

Panorama das novas tecnologias no diagnóstico da Leishmaniose Visceral em vigência de coinfeção com o vírus HIV: uma revisão integrativa da literatura

Overview of new technologies in the diagnosis of visceral leishmaniasis in the presence of coinfection with the HIV virus: an integrative literature review

DOI:10.34117/bjdv9n4-098

Recebimento dos originais: 17/03/2023

Aceitação para publicação: 18/04/2023

Tiago Tacaci

Graduando em Medicina

Instituição: Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Endereço: R. José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, Pres. Prudente - SP,

CEP: 19050-920

E-mail: tiagotacaci@gmail.com

Rodrigo Sala Ferro

Doutor em infectologia

Instituição: Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Endereço: R. Cincinato Baptista de Souza, 51, Condomínio Portinari

E-mail: rodrigosalaferrero@hotmail.com

Vomer Silva

Graduado em Medicina

Instituição: Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Endereço: Rua 546, Nº 50, Santa Cruz, Catalão - GO

E-mail: silva.vomer@gmail.com

Héctor Hugo Queiroz França

Graduando em Medicina

Instituição: Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Endereço: R. José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, Pres. Prudente - SP,

CEP: 19050-920

E-mail: hectorhugoqf@hotmail.com

Bernardo Pereira Silva

Graduando em medicina

Instituição: Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Endereço: Alameda Ana Maia Eugênio 608, Damha 1, Presidente Prudente - SP

E-mail: bernardinho44@gmail.com

RESUMO

Contextualização: As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) ocorrem em condições de clima tropical e subtropical e estão intimamente ligadas à pobreza, prosperando em áreas onde o acesso ao saneamento básico, água potável e cuidados de saúde é limitado. A leishmaniose encontra-se na atual lista das 20 DTNs definidas pela OMS. Falhas

recorrentes no diagnóstico da LVH, muitas vezes associadas às abordagens convencionais são determinantes para os desfechos de morbimortalidade. Justificativa: Ressalta-se a importância da avaliação científica e criteriosa a respeito das novas metodologias diagnósticas de precisão, para que sejam tomadas medidas terapêuticas eficazes visando mitigar os efeitos da evolução da leishmaniose visceral humana (LVH), sobretudo nos pacientes coinfectados pelo vírus HIV (LVH-HIV). Objetivo: Discutir as recentes tecnologias de precisão diagnóstica em LVH, na situação de coinfeção o HIV. Metodologia: A revisão integrativa foi conduzida conforme parâmetros metodológicos previamente estabelecidos, obedecendo etapas rigorosas de confecção. Estas fases são essenciais na identificação do tema de pesquisa, formulação dos critérios de inclusão, extração de dados oriundos dos estudos incluídos, análise metodológica destes, além da interpretação de resultados e síntese descritiva. Resultados: Após a busca e seleção de estudos nas bases de dados eletrônicas: Pubmed/Medline e Embase, avaliamos 201 estudos, delimitando 13 destes como pertinentes exclusivamente aos critérios de inclusão. O conjunto avaliado indica avanço promissor em áreas como: Proteômica, imunoproteômica, processos moleculares avançados, nanodiagnóstico e citometria de fluxo. Conclusão: O diagnóstico preciso e oportuno da condição LVH-HIV desempenha papel crucial na identificação de pacientes, inclusive assintomáticos e subclínicos. As novas metodologias diagnósticas de precisão surgem como opções revolucionárias e merecem investigações científicas futuras para se recomendar a melhor conduta baseada em evidências, fornecendo ao paciente melhores desfechos em morbimortalidade.

Palavras-chave: Leishmaniasis, visceral, *Visceral leishmaniasis*, *Human immunodeficiency virus*, HIV, diagnosis.

ABSTRACT

Background: Neglected tropical diseases (NTDs) occur in tropical and subtropical climate conditions and are closely linked to poverty, thriving in areas where access to basic sanitation, clean water and health care is limited. Leishmaniasis is on the current list of 20 NTDs defined by the WHO. Recurrent failures in the diagnosis of VL, often associated with conventional approaches, are determinant for the outcomes of morbidity and mortality. Justification: We emphasize the importance of scientific and careful evaluation regarding the new precision diagnostic methodologies, so that effective therapeutic measures are taken to mitigate the effects of the evolution of human visceral leishmaniasis (VL), especially in patients coinfecting with the HIV virus (VL-HIV). Objective: To discuss the recent technologies of diagnostic accuracy in VL, in the situation of HIV coinfection. Methodology: The integrative review was conducted according to previously established methodological parameters, following strict manufacturing steps. These phases are essential in identifying the research topic, formulating inclusion criteria, extracting data from the included studies, methodological analysis of these, in addition to the interpretation of results and descriptive synthesis. Results: After searching and selecting studies in the electronic databases: Pubmed/Medline and Embase, we evaluated 201 studies, delimiting 13 of them as exclusively relevant to the inclusion criteria. The evaluated set indicates promising progress in areas such as: proteomics, immunoproteomics, advanced molecular processes, nanodiagnosics and flow cytometry. Conclusion: The accurate and timely diagnosis of the VL-HIV condition plays a crucial role in the identification of patients, including asymptomatic and subclinical ones. The new precision diagnostic methodologies emerge as revolutionary options and deserve future scientific investigations to recommend the best evidence-based management, providing the patient with better outcomes in morbidity and mortality.

