

Capítulo 25

LEISHMANIASIS E INFECCIÓN POR EL VIH

Juan A. Pineda Vergara, Juan Macías Sánchez y José Ángel García García

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial. Existen zonas endémicas en 88 países, que se reparten dentro de cuatro continentes. Se cree que alrededor de 12 millones de personas están infectadas por *Leishmania* en todo el mundo. En ciertas zonas endémicas de leishmaniasis, tales como la India, el Este de África o la Cuenca Mediterránea, se ha producido en las últimas décadas un solapamiento epidemiológico con la infección por VIH (figura 1), que parece estar aumentando debido a dos factores: por un lado, la pandemia de SIDA se está extendiendo hacia áreas rurales y suburbanas en muchos países en vías de desarrollo y, por otro, la leishmaniasis está alcanzando el ámbito urbano en dichas zonas. De esta manera, se espera que en un futuro los casos de coinfección por VIH y *Leishmania* a nivel mundial aumenten (1).

La Cuenca Mediterránea ha sido el área en la que se ha observado un mayor número de casos de coinfección hasta la actualidad. De este modo, de los 1700 casos de leishmaniasis visceral (LV) en pacientes infectados por el VIH recogidos hasta 1998 por la OMS, 1440 casos procedían de esta región y 835 concretamente de España (1). La LV llegó a ser la cuarta enfermedad más frecuente con la que debutaba el SIDA clínico en algunas series de nuestra área antes del año 1997 (2). En estudios realizados en Andalucía antes del uso a gran escala de la terapia antirretrovírica de gran actividad (TARGA), la prevalencia de LV en pacientes infectados por el VIH era del 11%, siendo un 41% de los casos subclínicos (3). Sin embargo, desde 1996 el panorama de la coinfección VIH/*Leishmania* en España ha cambiado radicalmente, al menos en lo que se refiere a frecuencia de casos sintomáticos de LV. Efectivamente, como ha sucedido con otros procesos oportunistas, desde que se introdujo la TARGA, se observó una caída muy marcada en la incidencia de esta enfermedad (4). Pero a diferencia de lo que ha sucedido con otras entidades, la LV sintomática ha sido la única infección oportunista que ha disminuido su frecuencia relativa como forma de presentación del SIDA clínico (2). Ello probablemente esté asociado no sólo a la introducción de la TARGA, sino también al hecho de que los toxicómanos de nuestro país han cambiado mayoritariamente la vía de administración de la droga, de tal modo que la inhalatoria ha venido a reemplazar a la parenteral, lo cual puede haber determinado que haya menos casos nuevos de infección por este parásito.

ETIOPATOGENIA

De las más de 20 especies conocidas de *Leishmania* únicamente tres originan LV: *L. donovani* en el Sur de Asia y África del Este, *L. infantum* en la Cuenca Mediterránea y *L. chagasi*, que es idéntica a la anterior, en Centroamérica y Sudamérica. La mayoría de los casos de coinfección VIH/*Leishmania* comunicados han sido producidos por *L. infantum*. En la Cuenca Mediterránea el zimodema MON-1 era el responsable del 90% de los casos de LV y de un 20% de los casos de leishmaniasis cutánea antes de la pandemia de SIDA. Sin embargo, entre los pacientes coinfectados por VIH/*Leishmania* se ha observado una gran variabilidad de zimodemas. Así, cepas típicamente dermatrópicas en individuos no infectados por VIH son capaces de producir LV en los pacientes portadores de este virus. Además, en estos enfermos se han encontrado descrito zimodemas previamente no conocidos, así como otros no identificados en perros (5). Esta variabilidad es debida en parte a la visceralización de variantes dermatrópicas, de baja virulencia, que en enfermos con un alto grado de inmunodeficiencia pueden producir LV. No obstante, la transmisión de algunas cepas a través de un ciclo antroponótico es muy probable que haya desempeñado algún papel en este hecho.

