904.
 31. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J, 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334–359.
 32. Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, Lachaud L, 2010. 'Active chronic visceral leishmaniasis' in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med* 11: 670–673.
 33. Colomba C, Saporito L, Vitale F, Reale S, Vitale G, Casuccio A, Tolomeo M, Maranto D, Rubino R, Di Carlo P, Titone L, 2009. Cryptic *Leishmania infantum* infections in Italian HIV infected patients. *BMC Infect Dis* 9: 199.

6 DISCUSIÓN

Una vez expuestos los resultados de los trabajos procedemos a hacer una discusión conjunta. Para poder mantener una misma lógica, creemos oportuno presentar la discusión siguiendo el orden de los objetivos de la tesis. El objetivo 1 se presentará por separado y por conveniencia decidimos agrupar los objetivos 2 y 3 para desarrollar una discusión más coherente.

6.1 OBJETIVO 1: Evaluar la eficacia y perfil de seguridad de Amfotericina B Liposomal administrada de manera mensual como quimioprofilaxis secundaria de la leishmaniosis visceral en pacientes infectados por el VIH.

Igual como sucede con otras infecciones oportunistas, la introducción del TARGA supuso un verdadero impacto en las tasas de incidencia de la LV en población infectada por el VIH, llegando a pasar de unas tasas de incidencia anuales de 0.48 casos / 100 pacientes con SIDA en la época pre-TARGA, a unas tasas de 0.26/100 en la década de los 2000 (5,25). Pero a pesar del tratamiento antirretroviral, cuando un paciente con infección por VIH desarrolla una LV, el paciente va a estar en riesgo de desarrollar nuevas recidivas clínicas hasta que no se consiga un nivel de inmunidad celular protectora. Por tanto parece razonable que hasta que no se alcance dicho umbral sea necesario mantener una buena quimioprofilaxis secundaria.

En el estudio previamente presentado todos los pacientes incluidos o estaban en tratamiento antirretroviral o se le inició poco después del episodio de LV. Además una gran proporción de ellos (10 de 15) consiguieron una buena respuesta virológica tras su inicio. A pesar de estas condiciones óptimas, se observó una elevada tasa de recidivas (42.9%).

Diferentes estrategias terapéuticas y medicamentos han sido utilizados como profilaxis secundaria (alopurinol, itraconazol, pentamidina y sales de antimonio) pero el grado de evidencia alcanzado sobre su eficacia es muy bajo debido a la escasez de pacientes incluidos y a la falta de ensayos clínicos aleatorizados (39–46,90). De todos los estudios, sólo uno fue un ensayo clínico aleatorizado. En dicho estudio se evaluó la

Amfotericina B complejo lipídico comparada con placebo en un total de 17 pacientes, dónde precisamente se demostró que tratar a los pacientes disminuía significativamente la tasa de recidivas; un 50% de los pacientes que recibieron tratamiento se mantuvieron sin recidivas durante un año de seguimiento comparado con un 22% de los que no fueron tratados, con un odds ratio de 3.5 a favor de la Amfotericina (38).

Aunque sí que existe literatura sobre el uso de la Amfotericina B en el tratamiento de la LV, estudios sobre su uso como quimioprofilaxis secundaria hay muy pocos (47–49,51–55,91). La formulación liposomal de la Amfotericina, con un mejor perfil de toxicidad y una mayor distribución tisular, la convierten en una muy buena opción terapéutica para este fin. Además de sus mejores características farmacocinéticas y farmacodinámicas comparadas con las otras formulaciones, parecería según algunos datos experimentales, que serían incluso más eficaces en pacientes inmunosuprimidos. En algunos modelos animales se ha observado que la actividad leishmanicida de las sales de antimonio podría ser dependiente de los linfocitos T, de ahí que en ratones inmunodeprimidos tenga una escasa actividad parasiticida(92). De manera contraria, la actividad de la Amfotericina B liposomal parece ser independiente de los linfocitos T, por lo que esta propiedad documentada únicamente a nivel experimental, podría suponer una gran ventaja para este medicamento a diferencia de otros como sales de antimonio o pentamidina (93,94).

En nuestro primer estudio, la proporción de pacientes que se mantuvo libre de recidiva habiendo recibido profilaxis con Amfotericina B liposomal fue del 80%. Comparado nuestros datos con el único ensayo clínico aleatorizado realizado por López-Vélez y colaboradores, nuestros resultados fueron mejores (80% de éxito vs. 50%) (38).

Uno de los estudios más relevantes sobre la quimioprofilaxis contra LV fue el realizado por Ribera y colaboradores en 1996. En ese estudio no sólo se demostró que hacer profilaxis era mejor que no hacerla, sino que las sales de antimonio fueron mejor que placebo y que alopurinol. Un 93% de los pacientes que recibieron profilaxis con sales de antimonio se mantuvieron libres de recaída en un periodo de seguimiento de 12 meses.

A pesar de esta relativa visión optimista de la Amfotericina B Liposomal, habría que tener en cuenta que aproximadamente un 20% de los pacientes sí que presentan recidivas a pesar de una correcta administración de la profilaxis y de estar recibiendo un tratamiento antirretroviral optimizado. En el seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio de Ribera y colaboradores, a los 24 meses, presentan unas tasas de recaída similares a las de nuestro estudio.

Sería tremendamente útil poder encontrar los factores de riesgo relacionados con las recidivas en pacientes coinfectados. Por ese motivo hemos intentado buscar una justificación a esta proporción de recidivas y analizamos algunos factores relacionados a la enfermedad de base y a su estado inmunitario, como fueron el recuento de linfocitos CD4, la carga viral y el tipo de TARGA que estaban recibiendo los pacientes. No se pudieron encontrar diferencias con respecto a las características basales de los pacientes, pero durante el seguimiento de los episodios, el grupo de pacientes que presentó recidivas, tuvo una peor respuesta inmunológica con un recuento de linfocitos CD4 persistentemente por debajo de las 200 cell/mL.

Estos datos están totalmente en consonancia con otros trabajos previamente publicados y con un reciente meta-análisis (35). Los pacientes que tienen mayor incremento en sus cifras de CD4 son los que presentan un menor número de recidivas. En nuestro contexto epidemiológico, posiblemente una cifra de CD4 por encima de 100 cell/mL sea suficiente como para reducir el riesgo de tener nuevas recaídas (36). En otras zonas del mundo, con otras especies de leishmania el umbral mínimo se eleva hasta 200 cell/mL, como es en el caso de Etiopía (95).

Paralelamente, la propia infección por leishmania puede tener un efecto sobre la población de linfocitos CD4, impidiendo su recuperación una vez instauradas las medidas terapéuticas oportunas (96).

Parece pues confirmarse que a igualdad de condiciones basales, de tratamiento de los episodios, de la infección por VIH y de la quimioprofilaxis utilizada, la respuesta inmune del huésped coinfectado, y en concreto la inmunidad celular, es fundamental para poder controlar la infección.