Keywords: Leishmaniasis, visceral, *Visceral leishmaniasis*, *Human immunodeficiency virus*, HIV, diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O agente etiológico da leishmaniose visceral humana (LVH) é um protozoário da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, destacando-se as espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*.¹ A transmissão ao ser humano ocorre primordialmente após a inoculação de parasitos realizada por insetos hematófagos, neste caso, um vetor popularmente conhecido como mosquito-palha, birigui ou tatuquira. A transfusão de sangue, o uso de drogas intravenosas, o transplante de órgãos, os acidentes congênitos e laboratoriais constituem as modalidades de transmissão excepcionais.²

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs), são um grupo de doenças que ocorrem em condições de clima tropical e subtropical e estão intimamente ligadas à pobreza, prosperando em áreas onde o acesso ao saneamento básico, água potável e cuidados de saúde é limitado. A leishmaniose encontra-se na atual lista das 20 DTNs definidas pela OMS.⁹

As DTNs afetam algumas das comunidades mais pobres e marginalizadas do mundo, predominantemente na África, Ásia e Américas.^{9,10} As respectivas populações apresentam frequente exposição aos animais e vetores de doenças infecciosas, tanto em áreas remotas, rurais, assentamentos informais ou zonas de conflito, quanto em áreas urbanas.^{11,12}

O Brasil está entre os países com maior incidência de LVH no mundo, em 2019 registrou 97% de todos os casos nas Américas.⁹ A região Nordeste do Brasil continua sendo a região com maior taxa de notificação de LVH, em virtude da vulnerabilidade social e más condições de vida.¹⁷⁻¹⁹

A letalidade da LVH no Brasil é a maior do mundo, com média de 7%, e mais de 15% em algumas regiões,²⁰ com estudo retrospectivo recente, referente ao período de 2007-2018, relatando mortalidade por LVH de 7,8%.²¹

A coinfeção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da leishmaniose visceral humana (LVH) – LVH-HIV – é um problema emergente em todo o mundo, com incidência alta ou crescente relatada na Etiópia, Brasil e Índia.^{1,22} Pode-se observar

sobreposição entre as áreas de transmissão da LVH e do HIV, sendo a coinfeção LVH-HIV relatada em 35 países endêmicos.⁹

Junto a conjuntura das DTNs integra-se o conceito de saúde pública de precisão, o qual refere-se à aplicação de métodos e tecnologias na avaliação de doenças, patógenos, comportamentos e suscetibilidade, bem como o desenvolvimento de políticas e programas de implementação direcionados.^{29,30} Dentre as novas tecnologias de precisão observam-se a genômica e a biologia molecular avançada, as quais ampliam as possibilidades de pesquisa e desenvolvimento, também no contexto da LVH.³¹

1.2 DIVERSIDADE CLÍNICA

Clinicamente, Leishmaniose é diferenciada em quatro categorias principais, a saber: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose visceral humana (LVH) e leishmaniose dérmica pós-kalazar (LDPK). As manifestações clínicas diferem na topografia e gravidade do quadro, entre estas a LVH é a condição mais ameaçadora a vida, particularmente na vigência de coinfeção com HIV.⁴

1.3 LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Os determinantes da progressão da LVH incluem a virulência do parasito e a resposta imune do hospedeiro,³² onde o controle da infecção é baseado na ativação de macrófagos do hospedeiro e no desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1, baseada na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon-gama (IFN- γ), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), entre outros, além de altos níveis de nitrito antileishmania e anticorpos específicos do isotipo IgG2a.³³

Clinicamente, a LVH caracteriza-se pela tríade: esplenomegalia, febre e palidez cutaneomucosa. A doença, em sua típica apresentação, tem período de incubação prolongado (2 a 8 meses), instalando-se progressivamente. O período inicial pode ser insidioso, marcado por febre baixa, perda do apetite, astenia e palidez progressiva, com possível esplenomegalia discreta. No período de estado, verifica-se persistência da febre, com instalação completa dos sintomas de astenia, emagrecimento, palidez cutaneomucosa e hepatoesplenomegalia. Alguns indivíduos apresentam sinais de hemorragia, sendo a epistaxe o mais comum, seguida de gengivorragia e petéquias.

1.3.1 Leishmaniose visceral humana-coinfecção HIV

As manifestações clínicas dos pacientes coinfectados são semelhantes às dos imunocompetentes.^{28,38} No entanto, como os pacientes coinfectados apresentam algumas características imunológicas particulares, as manifestações clínicas desses pacientes podem diferir dos não infectados pelo HIV, tornando-se um diagnóstico desafiador devido à semelhança com outras infecções oportunistas.²³

Os pacientes coinfectados podem apresentar fraqueza, tosse, diarreia, desnutrição e perda de peso em proporção maior do que os indivíduos imunocompetentes com LVH.²³ Destaca-se que, hepatoesplenomegalia e febre ocorrem com menos frequência em relação aos sintomas gastrointestinais nos coinfectados.³⁸

1.3.2 Diagnóstico Laboratorial

Os métodos convencionais de diagnóstico da leishmaniose incluem os parasitológicos, imunológicos e moleculares. As metodologias parasitológicas são: microscopia direta, cultura *in vitro* e inoculação em modelo experimental. O diagnóstico imunológico é constituído por: teste de aglutinação direta, prova de aglutinação em látex, teste de hemaglutinação indireta, teste de imunofluorescência, *immunoblotting*, teste imunocromatográfico, ELISA e teste de reação intradérmica de Montenegro. Entre os métodos moleculares temos: PCR convencional, *Nested* PCR, *multiplex* PCR, RT-PCR, NASBA, RAPD, RFLP, AFLP e LAMP.

1.4 NOVAS TECNOLOGIAS DE PRECISÃO DIAGNÓSTICA

Como descrito na literatura científica, temos contemporaneamente tecnologias de precisão no contexto do desenvolvimento de metodologias diagnósticas.⁴⁰

1.4.1 Citometria de fluxo

Este método sorológico tornou-se benéfico por sua aplicabilidade clínica em centros de saúde e laboratórios de pesquisa, pela agilidade, precisão e reprodutibilidade.⁴¹ Este ensaio é conveniente para avaliar a expressão de proteínas específicas, viabilidade celular, morte celular apoptótica, interações célula a célula e aprimoramento celular, o que o torna adequado para triagem e diagnóstico.⁴²

1.4.2 Proteômica

A análise de todos os complexos proteicos expressos em um organismo, tecido ou célula em um determinado estado de condições é chamada de proteômica.⁴³ Esses complementos proteicos complexos são geralmente analisados por tecnologia baseada em espectrometria de massa.⁴⁴ A estratégia de análise proteômica compreende extrair, separar, identificar e quantificar a proteína, sendo uma abordagem rápida e confiável.