La respuesta del huésped a *Leishmania* ha sido ampliamente estudiada en modelos murinos, aunque probablemente en el ser humano los acontecimientos que suceden son mucho más complejos. El resultado de la infección por *L. major* en ratones BALB/c depende de que los linfocitos CD4+ polaricen su actividad hacia un patrón Th1 ó Th2. La producción de interferón gamma por parte de los linfocitos CD4+ Th1, así como por las células natural killer, confiere resistencia a la enfermedad, en tanto que la expansión de células Th2, que producen interleuquina 4 (IL-4) e IL-10, permite la supervivencia del parásito dentro de los monocitos. Durante el periodo inicial de la infección, tanto los ratones que desarrollan la enfermedad, como los que no lo hacen, producen una oleada de citoquinas de tipo Th2. No obstante, en los ratones resistentes se produce un viraje hacia un perfil Th1, lo que les permite controlar la infección. Este cambio de fenotipo Th parece depender en gran medida de la producción de IL-12 por los propios linfocitos CD4+ (6).

En cualquier caso, la respuesta inmune humana que limita la leishmaniasis es mediada esencialmente por células. Por ello, cuando el brazo celular de la inmunidad es cuantitativamente deficiente, como sucede en la infección por VIH, se facilita la aparición de una enfermedad diseminada. Pero además, en pacientes infectados por este virus parece existir una producción de citoquinas alterada, predominando el patrón Th2 en las fases más avanzadas de la enfermedad, si bien este hallazgo no ha sido corroborado universalmente. Asimismo, el VIH parece ejercer un efecto inhibitorio sobre la producción de interferón gamma en respuesta a *L. donovani* (7). Este conjunto de trastornos inmunes celulares que suceden en el paciente portador del VIH puede facilitar tanto la reactivación de infecciones latentes por *L. infantum*, como la parasitación primaria. De hecho, se han observado ambos fenómenos (8, 9), aunque probablemente la mayor parte de los casos de enfermedad correspondan a reactivaciones. La consecuencia de esta mayor susceptibilidad a la leishmaniasis es que en los pacien-

tes con SIDA que viven en áreas endémicas el riesgo de sufrir dicho proceso está aumentado de 100 a 1000 veces.

Pero no sólo la infección por VIH facilita la acción patógena de *Leishmania*, sino que también sucede el fenómeno inverso. Así, se ha demostrado *in vitro* que *L. donovani* induce la expresión del VIH en células latentemente infectadas. Este efecto es mediado por el lipofosfoglicano de la pared del parásito, que a su vez estimula la producción de factor de necrosis tumoral α (10). Hay pocos datos sobre las consecuencias de estos hallazgos *in vivo*, pero se ha observado que los pacientes coinfectados por VIH/*Leishmania* presentan una mayor producción de citoquinas de tipo Th2 que los mono infectados por VIH (11) y que la coinfección se asocia a niveles más altos de viremia plasmática (12). Tampoco se sabe mucho de la traducción clínica de estos hechos. En este sentido, se ha comunicado que los enfermos con doble infección presentan un mayor número de eventos oportunistas y podrían tener una supervivencia menor (13). De este modo, virus y parásito se potencian mutuamente formando un círculo vicioso patogénico.

EPIDEMIOLOGÍA

La LV producida por *L. infantum* ha sido tradicionalmente considerada una zoonosis. El reservorio principal en nuestra área es el perro y el vector un insecto del género *Phlebotomus*. En este ciclo el hombre puede irrumpir como hospedador accidental. En el huésped vertebrado, los parásitos se multiplican dentro de los macrófagos como amastigotes (formas no flageladas). *L. infantum* es adquirida por el vector a partir de la sangre del reservorio, de la cual se alimenta, transformándose en promastigote (flagelado) en el vector (Figura 2).