Otro punto de vista a tener en cuenta sería el propio parásito en sí mismo. La aparición de resistencias por los patógenos, es una respuesta habitual que sucede cuando cualquier microorganismo está sometido a una presión antibiótica a concentraciones subóptimas. Podría pues pensarse que, si una vez tratado el episodio inicial y el paciente va a presentar recaídas durante el seguimiento, sería porque el tratamiento inicial no ha sido capaz de eliminar toda la población de parásito. Si se somete al paciente a una quimioprofilaxis mantenida, con una menor exposición al fármaco y por tanto unas dosis sub-óptimas, podría ser suficiente para generar resistencias y por tanto desarrollar nuevos episodios. Existen pocos estudios no concluyentes y contradictorios a este respecto. Un estudio realizado por Carrió y colaboradores, no publicado pero presentado en un congreso, demostraba que las cepas de leishmania aisladas de pacientes coinfectados con múltiples episodios y que han sido tratados repetidas veces con Amfotericina B Liposomal, presentan unas concentraciones inhibitorias (IC_{50}) cada vez mayores (97). Contrariamente a este resultado, Lachaud y colaboradores no encontraron cambios en la susceptibilidad frente a Amfotericina B liposomal de las cepas aisladas de sucesivas recidivas, a pesar de tener pacientes con infección durante casi 10 años (98).

Aunque los escasos resultados publicados parezcan contradictorios, la aparición de cepas resistentes ante una presión antibiótica mantenida tendría que por lo menos ser tenido en cuenta al evaluar un candidato para ser utilizado como profilaxis secundaria en esta y en cualquier enfermedad, ya que por lo menos en este escenario concreto, nos planteamos un tratamiento de larga duración. Por ese motivo sería razonable a la hora de decidir una estrategia u otra por lo menos escoger un medicamento que fuese diferente al tratamiento de elección de los episodios.

A tenor de los resultados obtenidos dónde hemos comprobado que las tasas de éxito de ambos compuestos (sales de antimonio y Amfotericina B Liposomal) son parecidas en cuanto a la protección frente a nuevos episodios clínicos y teniendo en cuenta que según las recomendaciones internacionales, en nuestro medio, Amfotericina B Liposomal sería el tratamiento de elección de los episodios de LV, podría ser razonable

plantear las sales de antimonio como tratamiento de elección como quimioprofilaxis secundaria, para poder preservar a las poblaciones de parásito residuales de la presión antibiótica y reservar la Amfotericina B Liposomal como tratamiento de primera línea de los episodios agudos.

6.2 OBJETIVO 2: Describir la cinética de *Leishmania infantum* mediante la detección de su DNA a través de PCR en sangre periférica de pacientes con infección por VIH diagnosticados de leishmaniosis visceral.

y

OBJETIVO 3: Evaluar la utilidad de incorporar la realización de una PCR a tiempo real de *Leishmania infantum* en sangre periférica durante el seguimiento de los pacientes con infección por VIH diagnosticados de leishmaniosis visceral.

Los métodos convencionales utilizados en el diagnóstico de la LV, como son, la serología, la detección de antígenos en orina o los cultivos de PBMC de sangre periférica entre otros, no han demostrado ser útiles para la monitorización de los pacientes coinfectados VIH-VL con la finalidad de poder predecir nuevos episodios. Los grandes motivos por lo que estas técnicas no son recomendadas son primeramente sus insuficientes cifras de sensibilidad y especificidad por un lado, y por otro la laboriosidad en su procesado y la elevada demora en obtener resultados (18,66).

Las técnicas de biología molecular han sido propuestas para el diagnóstico de la leishmaniosis, en cualquiera de sus expresiones clínicas, pero a pesar de ser técnicas relativamente sencillas de implementar y de tener unas cifras de sensibilidad y especificidad superiores al 95%, su papel en la monitorización de estos pacientes no ha quedado del todo bien establecida.

Los trabajos que aparecen en la tabla 2 demuestran que el hecho de tener carga parasitaria detectable en sangre periférica y medida por PCR, es un factor de riesgo para desarrollar futuras recaídas.

Por tanto podría ser factible que, una vez tratado el episodio agudo, quedase todavía una población de parásitos viables y que únicamente fuese detectada por técnicas altamente sensibles como lo son las de biología molecular, y que por tanto fueran la causa de las subsecuentes recaídas.

Este hecho ha de tomarse con precaución, ya que como bien se ha documentado en la literatura, el hecho de tener una PCR positiva en sí misma no condicionaría la aparición de nuevas recaídas. Esta situación ha sido denominada por algunos autores como Leishmaniosis Visceral Activa Crónica o Infección Críptica por Leishmania (89,99,100).

Si partimos pues de la base que, puede existir de manera natural alguna cantidad de parásito detectable por técnicas como la PCR, sería interesante conocer la cinética de estas poblaciones de parásitos una vez superado el episodio agudo y así poder entender su comportamiento y poder predecir las recidivas. Para este fin, posiblemente la mejor herramienta sería una PCR a tiempo real ultrasensible (como la que ha sido utilizada en nuestro estudio).

Varios factores concomitantes determinarían la expresividad clínica o el control de esa parasitemia residual. Algunos que dependen del sistema inmunológico del paciente y que ya han sido desarrollados previamente, otros propios del parásito (factores de virulencia, mecanismos de resistencia...) y otros en relación directamente con el propio VIH (18,100). De todas maneras nos parece lógico pensar que, independientemente de todos esos factores que van a modular la expresión clínica hacia un lado u otro, aquellos pacientes que finalmente van a acabar desarrollando un nuevo episodio clínico tendrían que experimentar un aumento de la carga parasitaria.

Después de haber analizado los episodios de LV, hemos evidenciado que, al margen de la evolución clínica, volvimos a demostrar que durante al inicio de cada episodio no encontramos diferencias entre los grupos que finalmente acabarían desarrollando una recidiva, de los que tras el tratamiento consiguen controlar la enfermedad. Esa homogeneidad de características se aprecia tanto en datos demográficos, inmunológicos o incluso de carga parasitaria. Pero una vez superado ese periodo inicial y observando la cinética parasitaria, podemos describir claramente dos patrones de comportamiento que se correlacionan con los eventos clínicos. El grupo de pacientes que acabará desarrollando una nueva recaída, presenta una reducción inicial de la carga parasitaria pero no consigue eliminar los parásitos, hasta que finalmente presenta un nuevo evento clínico. Por contra, aquellos pacientes que se curan tras un primer episodio, la carga parasitaria decrece y presenta una tendencia a ser eliminada.

Considerando la carga parasitaria como un factor independiente de recidiva, sería extremadamente útil determinar si existe un umbral mínimo, que una vez sobrepasado condicione indefectiblemente una recidiva.

Primeramente observamos la gráfica (figura 1, trabajo 2) dónde se representan los patrones de la carga parasitaria en función del devenir de eventos clínicos. A primera vista parece observarse un marcado cambio en la tendencia de la parasitemia a partir del tercer mes. Utilizando las curvas ROC, podemos inferir en este punto que, si la carga parasitaria estuviera por encima de los 0.03 parásitos/mL estimaría en un 90% de probabilidades, el riesgo de padecer un nuevo episodio de leishmaniosis. Dicho de otra manera podemos decir que si la carga parasitaria está por debajo de ese punto de corte, con un 82% de probabilidades podríamos considerar el episodio clínico recién tratado como curado, ya que el paciente va a tener una buena evolución clínica.

De todas maneras, en aquellos pacientes que llegados a ese punto tuvieran una carga parasitaria superior al punto de corte establecido (0.03 parásitos/mL), una carga parasitaria por encima de 0.9 parásitos/mL al año de seguimiento ofrece la mejor relación entre sensibilidad y especificidad para predecir recurrencia (100% y 90% respectivamente).