1.4.3 Imunoproteômica

A imunoproteômica é uma técnica utilizada para detectar o subconjunto de proteínas imunogênicas. É realizada usando métodos, como separação de proteínas, detecção imunológica (*western blotting*) e espectroscopia de massa.⁴⁸ Nesse sentido, um estudo recentemente publicado, produziu proteínas recombinantes de alta diversidade antigênica a partir de genes relacionados a antígenos epitópicos de *L. infantum*. De acordo com os resultados, este novo antígeno desenvolvido apresentou potencial aceitável na detecção de casos positivos para LVH, quando utilizado por técnica *Western blotting*.⁴⁹

1.4.4 Métodos moleculares avançados

1.4.4.1 Lamp

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é um método molecular avançado, é de rápida execução e baseada em condições isotérmicas (utilizando bloco térmico ou banho-maria). Portanto, não necessita de termocicladores.⁵¹ Os fragmentos amplificados podem ser percebidos visualmente pela mudança de cor, fluorescência e turbidez.⁵²

1.4.4.2 Eletroforese enzimática

A técnica de eletroforese enzimática *multilocus* baseada em proteínas é útil na descrição de parasitas pelas mobilidades comparativas sob eletroforese de várias enzimas intracelulares chamadas isoenzimas.⁵⁴ Seu uso é limitado devido ao alto custo, necessidade de grande quantidade de proteína e cultura, menor poder de distinção e exigência de laboratórios equipados.^{55,56}

1.4.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia tornou-se uma técnica promissora para o desenvolvimento de sistemas diagnósticos e terapêuticos.⁵⁷ A aplicação de produtos nanodimensionais

aproveita propriedades químicas, mecânicas e físicas únicas dos materiais. O desenvolvimento de biossensores com diversas formas nanoestruturais (por exemplo, pontos quânticos, esferas metálicas, nanodiscos ou NPs de metal, lipídios e polímeros) associados a sondas de reconhecimento (por exemplo, DNA, RNA, proteínas, enzimas ou anticorpos) revelam potencial no aprimoramento do campo diagnóstico.⁵⁸

2 JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS, a leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada sendo classificada juntamente a malária como uma doença protozoária mortal.⁵⁹ Os métodos diagnósticos devem ser práticos, confiáveis, rápidos, altamente sensíveis e específicos, sobretudo, considerando-se as particularidades na situação de coinfeção LVH e HIV.^{4,60}

Ressalta-se a importância da avaliação científica e criteriosa a respeito das novas metodologias laboratoriais para que, em todos os âmbitos de atuação profissional em saúde, sejam tomadas medidas eficazes visando mitigar os efeitos diretos e indiretos da evolução da LVH, sobretudo nos pacientes infectados pelo vírus HIV, possibilitando conduta terapêutica em tempo hábil e, conseqüentemente, melhorando os desfechos de morbimortalidade neste grupo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Discutir as recentes tecnologias de precisão diagnóstica em LVH, na situação de coinfeção o HIV.

4 MÉTODOS

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura. Este tipo de trabalho consiste em uma busca do conjunto científico relevante sobre um determinado tema, proporcionando uma organização do estado atual do conhecimento e reflexões para a implementação de novas intervenções, além de contribuir para uma avaliação crítica a respeito da síntese de evidências disponíveis sobre o tema investigado.

A revisão integrativa obedece às seguintes fases: a) identificação do tema e formulação da questão de pesquisa; b) estabelecimento de critérios de inclusão e exclusão dos estudos para amostragem; c) coleta dos dados que serão extraídos dos estudos; d)

análise crítica dos estudos selecionados; e) interpretação dos resultados; f) apresentação da síntese estabelecida e revisão dos conteúdos.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DO TEMA E FORMULAÇÃO DA QUESTÃO DE PESQUISA

Obedecendo à primeira etapa, elaborou-se as seguintes questões norteadoras:

Quais são as novas tecnologias de precisão relacionadas ao diagnóstico de LVH em situação de coinfeção com o vírus HIV?

4.2 FONTES DE DADOS

Os estudos foram identificados através de pesquisa em bases de dados eletrônicas. As bases de dados utilizadas: *PubMed/Medline* e *Embase*.

4.3 BUSCA

Em 27 de Maio de 2022, foram selecionados os estudos nas respectivas bases de dados.

Como estratégia de busca, nos bancos de dados, *PubMed/Medline*: “(Leishmaniasis, Visceral) AND (HIV) AND (2020:2022[pdat])”.

Para *Embase*:” (‘visceral leishmaniasis’/exp OR ‘visceral leishmaniasis’) AND human AND immunodeficiency AND virus AND (2020:py OR 2021:py OR 2022:py)”.

4.5 SELEÇÃO DE ESTUDOS

A avaliação de elegibilidade e seleção dos estudos encontrados foi realizada de forma independente e padronizada pelos revisores.

A seleção incluiu estudos *Full Text, Books and Documents, Clinical Trial, Meta-Analysis, Randomized Controlled Trials, Review* ou *Systematic Review*, ordenados pela categoria *Most Recent*, cuja data de publicação foi igual ou superior a 01/01/2020 para *PubMed/Medline*.

Para *Embase*, a seleção incluiu todos os tipos de estudos cuja data de publicação foi igual ou superior a 01/01/2020, ordenados pela categoria *Publication Year*, componente dos estudos mais recentemente publicados até a data especificada da busca.

Os estudos elegíveis (abordagem específica sobre metodologias em diagnóstico laboratorial na situação de coinfeção LVH-HIV) que preencheram os requisitos para responder às questões norteadoras do estudo foram avaliados em sua integralidade.

A seleção com base no critério cronológico de publicação foi embasada conforme a relevância dos estudos publicados nos últimos anos, gerando discussões recentes e pertinentes referentes às novas metodologias no diagnóstico laboratorial de LVH.

Estudos que avaliaram tais metodologias em animais foram excluídos, bem como àqueles que avaliaram apenas a prevalência de LVH (sem o status de coinfeção com HIV), ou apenas a prevalência sem testar parâmetros de sensibilidade e especificidade mesmo na situação de coinfeção. Estudos que abordaram outras formas clínicas de leishmaniose também não foram incluídos.