Sin embargo, hay pruebas de la existencia de otros dos ciclos de transmisión en los que el hombre actuaría de hospedador y reservorio (Figura 2), un ciclo antroponótico natural y otro artificial. Así, se ha demostrado que *Phlebotomus perniciosus* puede adquirir *L. infantum* tras la picadura de pacientes coinfectados por VIH (14). Ello permitiría que este parásito se transmitiese de hombre a hombre por medio del vector animal, de idéntica forma a como lo hace *L. donovani*, lo que supondría la existencia de un ciclo antroponótico natural (Figura 2). Por otro lado, hay datos epidemiológicos y experimentales que demuestran la transmisión de *L. infantum* a través de jeringuillas compartidas, que constituirían el vector de un ciclo antroponótico artificial (Figura 2). Dichos datos son los siguientes: En nuestra área, la prevalencia de marcadores de infección por *Leishmania* es muy alta en consumidores de drogas por vía parenteral (15). Además, cerca de un 8% de estos pacientes son parasitémicos asintomáticos (16). Por otra parte, se ha conseguido la transmisión experimental del parásito a ratones a través de jeringuillas (17). Finalmente, en el material de inyección desechado por consumidores de drogas parenterales asintomáticos se ha podido encontrar el ADN de *L. infantum* con alta frecuencia (18).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El cuadro clínico producido por la LV en pacientes coinfectados por el VIH, la mayoría de las veces, es indistinguible del observado en hospedadores monoinfectados por *Leishmania* (Tabla 1) (19). Este proceso suele aparecer con recuentos de linfocitos CD4+ por debajo de 200 cel/ μ L y frecuentemente acompañado de otras enfermedades oportunistas.

En alrededor de un 10% de los casos la LV presenta manifestaciones atípicas en los pacientes coinfectados por VIH. Así, la afectación gastrointestinal es frecuente. En un 3% de las biopsias obtenidas en endoscopias orales, realizadas por síntomas digestivos no aclarados a estos enfermos en nuestro medio, se hallan amastigotes de *L. infantum*. Este parásito puede invadir cualquier parte del tubo digestivo, produciendo síntomas esofágicos, epigastralgia, diarrea, tenesmo rectal o ninguna manifestación (5). El aparato respiratorio también puede ser colonizado por este parásito. Así, se ha demostrado su presencia en alvéolos, septos alveolares y pleura. Sin embargo, las manifestaciones clínicas respiratorias son menos frecuentes, habiéndose asociado su presencia con neumonitis, derrame pleural y adenopatías mediastínicas (5). La afectación cutánea aislada es rara en los pacientes infectados por el VIH. En cambio, está perfectamente documentada la presencia de lesiones cutáneas en coexistencia con LV. El parásito se ha encontrado en zonas de piel sana, asociado a sarcoma de Kaposi y en lesiones herpéticas. Se han descrito nódulos y manifestaciones cutáneas similares a las de la dermatomiositis en relación con *L. infantum* en estos pacientes. También se puede observar afectación de la mucosa nasal, bucal y laríngea (5).

Sin embargo, los casos de enfermedad sintomática no representan más que un porcentaje no bien definido, pero en cualquier caso muy bajo, del total de las infecciones por *Leishmania* en la población infectada por VIH. La mayor parte de los casos son completamente subclínicos. Por ello, en estos enfermos, al realizar procedimientos diagnósticos con otra finalidad, nos podemos encontrar en algunos casos con la presencia de amastigotes tisulares del parásito cuyo papel patógeno es incierto o definitivamente nulo. La LV subclínica se encuentra en pacientes con cualquier recuento de linfocitos CD4+, al contrario de los que sucede con las formas sintomáticas (3). En pacientes con tratamientos antirretrovíricos no potentes esta entidad podía progresar hacia LV sintomática. Sin embargo, la TARGA parece prevenir dicha evolución, al menos a medio plazo (20). Se desconoce cuál es la prevalencia actual de esta forma clínica de leishmaniasis, así como si su presencia ejerce algún efecto negativo sobre la evolución de la infección por VIH.

DIAGNÓSTICO

Durante la fase aguda de una LV aparece una potente respuesta humoral, con producción de anticuerpos antiparasitarios. Sin embargo, un alto porcentaje de pacientes coinfectados por VIH pueden no mostrar niveles séricos detectables de los mismos (5), lo que limita seriamente la utilidad de la serología en el diagnóstico de la LV en esta población. El rendimiento de este procedimiento diagnóstico depende de la técnica

utilizada. Así, la inmunofluorescencia indirecta comercial presenta una sensibilidad (S) del 30%, una especificidad (E) del 97% y un valor predictivo positivo (VPP) del 97% (21). Se han observado reacciones cruzadas con micobacterias (21, 22), lo que supone un problema añadido. El enzimoimmunoanálisis muestra una S alrededor del 70% (5). El *western-blot* es la técnica serológica de mayor S, alcanzando hasta el 83%.