De igual manera, sería de esperar que aquellos episodios que fueran capaces de lograr una eliminación completa de la carga de parásitos después del tratamiento pudiera ser una condición premonitoria de cura. Por eso motivo definimos esta situación como aquellos pacientes que dan como resultado negativo de la PCR negativo en dos ocasiones consecutivas durante un periodo de 6 meses (las determinaciones de PCR se realizan cada 3 meses). Una vez definida tal premisa, observamos que todos los episodios catalogados como que no presentan recaída, satisfacen esta condición.

Por el contrario, sólo uno de los episodios que fueron catalogados como recidivantes, cumplió esta premisa y mantuvo la PCR negativa durante 6 meses previo a la recidiva clínica. Al analizar este caso de forma individual, correspondía a una paciente que después de un episodio de LV y habiendo logrado una PCR negativa dos veces consecutivas, decidió suspender el TARGA. Posteriormente, la paciente sufrió una

inmunosupresión importante llegando a tener 0 linfocitos CD4/ml, lo que finalmente condujo a la paciente a desarrollar un nuevo episodio clínico.

En este caso concreto hubiera sido tremendamente interesante poder identificar las cepas de *Leishmania* para poder así diferenciar entre una verdadera recaída o una reinfección. Lamentablemente no se pudo realizar este procedimiento, pero esta posibilidad no es del todo remota, ya que se ha tenido la oportunidad de confirmar casos de reinfección en este tipo de pacientes y sobretodo en áreas endémicas como la nuestra. Un estudio publicado por Morales y colaboradores (España), demuestra que en un 7.5% de los pacientes estudiados, los nuevos episodios de leishmania se corresponde con una reinfección (por patrón de RFLP, del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) (101). Otro estudio publicado por Lachaud y colaboradores (Francia) eleva hasta el 30% el número de reinfecciones sobre el total de episodios (7/10)(98).

Sin embargo, la determinación de 2 resultados negativos por PCR en un período de seis meses después de un tratamiento adecuado, se correlacionó bien con una buena evolución clínica libre de recurrencias, con un valor predictivo negativo de 92,3%. Por este motivo, y teniendo en cuenta su alto valor predictivo negativo, esta condición podría ser utilizada para valorar la posibilidad de retirar la quimioprofilaxis en estos pacientes.

Un dato a destacar de nuestra experiencia fue que se tardó una mediana de 19 meses hasta obtener una PCR negativa. Este resultado difiere notablemente de otras experiencias previamente publicadas por otros grupos, donde se requirió mucho menos tiempo. Por ejemplo el grupo de Antinori y colaboradores, reporta una mediana de 17.5 días (con un rango de 8 días a 21 semanas) (68), para el grupo de Lachaud y colaboradores el tiempo necesario fue de 3 meses (con un rango de 2 semanas a 7 meses) (81), Bourgeois y colaboradores publican una media de 6 meses (102) y finalmente Pizzuto y colaboradores mencionan un rango comprendido entre las 6 y 21 semanas.

La razón que justifica estas diferencias es precisamente el tipo de PCR utilizada. En nuestro caso, se utilizó como diana de amplificación de la PCR el ADN cinetoplasto, que

precisamente tiene un umbral de detección mucho más bajo que SSU-rRNA, lo que le hace tener una mayor sensibilidad comparada con el resto de técnicas. El uso de una PCR cuantitativa ultrasensible tal y como sería la utilizada en nuestro estudio, no tiene por qué aportar una mayor ventaja en el diagnóstico de los episodios de LV en pacientes coinfectados por el VIH, ya que habitualmente la carga parasitaria circulante es tan alta que puede ser fácilmente detectado por otras PCR que amplifiquen otras dianas como el ADN ribosomal (82). Sin embargo, si la intención de utilizar la PCR es para determinar si la carga parasitaria se ha eliminado y por ende predecir el resultado clínico, una técnica ultrasensible como la que se propone, es la que nos aportaría la información y los matices necesarios para tal efecto.

En el segundo trabajo también se analizaron factores asociados a la propia infección por VIH para intentar correlacionar alguno de ellos con los eventos clínicos de recaídas.

A diferencia del primer trabajo y como se hubiera esperado inicialmente, aquellos episodios que no recaen tendrían que haber mostrado un aumento en el número de linfocitos CD4 para así confirmar la hipótesis previamente analizada que la inmunidad celular del paciente jugarían un papel decisivo para el control de las recidivas. Aunque la tendencia de los linfocitos CD4 sugiere esta hipótesis, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. Como sucede en la mayoría de análisis, se podría achacar al tamaño muestral, el no poder encontrar una significación estadísticas a las diferencias observadas. Y realmente en nuestro estudio probablemente sea así. Sucede que otros trabajos tampoco han podido encontrar diferencias significativas cuando evalúan el comportamiento de los CD4 de manera cuantitativa (13,19,22,24,27,34,73), aunque cuando se tienen en cuenta un valor dicotómico de los CD4 (> 100 cell/mL o <100 cell/mL) o simplemente el incremento de los CD4, sí que se encuentran diferencias sugiriendo el papel protector de la inmunidad celular.

La terapia antirretroviral o la quimioprofilaxis secundarias no han sido analizados en el segundo trabajo ya que todos los pacientes estaban recibiendo tratamiento y todos recibieron profilaxis; de todas maneras, el objetivo del estudio fue el analizar la cinética de parásitos como posible factor independiente relacionado con las recidivas.

7 LIMITACIONES

Una de las limitaciones más importantes en los dos estudios es el relativo bajo número de los casos incluidos en el estudio. Este hecho refuerza lo previamente mencionado, que la introducción de TARGA en todos los esquemas terapéuticos ha tenido un verdadero impacto en la reducción de la LV al menos nuestro contexto epidemiológico. A pesar de todo, el primer estudio representa una de las series más largas publicadas donde se evalúa la Amfotericina B Liposomal como quimioprofilaxis secundaria.

Otra limitación común en los dos trabajos fue la dificultad en clasificar correctamente los episodios analizados.

En el primer trabajo fue necesario establecer unos criterios de curación con el fin de evaluar la eficacia de la Amfotericina B Liposomal.

La curación parasitológica por aspiración de médula ósea sólo se documentó en un 57,1% (12/21) de los casos. Por tanto en este caso podría surgir la duda de si los episodios catalogados como recaídas en el grupo de pacientes en los que la cura parasitológica no fue documentado por el aspirado de la médula ósea eran fracasos del tratamiento en lugar de recaídas. En la tabla 2 del trabajo 1 se muestran las características de las recaídas (número de recaídas y el tiempo hasta la recaída) dependiendo de si la cura parasitológica fue documentado por aspiración de médula ósea o no.

Observamos que no hubo diferencias significativas ni en el número de recaídas ni en el tiempo hasta la recaída entre los dos grupos.

A los tres pacientes que tuvieron una recaída y a los que no les realizó el aspirado de médula ósea, la recaída se produjo a los 5, 8 y 37 meses después del primer episodio. Este periodo de latencia fue similar al de los episodios dónde la curación del episodio previo se había confirmado mediante el aspirado de médula ósea. Según nuestro punto de vista, consideramos este periodo de tiempo suficiente, como para pensar que estos nuevos episodios son verdaderamente recaídas en lugar de fracasos del tratamiento del episodio agudo. Además, a pesar de no tener la confirmación de médula ósea en 42'8% (9/21) de los episodios, todos los episodios considerados

curados tenían cultivos de PBMC negativas, y todos los episodios considerados como recidivantes tuvieron cultivos de PBMC positivos. Este último hecho está en plena concordancia con lo previamente publicado por Riera y colaboradores, que demuestra que el hecho de tener parásitos viables en sangre periférica en el periodo de seguimiento post-tratamiento de un episodio de LV, se relaciona con un riesgo aumentado de padecer recaídas (84). Igualmente en el segundo trabajo la documentación parasitológica mediante aspirado de médula ósea sólo se realizó en un 45'9% de los episodios (17 de 37 episodios), pero nuevamente y concordante con los datos del primer trabajo, todos los episodios considerados como no recidivantes, tuvieron cultivos de PBMC negativos.

