

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Avaliação de diferentes abordagens para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana

por

Tália Santana Machado de Assis

Belo Horizonte

Julho/2012

TESE DDIP-CPqRR T.S. MACHADO DE ASSIS 2012

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação de diferentes abordagens para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana

por

Tália Santana Machado de Assis

**Tese apresentada com vistas à obtenção do Título
de Doutor em Ciências na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias**

Orientação: Dra. Ana Lúcia Teles Rabello

Coorientação: Dr. Guilherme Loureiro Werneck

Belo Horizonte

Julho/2012

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M149a **Machado de Assis, Tália Santana.**
2012

Avaliação de diferentes abordagens para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana / Tália Santana Machado de Assis. – Belo Horizonte, 2012.

xiii, 115 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 92 - 115

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Visceral/diagnóstico 2. Testes de Aglutinação/métodos 3. Imunocromatografia/métodos I. Título. II. Rabello, Ana Lúcia Teles (Orientação). III. Werneck, Guilherme Loureiro (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Avaliação de diferentes abordagens para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana

por

Tália Santana Machado de Assis

Tese avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Ana Rabello - Presidente

Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Dr. Sérgio Willian Viana Peixoto

Dra. Mariângela Carneiro

Dr. José Ueleres Braga

Suplente:

Dra. Maria Helena Franco Morais

Tese defendida e aprovada em: 04/07/2012

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.
O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que comer.
O saber se aprende com os mestres.
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida”.

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Fabiano, querido companheiro.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar o meu caminho e me confortar nos momentos de ansiedade.

À minha orientadora, Dra. Ana Rabello, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, por estar sempre disposta a escutar e dividir, pelas ricas discussões, delicadeza e confiança. Agradeço pelas oportunidades que me fizeram crescer, não só profissionalmente, mas como pessoa.

Ao meu co-orientador, Dr. Guilherme Werneck, pelo apoio fundamental e paciência, pela agradável convivência e ricas discussões.

Aos pesquisadores, Dr. Carlos Henrique N. Costa, Dra. Dorcas L. Costa, Dra. Aldina Barral e Dr. Gustavo Romero, pela colaboração indispensável ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas, pela agradável convivência, de forma especial à Dra. Zélia Profeta da Luz, ao Dr. Edward Oliveira, Dra. Vanessa Peruhype Magalhães e a Dra. Luciana Gomes, sempre queridos, atenciosos e dispostos a trocar idéias.

À Dra. Isabela Cerávolo, minha orientadora na graduação, eterna gratidão pela confiança.

À amiga-irmã, Eliane, pelo apoio incondicional, frente a tantas viagens, sua casa sempre esteve aberta para me acolher e seus ouvidos para me escutar.

À minha querida mãe, Norma, pelo amor, força, cuidado e presença constantes.

Ao meu pai, Darlan, pelo exemplo de vida e por respeitar e valorizar as minhas escolhas.

Às minhas queridas irmãs, Amanda e Andressa, fontes de alegria e inspiração.

Ao meu marido, Fabiano, pelo apoio incondicional, sempre paciente, dedicado e amoroso. Por me ensinar a ver o lado bom das coisas e a valorizar as coisas simples da vida.

À tia Mara, tio Benedito e a Tatiana, queridos incentivadores, exemplos de força, com quem eu pude contar em todos os momentos.

À Marly e meus cunhados Denilson, Junia, Magaly, José Antônio, Daniela e André pela amizade e força.

Ao corpo de funcionários da Biblioteca do CPqRR pelo apoio à obtenção das informações científicas, pela revisão da normalização e pela catalogação da tese.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pos-graduação em Ciências da Saúde do CPqRR que tornou possível a realização dessa tese.

À todos que, de alguma forma e em algum momento, contribuíram para concretização desta realização profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICO	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 As leishmanioses	17
3.2 A leishmaniose visceral	19
3.2.1 Aspectos históricos	19
3.2.2 Aspectos gerais	20
3.2.3 Manifestações clínicas e diagnóstico diferencial	23
3.2.4 Diagnóstico	24
3.2.4.1 Exames parasitológicos	25
3.2.4.2 Exames moleculares	26
3.2.4.3 Exames imunológicos	28
3.2.4.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta	28
3.2.4.3.2 Ensaio imunoenzimático	30
3.2.4.3.3 Teste de aglutinação direta	35
3.2.4.3.4 Teste rápido	40
3.3 Modelos de predição	46
3.4 Análise de classes latentes	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Artigo 1 - Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil	51
4.2 Artigo 2 - Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil	57
4.3 Artigo 3 - Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil	65
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	80
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
7 ANEXOS	83
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE GRÁFICO