4.6 PROCESSO DE COLETA DE DADOS

O método de extração de dados de cada estudo incluído consistiu no preenchimento de formulários de informação. Posteriormente, o revisor extraiu os dados de cada estudo incluído através de um formulário padronizado. Tais formulários são divididos na avaliação de: *Abstract*, Introdução, Justificativa/Objetivos, Metodologia, Resultados, Discussão e Conclusão.

4.7 ANÁLISE CRÍTICA DOS ESTUDOS SELECIONADOS

Para verificar a qualidade dos estudos elegíveis, o revisor avaliou título, ano de publicação, autores, objetivos do estudo, vinculação acadêmica, referencial teórico, tipo de estudo, aspectos metodológicos, resultados e recomendações. A interpretação dos dados foi fundamentada nos resultados da avaliação criteriosa dos artigos selecionados.

5 RESULTADOS

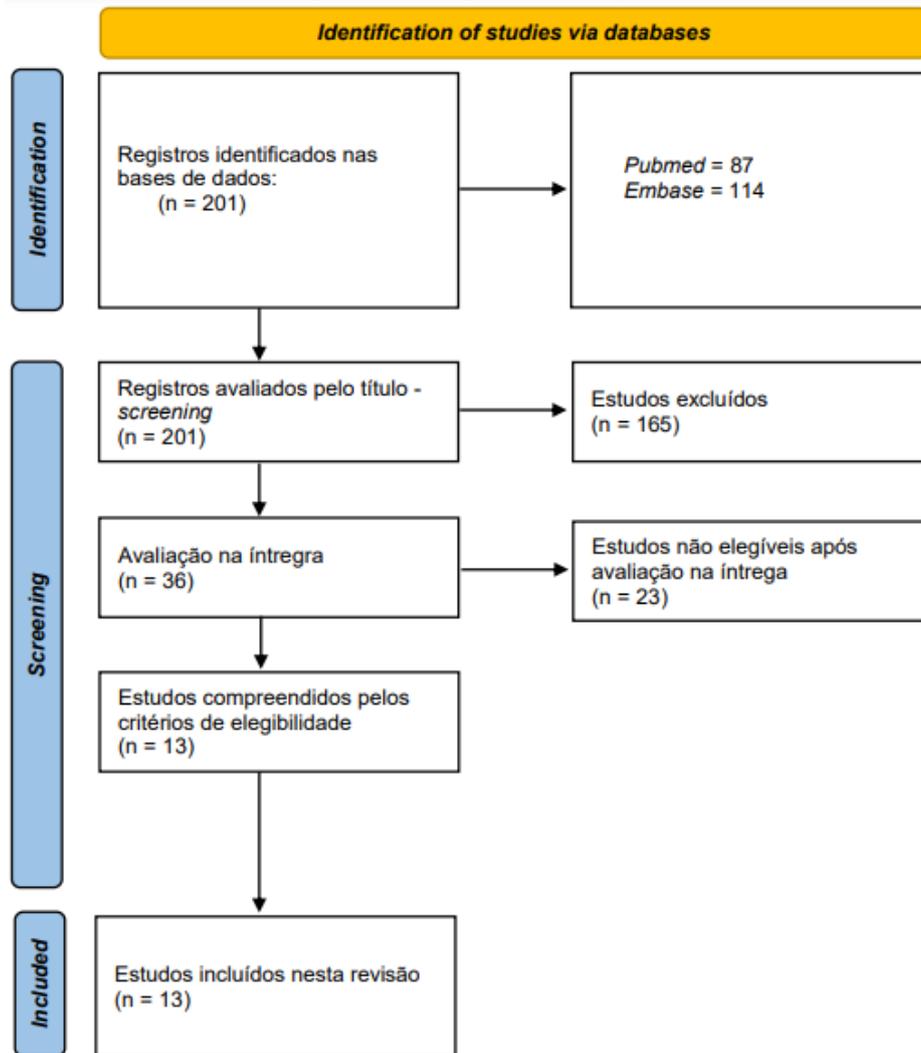
5.1 ETAPAS DA SELEÇÃO DOS ESTUDOS

A pesquisa na base de dados *Pubmed/Medline*, resultou em 87 estudos, dos quais 20 foram selecionados após leitura de título e/ou *Abstract*, sendo 13 pertinentes aos critérios de inclusão após leitura na íntegra.

A pesquisa na base de dados *Embase*, resultou em 114 estudos, destes, 16 selecionados após leitura de título e/ou *Abstract* e 13 após leitura na íntegra, por se relacionarem exclusivamente à pergunta norteadora. Todos os 13 estudos em questão são achados duplicados à base de dados eletrônica *Pubmed/Medline*

Recuperamos e avaliamos os relatórios em texto completos dos 13 estudos pertinentes, conforme sintetizado no fluxograma da Figura.1.

Figura 1 - Fluxograma de seleção.



5.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS

Os estudos incluídos nesta revisão estão resumidos no Quadro.1, que fornece dados de autores/ano, tipo de estudo, país de origem e objetivos.

Quadro 1 - Síntese da característica dos estudos inclusos.

Autor(es)/ Ano	Tipo de estudo	País de origem	Objetivos
Tang C. et al., 2022	Relato de caso com Revisão integrada	CHINA	Discutir um relato de caso a respeito de um paciente coinfestado LVH-HIV, ressaltando a importância da metodologia de metagenômica no diagnóstico da LVH.
Takele Y. et al., 2022	Longitudinal Prospectivo	REINO UNIDO E ETIÓPIA	Identificar biomarcadores referentes à LVH, em vigência de coinfecção com HIV, relacionando-os com a taxa de recidiva da infecção por <i>Leishmania</i> .
Ramos F. F. et al., 2021	Longitudinal Prospectivo	BRASIL	Avaliar novas proteínas antigênicas como marcadores sorológicos diagnósticos da LVH-HIV, relacionando-os com o prognóstico no monitoramento da eficiência do tratamento.