En el segundo estudio la dificultad la tuvimos al clasificar los episodios como recidivantes o no recidivantes en el momento concreto del análisis de los resultados, ya que no se podría prever como evolucionarían los episodios si tuvieran un mayor tiempo de seguimiento. Por ese motivo, y para evitar errores de interpretación, todos aquellos episodios que en el momento del análisis no tuvieran un tiempo de seguimiento considerado como razonable por parte del grupo de investigadores (que establecimos de manera arbitraria en 18 meses de seguimiento) fueron excluidos del estudio. De todas maneras y teniendo en cuenta las claras diferencias respecto a la cinética del parásito y el tiempo de duración de los distintos episodios en función de la categorización de los eventos como recidivantes y no recidivante (figura 1 y tabla 2 del trabajo 2), consideramos que los episodios pueden considerarse como diferentes

8 CONCLUSIONES

Analizando ambos trabajos que conforman la tesis podemos concluir lo siguiente:

1. Amfotericina B Liposomal es bien tolerada y útil para la profilaxis secundaria de la leishmaniosis visceral en pacientes infectados por VIH. Por lo tanto parece ser una alternativa a los derivados del antimonio en la prevención de nuevas recaídas. Sin embargo también es necesaria una reconstitución inmune para garantizar una respuesta eficaz y duradera.
2. La incorporación de una PCR cuantitativa y ultrasensible de Leishmania en el seguimiento de los pacientes infectados por el VIH que sufren de una leishmaniosis visceral es útil para predecir las recidivas.
3. Si durante el seguimiento del paciente, la carga parasitaria se reduce significativamente durante los tres primeros meses y se mantienen unas buenas condiciones clínicas (Instauración de TARGA, correcto seguimiento de los pacientes), se puede predecir una buena evolución clínica incluso, permitiendo el cese de realizar el seguimiento mediante PCR.
4. Una carga parasitaria igual o superior a 0,5 parásitos/ml 12 meses después del episodio agudo, requiere un seguimiento más estrecho del paciente porque el siguiente episodio febril clínicamente compatible muy probablemente corresponderá a una recaída de la leishmaniosis.
5. Si después de un episodio de leishmaniosis tratado y curado, el paciente tiene dos PCR negativas consecutivo en un período de seis meses, se puede considerar libre de enfermedad con una probabilidad superior al 90% y por tanto se podría considerar la retirada de la profilaxis secundaria.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* enero de 1996;22(1):1-13.
2. OMS | Leishmaniasis [Internet]. WHO. [citado 25 de noviembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5):e35671.
4. Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* abril de 1997;10(2):298-319.
5. López-Vélez R. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Ann Trop Med Parasitol.* octubre de 2003;97 Suppl 1:143-7.
6. Cacopardo B, Nigro L, Preiser W, Famá A, Satariano MI, Braner J, et al. Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-Leishmania co-infected patients despite treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* agosto de 1996;90(4):434-5.
7. Bernier R, Barbeau B, Tremblay MJ, Olivier M. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de marzo de 1998;160(6):2881-8.
8. Bernier R, Turco SJ, Olivier M, Tremblay M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Virol.* noviembre de 1995;69(11):7282-5.
9. Wolday D, Akuffo H, Demissie A, Britton S. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect Immun.* octubre de 1999;67(10):5258-64.
10. Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol Orlando Fla.* octubre de 2004;113(1):81-8.
11. Nigro L, Rizzo ML, Vancheri C, La Rosa R, Mastruzzo C, Tomaselli V, et al. CCR5 and CCR3 expression on T CD3+ lymphocytes from HIV/Leishmania co-infected subjects. *Med Microbiol Immunol (Berl).* diciembre de 2007;196(4):253-5.
12. Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* abril de 1998;58(4):436-43.

13. Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. noviembre de 2003;41(11):5080-4.
14. Zhao C, Thibault S, Messier N, Ouellette M, Papadopoulou B, Tremblay MJ. In primary human monocyte-derived macrophages exposed to Human immunodeficiency virus type 1, does the increased intracellular growth of *Leishmania infantum* rely on its enhanced uptake? *J Gen Virol*. mayo de 2006;87(Pt 5):1295-302.
15. Kedzierska K, Crowe SM. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem*. noviembre de 2002;9(21):1893-903.
16. Barreto-de-Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM, et al. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis*. 15 de septiembre de 2006;194(6):846-54.
17. Van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. abril de 2014;20(4):286-99.
18. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet J-P, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. abril de 2008;21(2):334-59, table of contents.
19. Mira JA, Corzo JE, Rivero A, Macías J, De Leon FL, Torre-Cisneros J, et al. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am J Trop Med Hyg*. marzo de 2004;70(3):298-301.
20. Fernández Cotarelo MJ, Abellán Martínez J, Guerra Vales JM, Martínez Sánchez P, Rodrigo Gómez De La Bárcena M, Salto Fernández E. Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 de octubre de 2003;37(7):973-7.
21. Ribera E, Ocaña I, de Otero J, Cortes E, Gasser I, Pahissa A. Prophylaxis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Med*. mayo de 1996;100(5):496-501.
22. Pasquau F, Ena J, Sanchez R, Cuadrado JM, Amador C, Flores J, et al. Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. junio de 2005;24(6):411-8.
23. Ribera E, Cucurull E, Ocaña I, Vallespí T, Gasser I, Juste C. [Visceral leishmaniasis in patients with HIV infection]. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. febrero de 1995;13(2):73-9.
24. 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 (Baltimore)*. enero de 2001;80(1):54-73.

25. De la Rosa R, Pineda JA, Delgado J, Macías J, Morillas F, Martín-Sánchez J, et al. Influence of highly active antiretroviral therapy on the outcome of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de febrero de 2001;32(4):633-5.
26. De La Rosa R, Pineda JA, Delgado J, Macías J, Morillas F, Mira JA, et al. Incidence of and risk factors for symptomatic visceral leishmaniasis among human immunodeficiency virus type 1-infected patients from Spain in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* marzo de 2002;40(3):762-7.
27. Berenguer J, Cosín J, Miralles P, López JC, Padilla B. Discontinuation of secondary anti-leishmania prophylaxis in HIV-infected patients who have responded to highly active antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl.* 22 de diciembre de 2000;14(18):2946-8.
28. Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999.* 1 de mayo de 2008;48(1):13-9.
29. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis.* agosto de 2014;8(8):e3021.
30. Davidson RN, Di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Russo R, Gaeta GB, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q J Med.* febrero de 1994;87(2):75-81.
31. Laguna F, Videla S, Jiménez-Mejías ME, Sirera G, Torre-Cisneros J, Ribera E, et al. Amphotericin B lipid complex versus meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. *J Antimicrob Chemother.* septiembre de 2003;52(3):464-8.
32. Troya J, Casquero A, Refoyo E, Fernández-Guerrero ML, Górgolas M. Long term failure of miltefosine in the treatment of refractory visceral leishmaniasis in AIDS patients. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(1):78-80.
33. Rybniker J, Goede V, Mertens J, Ortmann M, Kulas W, Kochanek M, et al. Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure--a case report and brief review of the literature. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* junio de 2010;14(6):e522-5.
34. Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* marzo de 2001;20(3):202-5.
35. Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* junio de 2011;5(6):e1153.
36. Villanueva JL, Alarcón A, Bernabeu-Wittel M, Cordero E, Prados D, Regordán C, et al. Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* octubre de 2000;19(10):798-801.