- Gráfico 1.** Casos de leishmaniose visceral e tegumentar notificados ao Ministério da Saúde entre 2007 e 2010. 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resumo dos estudos realizados avaliando a reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da LV humana, em pacientes não portadores do HIV.	30
Tabela 2.	Resumo dos estudos realizados avaliando o ensaio de imunossorbância ligado à enzima para o diagnóstico da LV humana, em pacientes não portadores do HIV.	33
Tabela 3.	Resumo dos estudos realizados avaliando o teste de aglutinação direta para o diagnóstico da LV humana, em pacientes não portadores do HIV.	38
Tabela 4.	Resumo dos estudos realizados avaliando o teste rápido para o diagnóstico da LV humana, em pacientes não portadores do HIV.	43
Tabela 5.	Características apresentadas por diferentes testes diagnósticos.	45
Tabela 6.	Perfis e pontuação relacionados a árvore de classificação apresentada na página 5 do artigo <i>Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases</i> , 6; 1-7; 2012.	90
Tabela 7.	Desempenho dos diferentes modelos, variação de pontos e cut-off para escores na árvore de classificação e regressão (CART) apresentada na página 5 do artigo <i>Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases</i> , 6; 1-7; 2012.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS	<i>2, 2' azino bis 3-ethylbenzothiazolie sulphonic acid</i>
ACL	Análise de classes latentes
AVC	Análise de validação clássica
CART	Árvore de classificação e regressão
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DAT	Teste de aglutinação direta
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAST	Fast Agglutination Screening Test
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC	Intervalo de confiança
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	Liver infusion tryptose
LT	Leishmaniose tegumentar
LPC	Laboratório de Pesquisas Clínicas
LV	Leishmaniose visceral
ng	Nanogramas
NNN	Novy-Nicolle-McNeal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RLM	Regressão logística múltipla
ROC	Receiver Operating Characteristic
rK39	Antígeno recombinante rK39
TCB	Tampão carbonato bicarbonato
T20	Tween 20
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
WHO	World Health Organization
μL	Microlitros
μm	Micrômetro