Song P. et al., 2021	Relato de caso	CHINA	Discutir um relato de caso a respeito de uma paciente coinfectada LVH-HIV, ressaltando a importância da metodologia de metagenômica no diagnóstico da LVH.
Ferreira G. R. et al., 2021	Longitudinal Prospectivo	BRASIL	Identificar biomarcadores relacionados à LVH, em vigência de coinfeção com HIV, relacionando-os com a gravidade da doença e probabilidade de morte.
Galvani N. C. et al., 2021	Ensaio clínico	BRASIL	Desenvolver e avaliar uma nova proteína recombinante como marcador diagnóstico e prognóstico da LVH-HIV, comparando com metodologia diagnóstica tradicional.
Hagos D. G. et al., 2021	Ensaio clínico	ETIÓPIA HOLANDA	Discutir a recente metodologia LAMP no diagnóstico de LVH, inclusive na situação de coinfeção com HIV, comparando os resultados com metodologias diagnósticas consolidadas.
Ruang-Areerate T. et al., 2021	Ensaio clínico	TAILÂNDIA	Desenvolver e aplicar técnicas biomoleculares para o diagnóstico de LVH em pacientes assintomáticos infectados pelo HIV, comparando-as entre si.
Ramos R. E. M. et al., 2021	Ensaio clínico	BRASIL	Avaliar uma nova proteína recombinante como marcador diagnóstico da LVH-HIV, comparando com metodologia diagnóstica tradicional.
Da Silva E. D. et al., 2021	Ensaio clínico	BRASIL	Avaliar a metodologia diagnóstica recente, citometria de fluxo, no diagnóstico da LVH-HIV, comparando com metodologias tradicionais.
Sukphattanaudo mchoke C. et al., 2020	Ensaio clínico	TAILÂNDIA	Aprimorar e aplicar técnica biomolecular para o diagnóstico de LVH em pacientes assintomáticos infectados pelo HIV, comparando com metodologias consolidadas.
Machado A. S. et al., 2020	Ensaio clínico	BRASIL	Avaliar uma nova proteína antigênica como marcador diagnóstico da LVH, inclusive em pacientes coinfectados pelo HIV, validando a eficácia do método com grupo controle.
Barbosa Júnior W. L. et al., 2020	Longitudinal Prospectivo	BRASIL	Identificar biomarcadores referentes à LVH e ao HIV, relacionando-os com parâmetros clínicos e laboratoriais da LVH-HIV.

5.3 ANÁLISE ESPECÍFICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

A síntese particularizada dos estudos incluídos é exposta no Quadro 2.

Quadro 2 - Síntese dos resultados dos estudos

Autor(es)/ Ano	Resultados
Tang C. et al., 2022	O Sequenciamento Metagenômico de Próxima Geração (mNGS), é mais sensível e abrangente do que as hemoculturas, que demoram muito, ou testes sorológicos específicos. Portanto, quando as condições econômicas permitirem, o mNGS pode ser escolhido como um teste adjuvante de rotina, sobretudo na situação de dificuldade de identificação do patógeno (LVH-HIV).
Takele Y. et al., 2022	Três biomarcadores associados à recidiva de LVH em pacientes com HIV foram identificados: contagens de células T CD4+ diminuída, IFN-gama reduzido e níveis elevados de expressão de PD1 em células T CD4+. Tais biomarcadores podem contribuir para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas e prognósticas futuras.
Ramos F. F. et al., 2021	A partir de ensaios de bioinformática, indicou-se que a proteína tripanotiona redutase de <i>Leishmania</i> continha três epítotos conformacionais, (Pep2, Pep3 e Pep4) que

	apresentaram excelente desempenho no diagnóstico da coinfeção LVH-HIV, com valores de sensibilidade e especificidade de 100%, revelando-se de modo promissor.
Song P. et al., 2021	O Sequenciamento Metagenômico de Próxima Geração (mNGS) se mostrou uma ferramenta diagnóstica relevante na identificação do patógeno causador da LVH em situação de coinfeção com HIV.
Ferreira G. R. et al., 2021	Após análise de biomarcadores, incluindo interleucinas (IL-1 β , 6, 8 e 17), interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF), lipopolissacarídeo (LPS), CD14 solúvel (sCD14), fator inibidor de migração de macrófagos (MIF) e proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (IFABP), identificou-se o sCD14 como preditor independente para gravidade e mortalidade da LVH em situação de coinfeção com HIV.
Galvani N. C. et al., 2021	A partir de 8 epítomos específicos referentes à 4 antígenos de <i>L. Infantum</i> , desenvolveram uma nova proteína antigênica recombinante (<i>ChimLeish</i>), a qual representou maior eficácia diagnóstica comparada com metodologia sorológica tradicional, revelando potencial significativo como marcador diagnóstico da LVH em situação de coinfeção com HIV.
Hagos D. G. et al., 2021	O ensaio LAMP é um ensaio molecular preciso e rápido para o diagnóstico de LVH, inclusive em pacientes coinfectados com HIV-1, em ambiente endêmico. Os resultados da eficácia foram significativos e equivalentes à metodologia tradicional comparada.
Ruang-Areerate T. et al., 2021	Dois técnicas biomoleculares foram desenvolvidas para o ensaio LAMP (para diagnóstico de LVH em pacientes coinfectados com HIV), permitindo confirmação visual do resultado, uma por fluorescência (<i>SYBR safe</i>) e outra por precipitação (sonda de nanopartículas de ouro, AuNP-probe). Ambas as técnicas são equivalentes em eficácia, conferindo confiabilidade, custos acessíveis, rapidez e simplicidade para interpretação diagnóstica em campo.
Ramos R. E. M. et al., 2021	A nova proteína antigênica recombinante (Lci2), apresentou maior eficácia diagnóstica comparada com metodologia sorológica tradicional, revelando potencial significativo como marcador diagnóstico da LVH em situação de coinfeção com HIV.
Da Silva E. D. et al., 2021	Os achados sugerem que a citometria de fluxo pode ser utilizada como uma abordagem sorológica alternativa para identificação de LVH e como ferramenta para caracterizar a resposta humoral contra <i>L. infantum</i> em pacientes infectados pelo HIV. Houve maior eficácia da citometria de fluxo em comparação com as metodologias sorológicas avaliadas.
Sukphattanaudo mchoke C. et al., 2020	Uma técnica biomolecular foi desenvolvida para o ensaio LAMP (para diagnóstico de LVH em pacientes coinfectados com HIV), permitindo confirmação visual do resultado por fluorescência (SYBR green I). Esta técnica é equivalente em eficácia quando comparada à metodologia molecular <i>nested PCR</i> , conferindo confiabilidade, acessibilidade, rapidez e simplicidade para interpretação diagnóstica em campo.
Machado A. S. et al., 2020	A partir de extratos de antígenos de <i>L. Infantum</i> , identificaram uma nova proteína antigênica (β -tubulina), a qual representou significativa eficácia diagnóstica sorológica, revelando potencial como marcador diagnóstico da LVH em situação de coinfeção com HIV.
Barbosa Júnior W. L. et al., 2020	O estudo constatou que pacientes co-infectados com LVH-HIV apresentaram níveis séricos significativamente maiores de citocinas TNF e IL-4 e menor expressão de miR-182 em comparação com pacientes monoinfectados com HIV. Juntos, TNF, IL-4 e miR-182 podem representar biomarcadores circulatórios da co-infecção LVH-HIV e podem contribuir para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas/prognósticas futuras.