El estándar diagnóstico de la leishmaniasis en el paciente infectado por VIH continúa siendo la demostración del parásito en muestras tisulares, ya sea mediante visualización directa o cultivo. No obstante, en los últimos años se han desarrollado técnicas que identifican material genético o antígenos del mismo, que han venido a mejorar los procedimientos diagnósticos clásicos.

En España la muestra más empleada para la búsqueda de *L. infantum* es el aspirado de médula ósea (AMO). Se ha estimado que la S del examen directo, incluyendo extensiones finas y gota gruesa teñidos con Giemsa, está entre el 62%-93%, dependiendo en gran medida de la pericia del examinador. Para el cultivo se utilizan diversos medios, siendo los más comunes los agar-sangre, enriquecidos o no con RPMI, tales como el NNN (Novy-Nicolle-McNeal). Su sensibilidad ha oscilado en distintos estudios entre el 50%-100% (5). Dado que la toma del AMO comporta la realización de una maniobra invasiva, también se utilizan el examen y/o cultivo de sangre periférica total y de la capa leucocitaria, que obvia ese problema. La S del examen microscópico de sangre periférica en pacientes con LV sintomática oscila entre el 50%-68%, aunque su rendimiento es mínimo en los casos subclínicos, posiblemente debido a que la parasitemia en estos enfermos es de muy baja cuantía (5, 23). El cultivo de la capa leucocitaria de sangre periférica en pacientes coinfectados por VIH con LV sintomática alcanza una S del 89 % (24).

Probablemente en el futuro próximo la técnica diagnóstica de elección de la leishmaniasis será la detección de material genético del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es un procedimiento rápido, exento de interpretación subjetiva y útil en muestras obtenidas de modo no invasivo. Actualmente no se encuentra comercializada y su principal problema es la falta de estandarización, habiendo diferencias entre unas técnicas y otras en su diana, en el proceso de amplificación y en el modo de lectura del material amplificado. Así, entre otros, se han empleado como diana el ADN genómico (25) y los minicírculos del ADN del kinetoplasto (kADN) (26). Como procedimientos de amplificación se han usado la PCR simple (26), doble y anidada (25). Se han visualizado los productos de amplificación, además de por la tradicional electroforesis en gel, por medio de técnicas de hibridación (27) y ELISA (26). La S de en sangre periférica de la PCR llega a alcanzar el 97% y el 100% en AMO. El VPP de las técnicas específicas de especie son del 100% en ambas muestras (27, 28).

La PCR en sangre periférica puede ser, además, útil en la monitorización de la terapia. Así, se ha observado que unas semanas después de un tratamiento exitoso la parasitemia suele desaparecer. En los pacientes que recidivan precozmente, muchas veces, no se llega a negativizar la PCR. Además, el ADN del parásito puede volver a detectarse unas semanas antes de la recurrencia en pacientes que presentan una recidiva más tardía (25, 27, 29).

Recientemente se han desarrollado técnicas para la detección de antígenos de *Leishmania* en orina. De ellas, la más conocida es la aglutinación en partículas de látex, que se encuentra comercializada. Aunque todavía la experiencia clínica con este procedimiento no es amplia, sus resultados parecen muy prometedores en cuanto a sensibilidad y especificidad (30).

TRATAMIENTO

En la actualidad no existe una terapia de la LV en el paciente infectados por VIH que pueda considerarse completamente satisfactoria. Como tratamiento de primera elección se puede optar por la administración de sales de antimonio (Sb^v) o de anfotericina B deoxicolato (nivel de evidencia AII) (31).