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária grave que afeta anualmente 500.000 pessoas em 65 países. No Brasil, mais de 15.000 casos de LV foram registrados entre os anos de 2007 e 2010, com 880 mortes. Esta elevada taxa de letalidade está, em parte, relacionada à ineficiência dos serviços de saúde em diagnosticar e tratar precocemente os pacientes. O diagnóstico da LV exige suspeição clínica e confirmação laboratorial eficientes. Assim, uma reestruturação do algoritmo e do arsenal de métodos diagnósticos disponíveis nos serviços de saúde pode ajudar a melhorar este cenário, aumentando o acesso e a disponibilização de testes nos municípios. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de diferentes abordagens para o diagnóstico da LV humana no Brasil, através da avaliação do desempenho do teste de aglutinação direta (DAT) e do teste rápido IT-LEISH[®]; do desenvolvimento e validação de modelos preditivos clínico-laboratoriais e da avaliação de métodos diagnósticos pela análise de classes latentes (ACL). O grupo de estudo compreendeu 404 pacientes, residentes no Piauí, Maranhão, Bahia e Minas Gerais, com suspeita de LV, submetidos ao exame do aspirado de medula óssea e à coleta de sangue para a realização dos testes sorológicos. Para a avaliação do desempenho do DAT e do IT-LEISH[®] foi utilizada a análise de validação clássica (AVC) utilizando como padrão de referência o exame do aspirado de medula óssea. Para o desenvolvimento e a validação dos modelos preditivos foram utilizados dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes avaliados. Os modelos preditivos utilizando regressão logística múltipla (RLM) foram desenvolvidos no software STATA[®] e aqueles utilizando árvore de classificação e regressão (CART) foram desenvolvidos no software SPLUS[®]. Para a avaliação da aplicabilidade da ACL foram utilizados dados do estudo de validação do IT-LEISH[®] e do DAT e a análise foi realizada no software R. O DAT e o IT-LEISH[®] apresentaram, pela AVC, sensibilidades e especificidades de 90 e 93%; 93 e 97%, respectivamente. O modelo preditivo composto pelas variáveis clínicas e laboratoriais associadas ao teste rápido foi o que apresentou melhor desempenho, tanto pela RLM, quanto por CART (sensibilidade de 90,1% e especificidade de 97,2-97,4%). A ACL mostrou-se útil na validação de testes diagnósticos para LV no Brasil, estimando para o DAT e o IT-LEISH[®] sensibilidades de 88,5 e 94% e especificidades de 95,4 e 100%, respectivamente. Diante do elevado desempenho apresentado, o DAT e o teste rápido IT-LEISH[®] estão indicados para o diagnóstico da LV humana no Brasil. Os modelos preditivos desenvolvidos são úteis e poderiam ser utilizados em centros de referência para a doença no país. A ACL está indicada para validação de testes diagnósticos no país e quando possível deve ser utilizada.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe parasitic disease that affects 500 000 people yearly in approximately 65 countries. In Brazil, more than 15.000 VL cases were reported between 2007 and 2010, with 880 deaths. This high fatality rate is partly related to the inefficiency of health services to diagnose and treat early patients. The diagnosis of VL requires effective clinical suspicion and laboratory confirmation. Thus, a restructuring of the algorithm and the arsenal of available diagnostic methods in health services can help improve this scenario, by increasing the access and availability of tests in the municipalities. The objective of this study was to evaluate the performance of several approaches for the diagnosis of human VL in Brazil, through of evaluation of performance of DAT and rapid test IT-LEISH[®]; of developing and validating of predictive models and of evaluation of diagnostic methods by the latent class analysis (LCA). The study group was composed by 404 patients, from the states of Piauí, Maranhão, Bahia and Minas Gerais, with suggestive clinical of VL, submitted to the examination of bone marrow aspirate and blood collection for the performance of serological tests. To evaluate the performance of the DAT and the rapid test IT-LEISH[®] was used the classic validation analysis, using as reference standard the examination of bone marrow aspirate. To develop and validate the predictive models were used epidemiological, clinical and laboratory data of the patients. The predictive models using logistic regression were developed in STATA[®] software and those using classification and regression tree (CART) were developed in the software SPLUS[®]. To evaluate the applicability of the LCA were used data from the validation study of the rapid test IT-LEISH[®] and the DAT and the analysis was performed in software R. The DAT and the rapid test IT-LEISH[®] showed, by the classic validation analysis, sensitivities and specificities of 90 and 93%, 93 and 97% respectively. The predictive model composed of clinical-laboratory variables and rapid test IT-LEISH[®] developed using both logistic regression and the model CART showed the best performance (sensitivity 90.1% and a specificity of 97.2 to 97.4%). The LCA proved to be a useful tool for the validation of diagnostic methods for human VL in Brazil, estimating for the DAT and the rapid test IT-LEISH[®] sensitivities of 88.5 and 94% and specificities of 95.4 and 100% respectively. The DAT and the rapid test IT-LEISH[®] showed high performance and are indicated for the diagnosis of VL in Brazil. The predictive models developed are useful and could be used in reference centers for VL in the country. The LCA is indicated for validation of diagnostic tests in Brazil and when possible should be used.

1 INTRODUÇÃO

Contexto e apresentação dos trabalhos

Os três artigos que integram esta tese fazem parte da linha de pesquisa: “Clínica e diagnóstico das leishmanioses”, desenvolvida no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Em 2004, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde abriu um edital para seleção de projetos na área de validação de testes rápidos para LV, tendo uma equipe de quatro laboratórios de pesquisa no país, coordenada pelo LPC, aprovado o projeto intitulado “Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH[®] para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana”. Neste estudo, o desempenho do teste rápido IT-LEISH[®] foi comparado com a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando antígeno solúvel de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e antígeno recombinante K39 (rK39). Posteriormente, conforme solicitado pelo Ministério da Saúde, o desempenho do DAT foi também avaliado nas mesmas amostras biológicas.

Os resultados da avaliação do DAT e do teste rápido IT-LEISH[®] compõem o primeiro trabalho apresentado nesta tese, designado: *Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105; 81-85, 2011. Trata-se de um estudo prospectivo multicêntrico, realizado em quatro estados do Brasil, incluindo como sujeitos da pesquisa pacientes portadores da síndrome clínica sugestiva de LV, submetidos paralelamente ao exame do aspirado de medula óssea, utilizado como padrão de referência. Os resultados do estudo permitiram recomendar o uso do DAT e do teste rápido IT-LEISH[®] para o diagnóstico da LV no Brasil, sugerindo um estudo piloto para avaliação da implantação destes testes em serviços de saúde. Atualmente, um estudo de avaliação da implantação destes dois testes está sendo realizado pela equipe do LPC-CPqRR, em Ribeirão das Neves, Minas Gerais, com financiamento do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico Prioritário para o Sistema Único de Saúde / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – PPSUS / FAPEMIG.