6 DISCUSSÃO

O resumo das áreas de avanço abrangidas por esta revisão, no contexto das novas tecnologias de precisão, é abordado no Quadro.3.

Quadro 3 - Áreas de avanço científico recentes.

Área de atuação	Estudos incluídos na revisão
Proteômica e Imunoproteômica	Takele Y. et al., 2022; Ramos F. F. et al., 2021; Ferreira G. R. et al., 2021; Galvani N. C. et al., 2021; Ramos R. E. M. et al., 2021; Machado A. S. et al., 2020; Barbosa Júnior W. L. et al., 2020.
Processos moleculares avançados	Tang C. et al., 2022; Song P. et al., 2021; Hagos D. G. et al., 2021; Ruang-Areerate T. et al., 2021; Sukphattanaudomchoke C. et al., 2020;
Nanodiagnóstico	Ruang-Areerate T. et al., 2021.
Citometria de fluxo	Da Silva E. D. et al., 2021.

Em confluência científica com estudos prévios,^{31,40} esta revisão identifica avanços contínuos nas novas tecnologias de precisão no diagnóstico da LVH. Nossa análise particulariza tal progresso, referindo-se ao contexto da situação de coinfeção com o HIV, haja visto que, conforme descrito na literatura,^{22,61} há crescente relevância epidemiológica desta associação, sobretudo em países como o Brasil e Etiópia.

As consequências fisiopatológicas dessa associação imunossupressora dificultam o diagnóstico da infecção oportunista pela *Leishmania*, sobretudo nos casos assintomáticos ou subclínicos, reforçando a necessidade de metodologias diagnósticas de alta sensibilidade e especificidade. Os determinantes sociais envolvidos na LVH apontam para deficiências crônicas que incidem sobre as populações vulneráveis, tais condições socioeconômicas exigem que a triagem e definição diagnóstica seja abrangente, eficaz, aplicável e acessível, ressaltando dentre as tecnologias de precisão, àquelas que melhor se adaptam a esse contexto, tais como as metodologias LAMP aprimoradas.

7 CONCLUSÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) ocorrem em condições de clima tropical e subtropical e estão intimamente ligadas à pobreza, prosperando em áreas onde o acesso ao saneamento básico, água potável e cuidados de saúde é limitado. A leishmaniose encontra-se na atual lista das 20 DTNs definidas pela OMS. Falhas recorrentes no diagnóstico da LVH, muitas vezes associadas às abordagens convencionais são determinantes para os desfechos de morbimortalidade. Assim, o diagnóstico preciso

e oportuno da doença desempenha um papel crucial na identificação de pacientes alvo, incluindo os assintomáticos e subclínicos.

As novas metodologias diagnósticas de precisão surgem como opções revolucionárias e merecem investigações científicas futuras para se consolidarem como opções viáveis, com maior abrangência populacional e parametrização metodológica pode-se recomendar a melhor conduta baseada em evidências, fornecendo ao paciente melhores desfechos.

REFERÊNCIAS

1. van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012 Jun; 26(2):309-22. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.005. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22632641.
2. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect Dis Clin North Am.* 2019 Mar; 33(1):79-99. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.005. PMID: 30712769.
3. Kohn CG. *Encyclopedia of plague and pestilence*, 1st edn. New York: Infobase Publishing, 2007.
4. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018 Sep 15; 392(10151):951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30126638.
5. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol.* 2003 Sep 15; 33(10):1027-34. doi: 10.1016/s0020-7519(03)00142-5. PMID: 13129524; PMCID: PMC2839921.
6. Herwaldt BL. Miltefosine--the long-awaited therapy for visceral leishmaniasis? *N Engl J Med.* 1999 Dec 9; 341(24):1840-2. doi: 10.1056/NEJM199912093412411. PMID: 10588972.
7. Lodge R, Descoteaux A. *Leishmania* invasion and phagosome biogenesis. *Subcell Biochem.* 2008; 47:174-81. doi: 10.1007/978-0-387-78267-6_14. PMID: 18512351.
8. Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med.* 2015 Apr-Jun; 3(2):43-50. doi: 10.1515/jtim-2015-0002. Epub 2015 Jun 30. PMID: 27847886; PMCID: PMC4936444.
9. World Health Organization. Leishmaniasis. Leishmaniasis. n.D. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Accessed 19 Apr 2020.
10. Neglected tropical diseases. https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Accessed 18 Jan 2022.
11. Engels D, Zhou XN. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infect Dis Poverty.* 2020 Jan 28; 9(1):10. doi: 10.1186/s40249-020-0630-9. PMID: 31987053; PMCID: PMC6986060.
12. Shimozako HJ, Wu J, Massad E. The Preventive Control of Zoonotic Visceral Leishmaniasis: Efficacy and Economic Evaluation. *Comput Math Methods Med.* 2017; 2017:4797051. doi: 10.1155/2017/4797051. Epub 2017 May 15. PMID: 28588642; PMCID: PMC5447317.
13. Satragno D, Faral-Tello P, Canneva B, Verger L, Lozano A, Vitale E, Greif G, Soto C, Robello C, Basmadjián Y. Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay. *Emerg Infect Dis.* 2017 Mar; 23(3):536-538. doi: 10.3201/eid2303.160377. PMID: 28221113; PMCID: PMC5382754.