37. Jiménez-Expósito MJ, Alonso-Villaverde C, Sardà P, Masana L. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients with non-detectable HIV-1 viral load after highly active antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl*. 14 de enero de 1999;13(1):152-3.
38. López-Vélez R, Videla S, Márquez M, Boix V, Jiménez-Mejías ME, Górgolas M, et al. Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. marzo de 2004;53(3):540-3.
39. Angarano G, Maggi P, Coppola SL, Cavaliere RL. Itraconazole as maintenance therapy for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. mayo de 1998;17(5):365-7.
40. Lafeuillade A, Chaffanjon P, Delbeke E, Quilichini R. Maintenance itraconazole for visceral leishmaniasis in HIV infection. *Am J Med*. abril de 1992;92(4):449.
41. Raffi F, Merrien D, Le Pape P, Reliquet V. Use of an Itraconazole/allopurinol combination for the treatment of visceral leishmaniasis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. noviembre de 1995;21(5):1338-9.
42. Torrús D, Boix V, Massa B, Portilla J, Pérez-Mateo M. Fluconazole plus allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. mayo de 1996;37(5):1042-3.
43. Derouin F, Gangneux JP. Changing patterns of disease and treatment of opportunistic parasitic infections in patients with AIDS. *Curr Opin Infect Dis*. diciembre de 1998;11(6):711-6.
44. Pérez-Molina JA, López-Vélez R, Montilla P, Guerrero A. Pentamidine isethionate as secondary prophylaxis against visceral leishmaniasis in HIV-positive patients. *AIDS Lond Engl*. febrero de 1996;10(2):237-8.
45. Hamour AA, Skelly R, Jowitt SN, Wilson GE, Curry A, Wilkins EG, et al. Visceral leishmaniasis (Kala-azar) in two patients with HIV-1 infection: atypical features and response to therapy. *J Infect*. marzo de 1998;36(2):217-20.
46. Laguna F, Agrados M, Alvar J, Soriano V, Valencia ME, Moreno V, et al. Visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. diciembre de 1997;16(12):898-903.
47. Mastroianni CM, d' Ettore G, Forcina G, Corpolongo A, Dell'Isola S, Lichtner M, et al. Long-term remission of human immunodeficiency virus-associated visceral leishmaniasis after initiation of potent combination antiretroviral treatment: report of two cases. *J Infect*. enero de 2000;40(1):94-6.
48. Borrelli P, Imperato A, Murdaca G, Scudeletti M. Liposomal amphotericin B as first line and secondary prophylactic treatment for visceral leishmaniasis in a patient infected with HIV. *Ann Ital Med Interna Organo Uff Della Soc Ital Med Interna*. junio de 2000;15(2):169-71.
49. Murdaca G, Setti M, Campelli A, Ghio M, Puppo F, Indiveri F. [Liposomal Amphotericin B for treatment of acute phase and secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in a

- HIV positive patient]. *Infez Med Riv Period Eziologia Epidemiol Diagn Clin E Ter Delle Patol Infett.* 2000;8(4):241-4.
50. Orlando G, Del Sorbo F, Corbellino M, Schiavini M, Cargnel A. Secondary prophylaxis for Leishmania infection in an HIV-positive patient. *AIDS Lond Engl.* 22 de octubre de 1998;12(15):2086-7.
 51. Lopez Dupla M, Gil Aguado A, Lavilla Uriol P, Pintado Garcia V, Valencia Ortega E, Martinez Martinez P, et al. Efficacy of liposomal amphotericin B in the treatment and secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV infected patients: report of two cases. *J Antimicrob Chemother.* octubre de 1993;32(4):657-9.
 52. Montana M, Chochoi N, Monges P, Ravaux I, Faraut F, Gensollen S, et al. [Liposomal amphotericin B in secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: report of five clinical cases]. *Pathol Biol (Paris).* marzo de 2004;52(2):66-75.
 53. Lazanas MC, Tsekas GA, Papandreou S, Harhalakis N, Scandali A, Nikiforakis E, et al. Liposomal amphotericin B for leishmaniasis treatment of AIDS patients unresponsive to antimony compounds. *AIDS Lond Engl.* julio de 1993;7(7):1018-9.
 54. McBride M, Linney M, Claydon EJ, Weber J. Visceral leishmaniasis following treatment with liposomal amphotericin B. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* agosto de 1994;19(2):362.
 55. Barratt G, Legrand P. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* diciembre de 2005;18(6):527-30.
 56. Marques N, Sá R, Coelho F, Oliveira J, Saraiva Da Cunha J, Meliço-Silvestre A. Miltefosine for visceral leishmaniasis relapse treatment and secondary prophylaxis in HIV-infected patients. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(6-7):523-6.
 57. Patel TA, Lockwood DN. Pentamidine as secondary prophylaxis for visceral leishmaniasis in the immunocompromised host: report of four cases. *Trop Med Int Health TM IH.* septiembre de 2009;14(9):1064-70.
 58. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010.
 59. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* octubre de 1992;86(5):505-7.
 60. Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(1):66-8.
 61. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* septiembre de 2002;9(5):951-8.
 62. Medrano FJ, Cañavate C, Leal M, Rey C, Lissen E, Alvar J. The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. *Am J Trop Med Hyg.* julio de 1998;59(1):155-62.

63. Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;6:CD009135.
64. Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras M-C, et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* julio de 2006;44(7):2343-7.
65. Vilaplana C, Blanco S, Domínguez J, Giménez M, Ausina V, TUrál C, et al. Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. *J Clin Microbiol.* abril de 2004;42(4):1853-4.
66. Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, et al. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* diciembre de 2004;23(12):899-904.
67. Monno R, Giannelli G, Rizzo C, De Vito D, Fumarola L. Recombinant K39 immunochromatographic test for diagnosis of human leishmaniasis. *Future Microbiol.* marzo de 2009;4(2):159-70.
68. Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, et al. 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. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de junio de 2007;44(12):1602-10.
69. Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol.* mayo de 1995;33(5):1145-9.
70. Piarroux R, Gambarelli F, Toga B, Dumon H, Fontes M, Dunan S, et al. Interest and reliability of a polymerase chain reaction on bone-marrow samples in the diagnosis of visceral leishmaniasis in AIDS. *AIDS Lond Engl.* abril de 1996;10(4):452-3.
71. Costa JM, Durand R, Deniau M, Rivollet D, Izri M, Houin R, et al. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol.* julio de 1996;34(7):1831-3.
72. Campino L, Cortes S, Pires R, Oskam L, Abranches P. Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* mayo de 2000;19(5):396-8.
73. Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol.* enero de 2001;39(1):357-61.
74. Fisa R, Riera C, Ribera E, Gállego M, Portús M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* abril de 2002;96 Suppl 1:S191-4.

75. Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* abril de 2002;96 Suppl 1:S185-9.
76. Martín-Sánchez J, Pineda JA, Andreu-Lopez M, Delgado J, Macías J, De La Rosa R, et al. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Ann Trop Med Parasitol.* octubre de 2002;96(7):669-77.
77. Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol.* octubre de 2003;97 Suppl 1:115-33.
78. Fissore C, Delaunay P, Ferrua B, Rosenthal E, Del Giudice P, Aufeuve J-P, et al. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol.* noviembre de 2004;42(11):5332-3.
79. Gatti S, Gramegna M, Klersy C, Madama S, Bruno A, Maserati R, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: the sensitivities and specificities of traditional methods and a nested PCR assay. *Ann Trop Med Parasitol.* octubre de 2004;98(7):667-76.
80. Fisa R, Riera C, López-Chejade P, Molina I, Gállego M, Falcó V, et al. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *Am J Trop Med Hyg.* mayo de 2008;78(5):741-4.
81. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol.* enero de 2000;38(1):236-40.
82. Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, et al. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg.* julio de 2009;81(1):46-51.
83. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol.* noviembre de 2004;42(11):5249-55.
84. Riera C, Fisa R, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Gállego M, et al. Value of culture and nested polymerase chain reaction of blood in the prediction of relapses in patients co-infected with leishmania and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* diciembre de 2005;73(6):1012-5.
85. Mary C, Faraut F, Drogoul M-P, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg.* noviembre de 2006;75(5):858-63.
86. Gutiérrez J, Maroto MC, Piédrola G, Higuera A. [Prevalence of anti-*Leishmania* antibodies in parenteral drug addicts. Yield value of 2 study techniques]. *Med Clínica.* 6 de febrero de 1993;100(5):168-70.

87. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez M, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion (Paris)*. julio de 2008;48(7):1383-9.
88. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. febrero de 2004;98(2):102-10.
89. García-García JA, Martín-Sánchez J, Gállego M, Rivero-Román A, Camacho A, Riera C, et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol*. diciembre de 2006;44(12):4455-8.
90. Raffi F, Merrien D, Le Pape P, Reliquet V. Use of an Itraconazole/allopurinol combination for the treatment of visceral leishmaniasis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. noviembre de 1995;21(5):1338-9.
91. Orlando G, Del Sorbo F, Corbellino M, Schiavini M, Cargnel A. Secondary prophylaxis for *Leishmania* infection in an HIV-positive patient. *AIDS Lond Engl*. 22 de octubre de 1998;12(15):2086-7.
92. Murray HW, Oca MJ, Granger AM, Schreiber RD. Requirement for T cells and effect of lymphokines in successful chemotherapy for an intracellular infection. *Experimental visceral leishmaniasis*. *J Clin Invest*. abril de 1989;83(4):1253-7.
93. Murray HW, Hariprashad J, Fichtl RE. Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T-cell-deficient host: response to amphotericin B and pentamidine. *Antimicrob Agents Chemother*. julio de 1993;37(7):1504-5.
94. Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob Agents Chemother*. junio de 2001;45(6):1872-5.
95. Ter Horst R, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A, Davidson RN. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 de junio de 2008;46(11):1702-9.
96. Berman J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res*. marzo de 2006;123(3):289-94.
97. Carrió J, Riera C. In vitro susceptibility of *Leishmania* strains isolated from HIV coinfecting patients to liposomal amphotericin B and pentavalent antimony (oral communication). In: Programme of the Third World Congress on Leishmaniasis, Palermo, Sicily, 2005, p. 128 [Internet]. [citado 21 de noviembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Carri%C3%B3+J%2C+Riera+C%2C+Ribera+E>
98. Lachaud L, Bourgeois N, Plourde M, Leprohon P, Bastien P, Ouellette M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de enero de 2009;48(2):e16-22.

99. Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, Lachaud L. «Active chronic visceral leishmaniasis» in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med.* noviembre de 2010;11(10):670-3.
100. Colomba C, Saporito L, Vitale F, Reale S, Vitale G, Casuccio A, et al. Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. *BMC Infect Dis.* 2009;9:199.
101. Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F, et al. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis.* 15 de mayo de 2002;185(10):1533-7.
102. Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1 de mayo de 2008;48(1):13-9.

10 ANEXO

Leishmania infantum DNA Detection in Urine from Patients with Visceral Leishmaniasis and after Treatment Control

Roser Fisa,* Cristina Riera, Paulo López-Chejade, Israel Molina, Montserrat Gállego, Vicenç Falcó, Esteban Ribera, and Montserrat Portús

Laboratory of Parasitology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract. A urine–polymerase chain reaction (PCR) assay was validated for diagnosis of human visceral leishmaniasis (VL), taking advantage of the accessibility of urine samples. *Leishmania infantum* DNA presence was examined in 17 urine samples from 17 patients with VL during a clinical episode and in 55 urine samples from 17 patients with VL monitored after treatment at different intervals. Fifty-nine urine samples from 59 controls with no history of VL were also studied. The urine–PCR test was positive in 15/17 samples obtained during the episode (sensitivity, 88%). None of the controls tested were urine–PCR positive (specificity, 100%). During the monitoring period, 25% of the samples gave a positive urine–PCR. Results were compared with other diagnostic methods, such as urine antigen detection and peripheral blood–PCR and culture, with good concordance during the clinical episode and differences in the follow-up period. This study suggests that urine–PCR is sensitive for diagnosis and may be useful to monitor treatment efficacy.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania infantum* in southern Europe, where it is often associated with human immunodeficiency virus (HIV).¹ In this geographic area, it is estimated that 1.5–9% of patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) will develop leishmaniasis.² HIV–*Leishmania* co-infected patients present a high percentage of relapses after treatment,² which highlights the need to use non-invasive samples for diagnosis and monitoring. Because VL is a fatal disease unless it is treated, a rapid and accurate diagnosis is important.

Serologic tests have a high diagnostic value in immunocompetent patients, but their value is limited in HIV-infected patients, whose humoral immune response may be weak or non-existent. Also, serologic tests have a low value in the evaluation of the treatment because they remain positive for a period of some months to some years after clinical cure.^{1,2} Microscopic examination and culture of bone marrow, lymph node, and spleen aspiration are the conventional diagnostic procedures. Molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR) have been described as good alternatives that increase sensitivity, allowing the use of non-invasive samples such as peripheral blood.^{3–5} Other body fluids like urine and nasal and tonsillopharyngeal secretions have been cited as samples where amastigotes could be present.⁶ Detection of viable amastigotes by successful culture in the urine of patients with VL⁶ and the visualization of amastigotes or DNA detection of the parasite in urine from infected dogs^{7,8} have been reported. Additionally, the presence of *Leishmania*-derived antigens in human urine has been cited repeatedly.^{9–12} This study sought to evaluate the usefulness of urine in a PCR-based test for diagnosis and monitoring of VL.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and samples. One hundred thirty-one urine samples from 87 individuals were included in the study. Sev-

enty-two of the urine samples were from 28 adult patients with VL, 24 of whom were *Leishmania*–HIV co-infected, and had attended the Hospital Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). Seventeen samples were obtained from 17 patients (16 HIV+) during a VL clinical episode, and 55 samples were obtained from 17 patients (13 HIV+, 48 samples) during the asymptomatic monitoring period after treatment that lasted from 1 month to 3 years. Patients were treated with pentavalent antimonials or lipid formulation of amphotericin B, and immunocompromised patients were maintained with chemoprophylaxis. Fifty-nine urine samples from 59 adult controls (16 HIV+ patients and 43 healthy people), all of them from endemic areas of leishmaniasis and without a history of VL, were also studied.