Como resultado do estudo citado acima, um banco de dados contendo dados clínicos dos pacientes estava disponível, assim, baseado em estudos realizados para outras doenças, surgiu a idéia de abordar o diagnóstico da LV com um olhar diferente, através do desenvolvimento e da validação de modelos preditivos clínico-laboratoriais utilizando sistemas de pontuação. Os resultados do desenvolvimento e da validação de modelos

preditivos formam o segundo artigo apresentado nesta tese, intitulado: *Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6; 1-7; 2012. Neste estudo, os modelos preditivos clínico-laboratoriais apresentaram desempenho satisfatório e aplicação simples e prática. Os modelos desenvolvidos poderiam ser utilizados no diagnóstico da LV humana em serviços de saúde do Brasil.

Um problema observado no estudo de validação do teste rápido IT-LEISH[®] foi a utilização do exame do aspirado de medula como padrão de referência. Sabe-se que este teste parasitológico é invasivo e apresenta baixa sensibilidade, assim, setenta e dois casos de LV humana foram excluídos do estudo original, por não preencherem o critério de inclusão para caso de LV, ou seja, clínica sugestiva da doença e parasitológico positivo. Esta limitação do padrão de referência utilizado fez com que nossa equipe buscasse novas alternativas de validação de testes diagnósticos, tendo sido escolhida a ACL.

No terceiro artigo que forma esta tese, intitulado: *Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil* (aceito para publicação na revista *Tropical Medicine & International Health*) é descrita a avaliação da ACL para a validação de testes diagnósticos para LV no Brasil. Para a aplicação da ACL foram utilizados dados gerados no estudo de validação do DAT e do teste rápido IT-LEISH[®]. A ACL apresentou resultados consistentes e mostrou-se adequada para a validação de testes diagnósticos para LV no país.

Os três estudos colaboraram para a recomendação do grupo de que a RIFI seja substituída pelo teste rápido IT-LEISH[®] e pelo DAT para o diagnóstico da LV humana nos serviços de saúde pública do Brasil.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o desempenho de diferentes abordagens para o diagnóstico da LV humana no Brasil.

Objetivos específicos

- Comparar o desempenho do DAT e do teste rápido IT-LEISH[®] para o diagnóstico da LV humana;
- Desenvolver e validar modelos preditivos clínico-laboratoriais para o diagnóstico da LV humana;
- Avaliar a aplicabilidade da ACL para o diagnóstico da LV humana.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 As leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. O protozoário é transmitido ao homem e a outros hospedeiros através da picada de insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Estes são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros.

Existem dezenas de espécies de leishmânias, que se agrupam em dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*). No subgênero *Leishmania*, os protozoários crescem facilmente em cultura, provocam grandes lesões nodulares em hamster e se desenvolvem no intestino médio e anterior do vetor. Já os parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento pobre em meio de cultura e lento em hamsters experimentalmente infectados, alojando-se no intestino posterior do vetor (Lainson et al., 1986; WHO, 2010a).

Em seu ciclo de desenvolvimento, a *Leishmania* assume duas formas evolutivas principais: amastigota e promastigota. A primeira possui uma forma esférica, sem flagelo livre, dimensões variando entre 2 a 5 μm e é encontrada no interior de macrófagos dos hospedeiros vertebrados onde se multiplica. Já a segunda, apresenta uma forma alongada, com flagelo livre, dimensões variando entre 15 a 35 μm e é encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, onde se reproduz (Lainson et al., 1986).

Este grupo de doenças é clinicamente dividido em leishmaniose tegumentar (LT), a qual inclui as formas cutânea, mucosa e muco-cutânea e, leishmaniose visceral (LV). A forma cutânea é a mais comum da doença, produzindo úlceras em partes expostas do corpo, tais como pernas e braços. Já a forma mucosa pode causar lesões destrutivas das mucosas do nariz, boca e garganta, além de cavidades e tecidos circundantes (Brasil, 2007). A LV é a forma mais grave da doença, afetando órgãos vitais, como o fígado e o baço, sendo fatal se não tratada (Brasil, 2006).

Atualmente as leishmanioses ocorrem em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), sendo consideradas endêmicas em 98 países (World Health Organization - WHO, 2010a). Estima-se que 90% de todos os casos de LT ocorram na Bolívia, Peru, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita, Síria e Brasil e que cerca de 90% de todos os casos de LV ocorram no Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. Uma incidência anual mundial de

500.000 casos de LV e 1,5 milhões de casos de LT são estimados (WHO, 2010ab), com mortalidade estimada por LV calculada em 50.000 casos anualmente (WHO, 2010a).