14. Cruz I, Acosta L, Gutiérrez MN, Nieto J, Cañavate C, Deschutter J, Bornay-Llinares FJ. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infect Dis.* 2010 Dec 1; 10:342. doi: 10.1186/1471-2334-10-342. PMID: 21122107; PMCID: PMC3002360.
15. González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, Sánchez-Cordero V, Sarkar S. Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Jan 19; 4(1):e585. doi: 10.1371/journal.pntd.0000585. PMID: 20098495; PMCID: PMC2799657.
16. Koch LK, Kochmann J, Klimpel S, Cunze S. Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. *Sci Rep.* 2017 Oct 17; 7(1):13325. doi: 10.1038/s41598-017-13822-1. PMID: 29042642; PMCID: PMC5645347.
17. Reis LLD, Balieiro AADS, Fonseca FR, Gonçalves MJF. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017 Sep-Oct; 50(5):638-645. doi: 10.1590/0037-8682-0243-2017. PMID: 29160510.
18. Brasil M da S (MS) (2020) Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018. <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LV-Coef-Incidencia.pdf>.
19. Machado CAL, Sevá ADP, Dantas-Torres F, Horta MC. Spatial analysis and epidemiological profile of visceral leishmaniasis, northeastern Brazil: A cross-sectional study. *Acta Trop.* 2020 May 13; 208:105520. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105520. Epub ahead of print. PMID: 32413361.
20. Cota G, Erber AC, Schernhammer E, Simões TC. Inequalities of visceral leishmaniasis case-fatality in Brazil: A multilevel modeling considering space, time, individual and contextual factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021 Jul 1; 15(7):e0009567. doi: 10.1371/journal.pntd.0009567. PMID: 34197454; PMCID: PMC8279375.
21. Carvalho LS, das Graças Braga M, da Silva Costa DA, Simões TC, Lula MD, Silveira MR. Lethality among individuals infected with visceral leishmaniasis in Brazil: a retrospective study (2007-2018). *Parasitol Res.* 2022 Feb; 121(2):725-736. doi: 10.1007/s00436-022-07429-3. Epub 2022 Jan 11. PMID: 35013872.
22. Dos Reis ES, Ribeiro CJN, Dos Santos AD, et al. Magnitude of visceral leishmaniasis and HIV coinfection and association with social determinants of health in the Northeast region of Brazil: a retrospective, spatiotemporal model (2010-2018). *Parasitol Res.* 2022 Mar; 121(3):1021-1031. doi: 10.1007/s00436-022-07450-6. Epub 2022 Feb 10. PMID: 35142927.
23. Ferreira GR, Castelo Branco Ribeiro JC, Meneses Filho A, et al. Human Competence to Transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Jan; 98(1):126-133. doi: 10.4269/ajtmh.16-0883. PMID: 29141704; PMCID: PMC5928688.

24. Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV AIDS (Auckl)*. 2018 Oct 15; 10:193-201. doi: 10.2147/HIV.S143929. PMID: 30410407; PMCID: PMC6197215.
25. Gradoni L, López-Vélez R, Mokni M (2017) Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region Copenhagen: World Health Organization.
26. Diro E, Lynen L, Ritmeijer K, Boelaert M, Hailu A, van Griensven J. Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jun 26; 8(6):e2869. doi: 10.1371/journal.pntd.0002869. PMID: 24968313; PMCID: PMC4072530.
27. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008. pp. 334–359. <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07> PMID: 18400800.
28. Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CH. Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. *HIV AIDS (Auckl)*. 2016 Oct 7; 8:147-156. doi: 10.2147/HIV.S93789. PMID: 27785103; PMCID: PMC5063600.
29. Singh OP, Hasker E, Boelaert M, Sacks D, Sundar S. Xenodiagnosis to address key questions in visceral leishmaniasis control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Aug 13; 14(8):e0008363. doi: 10.1371/journal.pntd.0008363. PMID: 32790716; PMCID: PMC7425851.
30. Khoury MJ, Iademarco MF, Riley WT. Precision Public Health for the Era of Precision Medicine. *Am J Prev Med*. 2016 Mar; 50(3):398-401. doi: 10.1016/j.amepre.2015.08.031. Epub 2015 Nov 4. PMID: 26547538; PMCID: PMC4915347.
31. Zijlstra EE. Precision Medicine in Control of Visceral Leishmaniasis Caused by *L. donovani*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Nov 9; 11:707619. doi: 10.3389/fcimb.2021.707619. PMID: 34858865; PMCID: PMC8630745.
32. Kaye PM, Aebischer T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Oct;17(10):1462-70. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03610.x. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21851483.
33. Kumar R, Bhatia M, Pai K. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Lab*. 2017 Oct 1;63(10):1549-1559. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170404. PMID: 29035452.
34. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathog*. 2013 Jan;9(1):e1003053. doi: 10.1371/journal.ppat.1003053. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23300451; PMCID: PMC3536654.