Blood samples were obtained simultaneously with the urine sample from patients with VL and from the control group of HIV+ patients without a VL history. The VL episode was diagnosed on the basis of clinical symptoms and confirmed by detection of *Leishmania* in bone marrow aspirates by microscopic examination and/or culture. All patients gave their signed, informed consent for participation in this study.

Collection of samples and methods. Samples of urine were collected and stored under refrigeration (4°C) within 2 days of collection or frozen to –40°C until use and thawed at room temperature for PCR analysis and antigen detection. Urine (10 mL) was centrifuged at 15,000g in sterile tubes for 10 minutes, the supernatant was discarded, the pellet was washed twice in sterile phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged again, and the final pellet was resuspended in 0.5 mL of PBS. DNA was extracted from 0.2 mL of sediment with the High Pure PCR Template kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and frozen at –20°C until PCR was performed. One milliliter of refrigerated urine was tested for *Leishmania* antigen detection by KAtex (ADU), following the instructions of the manufacturer (Kalon Biologic, Aldershot, UK).

Samples of blood were collected into EDTA tubes for PCR analysis and culture. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 9 mL of peripheral blood by the Ficoll-Paque Plus procedure (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The PBMC pellet was washed twice in sterile PBS and resuspended in 0.6 mL of sterile PBS; 0.2 mL of

* Address correspondence to Roser Fisa, Laboratory of Parasitology, Faculty of Medicine, Avda Joan XXIII sn, Barcelona, Spain 08028. E-mail: rfisa@ub.edu

PBMC suspension was used for DNA extraction with the High Pure PCR Template kit for PCR analysis, and the remaining 0.4 mL was inoculated into NNN medium and Schneider media for *in vitro* cultivation.¹³ Cultures were maintained at 24–26°C, examined twice a week, and sub-cultured before being considered negative after a minimum of 3 months.

DNA amplification. DNA extracts were subjected to amplification of a genetic region with specific *L. infantum* oligonucleotide primers in a nested PCR, with the pair of primers Ext-E2b and P1-P2 previously described.⁵ The PCRs were carried out in duplicate in a total volume of 20 µL with 1× PCR buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, and 0.01% gelatin), 1.5 mmol/L MgCl₂, 100 µmol/L of each deoxynucleotide triphosphate, 0.2 µmol/L of each primer, and 1 unit of RedTaq polymerase (Sigma, St. Louis, MO). Three microliters of DNA extract was used for the first PCR, which amplifies a 145-bp amplicon, and 2 µL of the amplified product was used for the second. The PCR program was run on an MJ Research thermocycler at 96°C for 5 minutes, 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 59°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, followed by 5 minutes at 72°C for both amplifications. To avoid cross-contamination and sample carryover, pre- and post-PCR sample processing and PCR amplification were performed in separate rooms, and plugged pipette tips were used for all fluid transfers. The amplification profile consisted of 100-bp product, which was visualized on a 3% agarose gel by ultraviolet transillumination after staining with ethidium bromide.

Statistical analysis. Between-test agreement was determined by the concordance coefficient, measured by the Cohen κ statistic ($\kappa > 0.75$ substantial agreement; $\kappa = 0.4$ –0.75, fair to good agreement; $\kappa < 0.40$, poor agreement).^{14,15}

RESULTS

Detection of *L. infantum* DNA in the 17 urine samples tested from patients with VL (16 HIV+ and 1 HIV-) during the clinical episode yielded 15 positive results. Negative urine-PCR results obtained corresponded to two HIV+ patients, one patient with demonstrable presence of *Leishmania* in blood by PCR and culture and a positive ADU, and the other with negative blood-PCR and culture and a positive ADU. No false-positive results were observed among the 16 control HIV+ patients without a history of VL and the 43 healthy controls (Table 1). Results of urine-PCR during the VL clinical episode were similar in terms of sensitivity to those yielded by PCR in blood samples, blood culture, and ADU (Tables 1 and 2), with a positive predictive value of 100%.

Urine-PCR detected *Leishmania* DNA in 14 of the 55 urine samples obtained, at different times, during the asymp-

TABLE 2

Contingency table of results obtained with urine-PCR versus ADU, blood-PCR, and blood culture in samples from 17 patients with VL obtained during the clinical episode

	ADU		Blood-PCR		Blood culture		
	+	-	+	-	+	-	
Urine-PCR	+	13	2	15	0	14	1
	-	2	0	1	1	1	1

tomatic post-treatment control period (Tables 1 and 3). Those positive samples corresponded to six *Leishmania*-HIV co-infected patients with intermittent positive results in urine-PCR (14/31 urine samples), as well as in other analytical techniques carried out (ADU, 20/31; blood-PCR, 23/31; blood culture, 12/31). Evidence of a clinical episode, after the controlled asymptomatic period, was observed in three such patients. Another patient who also relapsed had repeated negative urine-PCR results, despite having positive ADUs and intermittent positive blood-PCRs and cultures.

During the post-treatment period, urine-PCR yielded lower sensitivity than ADU and blood-PCR (McNemar test, $P < 0.05$), and the agreement between techniques was poor. The coefficient of concordance between urine-PCR and ADU was $\kappa = 0.30$ (95% confidence interval, 0–0.58) and with blood-PCR was $\kappa = 0.22$ (95% confidence interval, 0–0.56). *Leishmania* DNA detection in urine yielded a similar sensitivity to that of blood culture (McNemar test, $P > 0.05$), with a coefficient of concordance between techniques of $\kappa = 0.52$ (95% confidence interval, 0.26–0.78; Table 3).

DISCUSSION

The application of PCR techniques for diagnosis of VL has meant an improvement in the diagnosis and post-treatment control of this disease, because it obviates the need to use invasive samples such as bone marrow, lymph node, or spleen aspirates. Blood-PCR has been extensively used for VL diagnosis, with a range of sensitivities of 55–100%.^{5,16,17}

In this work, we studied the presence of *Leishmania* DNA in the urine of patients with VL for diagnosis purposes. We used a PCR technique based on the amplification of an *L. infantum* genomic DNA sequence of 100 bp previously proven effective for VL diagnosis in blood⁵ and other biologic samples.¹⁸ Urine-PCR has proven to be a sensitive technique for diagnosis of VL during the acute phase of disease, similar to ADU, blood-PCR, and blood culture, mainly in HIV+ patients, who are the principal patient population in South Europe.¹ Antigen and DNA detection in urine was discordant in four cases, despite their showing the same sensitivity, and

TABLE 1
Urine-PCR results from 131 urine samples from patients with VL and controls

Group	Urine		Blood	
	PCR	ADU	PCR	Culture
VL clinical episode	15/17 (88%)	15/17 (88%)	16/17 (94%)	15/17 (88%)
VL post-treatment	14/55 (25%)	24/55 (44%)	37/55 (67%)	14/55 (25%)
HIV+ controls	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)
Healthy controls	0/43 (0%)	0/43 (0%)	ND	ND

Comparison with results from ADU, blood-PCR, and blood culture.
ND, not done.

TABLE 3

Contingency table of results obtained with urine-PCR versus ADU, blood-PCR, and blood culture from the patients with VL obtained during the monitoring period after treatment

		Monitoring period					
		ADU		Blood-PCR		Blood culture	
		+	-	+	-	+	-
Urine-PCR	+	10	4	13	1	9	5
	-	14	27	24	17	5	36

both tests were complementary, because all VL episodes could be diagnosed when urine was used as a sample, using either procedure, which reflects their different target nature. DNA in urine was, in all cases, accompanied by DNA in blood.