El Sb^v es el tratamiento clásico de la LV (32). El antimonio de meglumina (Glucantime®), que es la formulación comercializada en España, se presenta en una solución que contiene 85 mg de Sb^v/ml. Las dosis recomendadas de Glucantime para tratar la LV en el paciente infectado por VIH es de 20 mg/kg/día de Sb^v base por vía IM o IV durante 28 días. Con esta pauta se consiguen tasas de respuesta clínica del 54-75%. Este tratamiento se ve gravado por la aparición de efectos adversos frecuentes y, a veces, severos. Entre ellos se incluyen hiperamilasemia, pancreatitis aguda, nefrotoxicidad y cardiotoxicidad. La tasa de mortalidad atribuible a efectos indeseables ha llegado a ser en algunas series del 12% (5, 32, 33). La aparición de cepas de *Leishmania* resistentes a Sb^v, supone un problema añadido, que aunque se ha documentado mejor con *L. donovani* en la LV india, puede afectar a *L. infantum* (32).

Debido a las limitaciones en la eficacia del Sb^v, la seriedad y frecuencia de los efectos indeseables y la posibilidad de resistencia, se han buscado otras alternativas terapéuticas. La más conocida es la anfotericina B deoxicolato (Fungizona®). Se administran 0.5-1 mg/kg/día en infusión IV lenta hasta una dosis total acumulada de 1-1.5 g. Sus efectos secundarios son muy frecuentes y, a veces, también graves, e incluyen fiebre, insuficiencia renal e hipopotasemia. En un ensayo clínico randomizado y abierto se comparó Sb^v con anfotericina B deoxicolato, sin observarse diferencias en la tasa de curación parasitológica inicial, ni en el análisis por intención de tratamiento (Sb^v 66% vs. anfotericina B 62%), ni en el estudio de los datos observados (Sb^v 85% vs. anfotericina B 93%). Tampoco se encontraron diferencias en la probabilidad de permanecer libre de recidiva 12 meses después de terminado el ciclo. La incidencia de efectos adversos fue similar en ambos grupos (31).

La anfotericina B liposomal y otras formulaciones lipídicas de la anfotericina B son también muy eficaces y aportan el beneficio añadido de una menor incidencia de nefrotoxicidad y de requerir ciclos de tratamiento más cortos (34). Por ello han sido aprobadas por la FDA para tratar la LV en inmunocompetentes e inmunodeprimidos. Su principal inconveniente es su elevado coste. Actualmente se pueden considerar un tratamiento alternativo a los antimoniales y a la anfotericina B deoxicolato (AII). No obstante, recientemente se han presentado los resultados preliminares de un estudio en el que se comparó Glucantime, administrado según la pauta usual, frente a anfo-

tericina B complejo lipídico a dosis de 5 mg/kg/día durante 5 ó 10 días. Se observó una eficacia similar para ambos regímenes, pero la incidencia de efectos secundarios en el grupo tratado con Sb^v fue mayor (35). De confirmarse estos hallazgos, y si se demuestra que el tratamiento con formulaciones lipídicas de anfotericina B es más eficiente que las pautas clásicas, es posible que estas drogas pasen a ser el tratamiento de elección de la LV en los pacientes infectados por VIH en los próximos años.

Otros fármacos se han usado también en el tratamiento de la LV del paciente coinfectado por el VIH, pero existe menos experiencia con ellos. Entre éstos se incluyen la pentamidina, los azoles, el alopurinol, la paramomicina y la atovaquona. Especial interés reviste la miltefosina, un fármaco inicialmente diseñado como antineoplásico, que se ha mostrado igual de eficaz y menos tóxico que la anfotericina B en el kala-azar indio (AII) (36). La enorme ventaja de este tratamiento es su administración oral. No obstante, la experiencia actual con este fármaco en la LV del paciente coinfectado por VIH es mínima.