35. Alexander J, Brombacher F. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol.* 2012 Apr 17;3:80. doi: 10.3389/fimmu.2012.00080. PMID: 22566961; PMCID: PMC3342373.
36. Harhay MO, Olliaro PL, Vaillant M, et al. Who is a typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa, and South Asia. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Apr;84(4):543-50. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0321. PMID: 21460007; PMCID: PMC3062446.
37. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.* 2014 May 3;6:147-54. doi: 10.2147/CLEP.S44267. PMID: 24833919; PMCID: PMC4014360.
38. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA, de Sousa-Gomes ML, Santos-Oliveira JR, Rabello A. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Sep 18;8(9):e3136. doi: 10.1371/journal.pntd.0003136. PMID: 25233461; PMCID: PMC4169383.
39. Coutinho JVSC, Santos FSD, Ribeiro RDSP, Oliveira IBB, Dantas VB, Santos ABFS, Tauhata JR. Visceral leishmaniasis and leishmaniasis-HIV coinfection: comparative study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017 Sep-Oct;50(5):670-674. doi: 10.1590/0037-8682-0193-2017. PMID: 29160515.
40. Kumari D, Perveen S, Sharma R, Singh K. Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update. *Eur J Pharmacol.* 2021 Nov 5;910:174436. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174436. Epub 2021 Aug 21. PMID: 34428435.
41. Ker, H.G., Coura-Vital, W., de Oliveira Aguiar-Soares, R.D., Roatt, B.M., das Dores Moreira, N., Carneiro, C.M., de Menezes Machado, E.M., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Giunchetti, 2013. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 1792–1798.
42. Abraham, R.S., Aubert, G.J.C., Immunology, V., 2016. Flow cytometry, a versatile tool for diagnosis and monitoring of primary immunodeficiencies. *Clin. Vaccine Immunol.* 23, 254–271.
43. Yu, L.-R., Stewart, N.A., Veenstra, T.D., 2010. Proteomics: the Deciphering of the Functional Genome. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine.* Elsevier, pp. 89–96.
44. Capelli-Peixoto J, Mule SN, Tano FT, Palmisano G, Stolf BS. Proteomics and Leishmaniasis: Potential Clinical Applications. *Proteomics Clin Appl.* 2019 Nov;13(6):e1800136. doi: 10.1002/prca.201800136. Epub 2019 Aug 26. PMID: 31347770.
45. Shaslinah N, Sangavi P, Sangeetha R, Gowthamkumar S, Sindhu V, Langeswaran K. Screening and identification of potential inhibitor for visceral leishmaniasis (VL) through computational analysis. *J Genet Eng Biotechnol.* 2022 Feb 23;20(1):35. doi: 10.1186/s43141-022-00318-3. PMID: 35195803; PMCID: PMC8866605.
46. Bomfim LGS, Magalhães LS, Rodrigues LS, et al. TREM-1 Expression on the Surface of Neutrophils in Patients With Visceral Leishmaniasis Is Associated With

Immunopathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Mar 24;12:863986. doi: 10.3389/fcimb.2022.863986. PMID: 35402286; PMCID: PMC8988227.

47. Brar HK, Roy G, Kanojia A, Madan E, Madhubala R, Muthuswami R. Chromatin-Remodeling Factor BRG1 Is a Negative Modulator of *L. donovani* in IFN γ Stimulated and Infected THP-1 Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Apr 1;12:860058. doi: 10.3389/fcimb.2022.860058. PMID: 35433496; PMCID: PMC9011159.

48. Ohyama K, Kuroda N. Immune complexome analysis. *Adv Clin Chem.* 2013;60:129-41. doi: 10.1016/b978-0-12-407681-5.00004-0. PMID: 23724743.

49. Taherzadeh M, Fouladvand M, Kazemi B. Evaluation of a new multi-epitope sequence of eight known *Leishmania infantum* antigens for HVL diagnosis by ELISA and Western blot. *J Vector Borne Dis.* 2021 Oct-Dec;58(4):289-296. doi: 10.4103/0972-9062.318310. PMID: 35381816.

50. Machado AS, Lage DP, Vale DL, Freitas CS, et al. *Leishmania* LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2022 Apr 18:e12921. doi: 10.1111/pim.12921. Epub ahead of print. PMID: 35437797.

51. Silva Nunes Bezerra G, Barbosa Júnior WL, Cintra Leal N, DE Medeiros ZM. Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Detection of *Leishmania infantum* Strain from Brazil. *Iran J Parasitol.* 2020 Jan-Mar;15(1):155-157. PMID: 32489390; PMCID: PMC7244829.

52. Sriworarat C, Phumee A, Mungthin M, Leelayoova S, Siriyasatien P. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection. *Parasit Vectors.* 2015 Nov 14;8:591. doi: 10.1186/s13071-015-1202-x. PMID: 26577333; PMCID: PMC4650110.

53. Erber AC, Sandler PJ, de Avelar DM, Swoboda I, Cota G, Walochnik J. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors.* 2022 Jan 24;15(1):34. doi: 10.1186/s13071-021-05133-2. PMID: 35073980; PMCID: PMC8785018.

54. Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Andreoni, F., Vitale, F., Galluzzi, L., Magnani, M., 2018. Exploiting genetic polymorphisms in metabolic enzymes for rapid screening of *Leishmania infantum* genotypes. *microorganism* 11, 1–14.

55. Sundar S, Singh OP. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Mol Diagn Ther.* 2018 Aug;22(4):443-457. doi: 10.1007/s40291-018-0343-y. PMID: 29922885; PMCID: PMC6301112.

56. Tsokana, C.N., Athanasiou, L.V., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K., Billinis, C., 2014. Molecular diagnosis of leishmaniasis, species identification and phylogenetic analysis. *Trends Epidemiol Diagnosis and Treatment* 2014, 161–193.

57. Moffatt, 2016. Nanotechnology to nanomedicine: reconciling ethical implications and Public health. *Proteomics Bioinform* 3, 00090.

58. Assolini JP, Carloto ACM, Bortoleti BTDS, Gonçalves MD, Tomiotto Pellissier F, Feuser PE, Cordeiro AP, Hermes de Araújo PH, Sayer C, Miranda Sapla MM, Pavanelli WR. Nanomedicine in leishmaniasis: A promising tool for diagnosis, treatment and prevention of disease - An update overview. *Eur J Pharmacol.* 2022 May 15;923:174934. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174934. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35367420.
59. Diro E, Blesson S, Edwards T, et al. A randomized trial of AmBisome monotherapy and AmBisome and miltefosine combination to treat visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Jan 17;13(1):e0006988. doi: 10.1371/journal.pntd.0006988. PMID: 30653490; PMCID: PMC6336227.
60. De Brito RCF, Aguiar-Soares RDO, Cardoso JMO, Coura-Vital W, Roatt BM, Reis AB. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Oct;104(19):8105-8116. doi: 10.1007/s00253-020-10846-y. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32845368.
61. Kassa M, Abdellati S, Cnops L, et al. Diagnostic accuracy of direct agglutination test, rK39 ELISA and six rapid diagnostic tests among visceral leishmaniasis patients with and without HIV coinfection in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Dec 31;14(12):e0008963. doi: 10.1371/journal.pntd.0008963. PMID: 33382690; PMCID: PMC7774845.