The presence of *Leishmania* DNA in urine may be the consequence of the passage of DNA through the glomerular barrier caused by renal lesions, common in VL, and the parasite's presence in the urinary tract.¹⁹⁻²¹ Tubulointerstitial involvement and glomerulonephritis are the main causes of the proteinuria that is present in most patients with a clinical episode of leishmaniasis, and the presence of *Leishmania*-specific IgG in the urine of dogs with leishmaniasis has also been attributed to an impairment of filtration of the glomerular barrier and, to a lesser extent, the local antibody production in the urinary tract.²² Fragments of postapoptotic DNA of 150-200 bp from cells dying throughout the body may cross the kidney barrier and appear in urine in the form of transrenal DNA.^{23,24} It is thus to be expected that fragments of *Leishmania* DNA containing the 100-bp sequence that was amplified by nested PCR were present in urine when the parasite was present in blood. The scarce false-negative urine-PCR results obtained in our patients during their VL clinical episode could be explained by a low parasite rate in blood; this was presumably the reason in one patient in which blood-PCR and culture were also negative. Other reasons may be the incapacity of the *Leishmania* DNA to cross the kidney barrier and appear in urine or technical problems during urine collection, preservation, DNA extraction, or amplification, which was impossible to confirm.

The low parasitic loads present in asymptomatic patients during post-treatment and a secondary chemoprophylaxis control period entails a decrease of positive results when using different diagnostic techniques. High sensitive techniques such as blood-PCR yield more positive results than culture when parasitemia is low.^{5,13,25} In our patients, this was reflected in a low agreement between tests, and DNA detection in urine was less sensitive than ADU and DNA detection in blood after treatment.

Studies performed on patients with VL during their post-treatment control period,^{5,13} and cryptic leishmaniasis in blood donors from endemic areas,^{26,27} reported a low number of blood culture positives as a consequence of the low number of parasites in blood, because cultures initiated with low *inoculum*s fail to promote cell growth.²⁸ This was consistent with our results on DNA detection in urine as urine-PCR and blood culture, in samples obtained during the asymptomatic after treatment period had similar sensitivity, and both techniques yield the highest agreement coefficient ($\kappa = 0.49$; 95% confidence interval, 0.23-0.75).

Our results indicate that *Leishmania* DNA is present in

urine during the active phases of the disease or when a high parasitic load is present and its tendency to clearance after treatment when parasitic loads decrease and renal function improves. Studies on *Leishmania*-HIV co-infected patients during the post-treatment control period showed that a positive ADU or blood-PCR is not associated with a risk of clinical relapse that is otherwise related with a positive blood culture.¹³ Nevertheless, further studies are needed to better characterize the use of urine PCR in the diagnosis of VL in HIV- patients as well as in the post-treatment follow-up in both HIV+ and HIV- patients with VL and to relate results with the disease evolution and prognosis. The feasibility to work with two easy-to-obtain samples, such as blood and urine, reduces the need for traumatic bone marrow and risky spleen aspiration sampling for the diagnosis and post-treatment control of VL.

Received July 19, 2007. Accepted for publication November 20, 2007.

Acknowledgments: The authors thank S. Tebar for excellent technical assistance and R. Rycroft for English revision of the manuscript.

Financial support: This study was partially supported by Grant ACES 2006 Universitat of Barcelona.

Authors' addresses: Roser Fisa, Cristina Riera, Paulo López-Chejade, Montserrat Gállego, and Montserrat Portús, Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Universitat de Barcelona, Avda Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, Spain, Telephone: 34-93-4024502, Fax: 34-93-4024504. Israel Molina, Vicenç Falcó, and Esteban Ribera, Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Pascig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain, Telephone: 34-93-2746090.

REFERENCES

- Desjeux P, Alvar J, 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 3-15.
- Alvar J, Cañavate C, Gutierrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J, 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10: 298-319.
- Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, Basu D, De Bruijn MH, Adhya S, Mallik KK, Barker DC, 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology* 105: 183-192.
- Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalomogna C, Calattini S, Corsico L, Persico T, Adriani B, Magni C, Guaraldi G, Gaiera G, Ludovisi A, Gramiccia M, Galli M, Moroni M, Corbellino M, Antinori S, 2001. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 39: 357-361.
- Fisa R, Riera C, Ribera E, Gállego M, Portús M, 2002. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: S191-S194.
- Mebratu YB, Hendricks LD, Oster CN, Lawyer PG, Perkins PV, Pamba H, Koech D, Roberts CR, 1993. *Leishmania donovani* parasites in the nasal secretions, tonsillopharyngeal mucosa, and urine centrifugates of visceral leishmaniasis patients in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 48: 530-535.
- Riera C, Valladares JE, 1996. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today* 12: 412.
- Solano-Gállego L, Rodríguez-Cortés A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J, 2007. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 147: 315-319.
- De Colmenares M, Portús M, Riera C, Gállego M, Aisa MJ, Torras S, Muñoz C, 1995. Short report: detection of 72-75-kD

- and 123-kD fractions of *Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 52: 427–428.
10. Kohanteb J, Ardehali SM, Rezai HR, 1987. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 578–580.
 11. Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, Dourado C, Hommel M, 2001. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 78: 11–16.
 12. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Molina I, Gállego M, Portús M, 2004. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 899–904.
 13. Riera C, Fisa R, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Gállego M, Moner L, Molina I, Portús M, 2005. Value of culture and nested polymerase chain reaction of blood in the prediction of relapses in patients co-infected with *Leishmania* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg* 73: 1012–1015.
 14. Giovannelli L, Lama A, Capra G, Giordano V, Arico P, Ammatuna P, 2004. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMV-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 42: 3861–3864.
 15. Cohen J, 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 20: 37–46.
 16. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, Dedet JP, Bastien P, 2000. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 38: 236–240.
 17. Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, Bossi L, Germagnoli L, Lazzarin A, Uberti-Foppa C, Cinque P, 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 41: 5080–5084. Erratum in *J Clin Microbiol* 42: 1858.
 18. Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M, 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99: 105–111.
 19. Caravaca F, Munoz A, Pizarro JL, Saez de Santamaria J, Fernandez-Alonso J, 1991. Acute renal failure in visceral leishmaniasis. *Am J Nephrol* 11: 350–352.
 20. Dutra M, Martinelli R, de Carvalho EM, Rodrigues LE, Brito E, Rocha H, 1985. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am J Kidney Dis* 6: 22–27.
 21. Salgado Filho N, Ferreira TM, Costa JM, 2003. [Involvement of the renal function in patients with visceral leishmaniasis (kala-azar)]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 217–221.
 22. Solano-Gallego L, Rodriguez A, Iniesta L, Arboix M, Portús M, Alberola J, 2003. Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 849–855.
 23. Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR, 2006. Novel applications of polymerase chain reaction to urinary nucleic acid analysis. *Methods Mol Bio* 336: 145–154.
 24. Umansky SR, Tomei LD, 2006. Transrenal DNA testing: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Diagn* 6: 153–163.
 25. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H, 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 42: 5249–5255.
 26. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portús M, 2004. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 102–110.
 27. Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J, 1999. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *J Clin Microbiol* 37: 1953–1957.
 28. Lemesre L, Darcy F, Kweider M, Capron A, Santero F, 1988. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Acta Trop* 45: 99–108.