Las recidivas tras tratar un primer episodio de LV con éxito son muy frecuentes. Los datos disponibles acerca del efecto de la TARGA sobre la tasa de recurrencias de esta enfermedad son escasos y contradictorios. Se han comunicado una alta tasa de recidivas, incluso en pacientes que presentan una buena respuesta virológica e inmunológica a la TARGA (37), mientras que en otras series las recurrencias se han observado fundamentalmente en individuos con escasa repoblación de linfocitos CD4+ (38). En un estudio multicéntrico andaluz (JA Mira, datos no publicados) las recidivas de la LV se produjeron en pacientes con una inmunorreconstitución deficiente, generalmente debida a falta de adherencia a la TARGA. No hay datos acerca de si el tratamiento de las recidivas debe abordarse de una forma distinta o no al de la enfermedad primaria. Parece razonable intentar una terapia con una droga alternativa a la que se usó inicialmente (BIII).

Una cuestión aparte es el manejo del hallazgo de una LV de forma fortuita en un enfermo asintomático o sin síntomas atribuibles a LV. Aunque este es un problema no resuelto, dada la toxicidad de los fármacos antileishmaniásicos y que el tratamiento con TARGA parece prevenir la progresión a LV sintomática (20), probablemente lo más aconsejable sea hacer un seguimiento clínico y diferir el tratamiento en tanto no haya síntomas imputables a la leishmaniasis (CIII).

PROFILAXIS

Como medidas de prevención primaria de la leishmaniasis se pueden plantear la limitación del reservorio, el control del vector y la vacunación del hospedador. La desecación de charcas, el uso de mallas antimosquito y el uso de insecticidas y repelentes son acciones dirigidas contra el vector, al igual que las campañas tendentes a evitar el uso de material de inyección compartido entre los consumidores de drogas parenterales. La eliminación del reservorio es imposible, al existir un ciclo antroponótico, por ser la leishmaniasis canina una enfermedad con pobre respuesta al tratamiento y el sacrificio de los perros enfermos una medida muchas veces mal aceptada por los propietarios.

Actualmente, no existe ninguna vacuna eficaz contra *Leishmania*. Diversos preparados están en situación más o menos avanzada de prueba. Las vacunas de parásitos muertos son las más antiguas y en ensayos clínicos mostraron una baja eficacia. Las constituidas por parásitos vivos atenuados por manipulación genética han sido eficaces experimentalmente, aunque su producción y distribución son complejas. Las vacunas basadas en antígenos recombinantes son las más modernas. Estas se pueden administrar como proteínas purificadas, como el ADN "desnudo" que codifica los antígenos o por medio de vectores bacterianos. Todas ellas se han probado en modelos murinos. Las vacunas de ADN desnudo son las más atractivas, debido a que son capaces de inducir respuestas inmunes protectoras sin necesidad de adyuvantes, son sencillas de producir a gran escala y de distribuir, debido a la estabilidad del ADN (6).

Dada la tendencia de la LV a recidivar es razonable plantear la realización de quimioprofilaxis secundaria una vez tratado el primer episodio (BII), aunque no hay estudios prospectivos que hayan demostrado su eficacia. Se puede considerar la interrupción de la quimioprofilaxis en pacientes que consiguen una cifra de linfocitos CD4+ mantenida por encima de 350 cel/ml con TARGA y en los que no se han producido recidivas durante un año (BIII) (39).

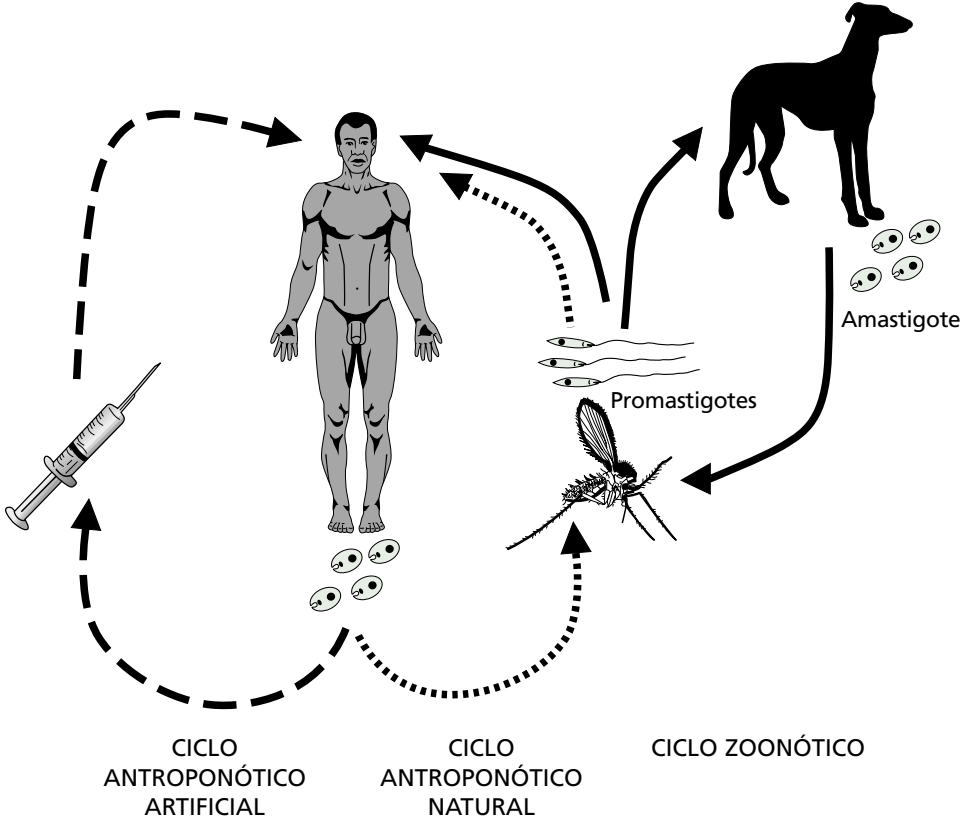
Se desconoce cual es la pauta de quimioprofilaxis secundaria de elección (19). En estudios retrospectivos se ha demostrado que son útiles la administración de una dosis mensual de antimoniales (40) y la anfotericina B liposomal a dosis de 200-350 mg/mes (19). La administración de pentamidina a dosis de 300 mg IV/3-4 semanas puede considerarse una alternativa.

CONSIDERACIONES FINALES

Pese a la marcada reducción de la incidencia de LV que se ha observado en pacientes infectados por VIH de nuestra área en los últimos años, la coinfección VIH/*Leishmania* continúa planteando problemas. En zonas de baja endemia, como la nuestra, aún siguen observándose una cifra no despreciable de casos, en parte por recidiva de episodios previos y, en parte, casos nuevos que inciden especialmente en focos donde aún hay un número significativo de consumidores de drogas parenterales que comparten material de inyección. Pero además, en países endémicos en vías de desarrollo, es muy probable que el número de casos crezca en los años venideros. La medida en que este fenómeno puede afectar a una zona como la nuestra, en la que los movimientos migratorios son frecuentes, está aún por aclarar. Además, el tratamiento y profilaxis de esta enfermedad plantean aún suficientes aspectos no resueltos como para que sigamos teniéndola en cuenta.

Figura 2. Ciclos epidemiológicos de *Leishmania infantum*:

ciclo zoonótico (líneas continuas),
ciclo antroponótico natural (líneas punteadas) y
ciclo antroponótico artificial (líneas discontinuas).



Bibliografía

1. World Health Organization. Leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infections. Fact Sheet Nº 116. www.who.int/inf-fs/en/fact1116.html.
2. Fernández-Rivera J, Macías J, García-García JA, et al. Efectos de la terapia antirretrovírica de alta eficacia sobre la forma de presentación del sida definido por episodios clínicos. *Med Clin (Barc)* 2002; 118: 686-88.
3. Pineda JA, Gallardo JA, Macías J, et al. Prevalence of and factors associated with visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients in Southern Spain. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2419-22.
4. 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; 40:762-67.
5. 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.
6. Handman H. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 2001; 229-43.
7. Wolday D, Berhe N, Britton S, Akuffo H. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin 12 and interleukin-18 response to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS* 2000; 14: 921-929.
8. Kubar J, Marty P, Lelievre A, et al. Visceral leishmaniosis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. *AIDS* 1998;12:2147-53.
9. Morales MA, Cruz I, Rubio JM, et al. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002; 185: 1533-37.
10. Bernier R, Barbeau B, Trembley MJ, Olivier M. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor kappa-B elements. *J Immunol* 1998; 160: 2881-2888.
11. Nigro L, Cacopardo B, Preisser W, et al. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 142-145.
12. Berhe N, Wolday D, Hailu A, et al. HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS* 1999; 13: 1921-1925.
13. Macías J, Pineda JA, Gallardo JA, Lissen E. El impacto clínico de la leishmaniasis visceral sintomática sobre la infección por VIH-1. *Med Clin (Barc)* 1999; 112: 157.
14. Molina R, Lohse JM, Pulido F, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 51-53.
15. Pineda JA, Macías J, Morillas F, et al. Evidence of increased risk for *Leishmania infantum* infection among HIV-seronegative intravenous drug users from Southern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:354-57.
16. Pineda JA, Martín-Sánchez J, Macías J, Morillas F. *Leishmania* spp. infection in intravenous drug users. *Lancet* 2002; 360: 950-51.

17. Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J, Acedo-Sánchez C, Pineda JA, Macías J, Sanjuan-García J. *Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. *Exp Parasitol* 2002; 100:71-74.
18. Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002; 359:1124-25.
19. 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)*. 2001; 80:54-73.
20. de la Rosa R, Pineda JA, Delgado J, et al. Influence of highly active antiretroviral therapy on the outcome of subclinical visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 633-635.
21. Gallardo JA, Pineda JA, Macías J, Torronteras R, Lissen E. Specificity of a commercial indirect immunofluorescence technique in the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV-1. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:383.
22. López-Vélez R, Turientes MC, Gómez-Mampaso E. Reacciones cruzadas de la serología a *Leishmania infantum* por inmunofluorescencia indirecta en pacientes HIV+ y HIV- con tuberculosis activa. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16: 130-31.
23. Delgado J, Pineda JA, Macías J, et al. Low sensitivity of peripheral blood smear for diagnosis of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Microbiol* 1998;36:315-6.
24. Riera C, Gállego M, Fisa R, et al. Utilidad del cultivo de sangre periférica en el diagnóstico de la leishmaniosis visceral en pacientes VIH positivos y VIH negativos. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2002; 20 (Suplem. 1): 64.
25. Fisa R, Riera C, Ribera E, Gallego M, Portus 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* 2002;96 (Suppl 1):S191-4.
26. Martín-Sánchez J, López-López MC, Acedo-Sánchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Márquez F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology* 2001; 122:607-15.
27. Lachaud L, Dereure J, Chabbert 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* 2000 ;38:236-40.
28. Martín-Sánchez J, Pineda JA, Andreu-López M, 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* 2002 (en prensa).
29. Pizzuto M, Piazza M, Senese D, et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 357-61.
30. Sarkari B, Chance M, Hommel M. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta Trop* 2002; 82: 839-848.
31. Laguna F, Lopez-Velez R, Pulido F, et al. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. *AIDS* 1999;13:1063-9.
32. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354:1191-99.

33. Delgado J, Macías J, Pineda JA, et al. High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:766-9.
34. Canora Lebrato J, Troncoso García E, Escobar T, Hernández-Quero J. Tratamiento de la coinfección VIH-leishmaniasis visceral con un nuevo régimen de anfotericina B liposomal (AMB-L). *Med Clin (Barc)* 2001; 116: 395.
35. Laguna F, Videla S, Jiménez-Mejías E, et al. Amphotericin B lipid complex vs. meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a multicenter, open label, blinded, randomization, parallel controlled clinical trial. 8th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Chicago (EEUU) 2001; abstract 33.
36. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002;347:1739-1746.
37. Villanueva JL, Alarcón A, Bernabeu-Wittel M, et al. Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in the era of the highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 798-801.
38. Casado JL, López-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* 2001; 20: 202-5.
39. Berenguer J, Cosín J, Miralles P, López J, Padilla B. Discontinuation of anti-Leishmania prophylaxis in HIV-infected patients who have responded to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 14: 2948-50.
40. Ribera E, Ocaña I, de Otero J, Cortés E, Gasser I, Pahissa A. Prophylaxis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Med* 1996;100:496-501.