No Brasil, as leishmanioses se encontram em franco processo de expansão e urbanização (Brasil, 2006 e 2007). Entre 2007 e 2010, uma média anual de 22.510 casos de LT foi notificada (Gráfico 1) e em 2003 a doença já era autóctone em todos os estados brasileiros (Brazil, 2007). Neste mesmo período, uma média anual de 3.690 casos de LV foi registrada (Gráfico 1) e em 2002, todos os estados brasileiros apresentavam autoctonia da doença (Brazil, 2006; Maia-Elkhoury et al., 2008). De acordo com o Ministério da Saúde, entre os anos de 2007 e 2010, 880 mortes por LV foram relatadas (Brasil, 2011). Entre as doenças parasitárias, a elevada taxa de letalidade da LV só é superada pela malária (Chappuis et al., 2007).

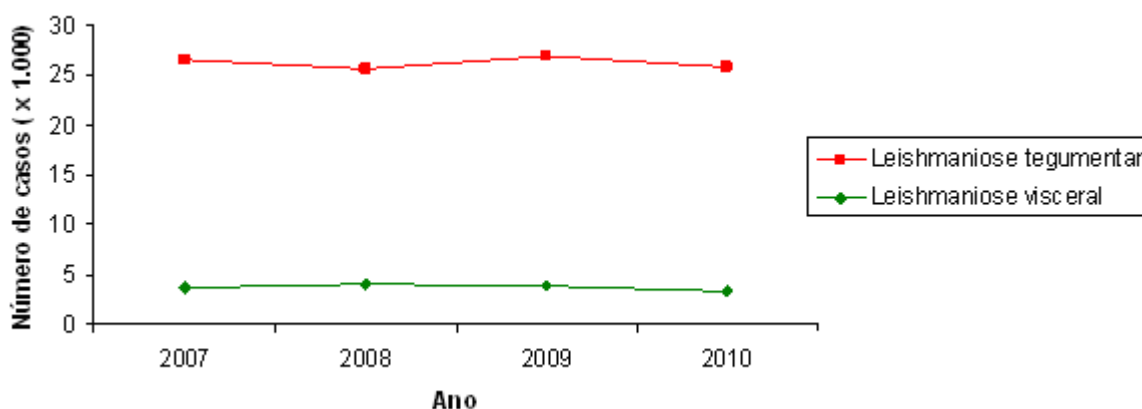


Gráfico 1 - Casos de leishmaniose visceral e tegumentar notificados ao Ministério da Saúde entre 2007 e 2010

A pobreza, a má nutrição, o descaso, a discriminação, as mudanças ambientais, a urbanização e os processos migratórios estão intimamente relacionados com o processo de expansão e urbanização das leishmanioses, tornando este grupo de doenças um sério impedimento para o desenvolvimento sócio-econômico em diferentes regiões endêmicas (WHO, 2010abc).

Sarnoff et al. (2010) avaliando o fardo econômico da LV sobre famílias acometidas pela doença em Bihar na Índia, relataram que 87% destas foram forçadas, durante o curso da doença, a fazer empréstimos para cobrir os gastos com a saúde, favorecendo ainda mais a pobreza nesta localidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em regiões pobres como Bihar, que notifica cerca de 85% dos casos de LV da Índia, a doença acomete principalmente famílias que recebem menos de um dólar diário (WHO, 2010a).

Em muitas regiões, pacientes e familiares afetados pela LV tornam-se mais pobres devido aos custos diretos (custos do diagnóstico e tratamento) e indiretos (por exemplo: dias de trabalho perdidos) pela doença (Chappuis et al., 2007). Na realidade brasileira, onde o SUS é o principal financiador de serviços e tem como pressupostos a universalidade e a integralidade da atenção, a discussão econômica ganha relevância frente à necessidade de aplicar recursos de modo apropriado.

As estratégias atualmente preconizadas pela OMS para o controle das leishmanioses são o diagnóstico rápido e o tratamento dos pacientes, o controle dos vetores, através de inseticidas residuais e redes tratadas com inseticidas, o desenvolvimento de projetos em educação em saúde, com o desenvolvimento de materiais didáticos e instrucionais e a detecção, com a devida contenção de epidemias em estágios iniciais (WHO, 2010ac).

3.2 A leishmaniose visceral

3.2.1 Aspectos históricos

As primeiras descrições do agente etiológico da LV foram feitas em 1903 por William Boog Leishman (1865-1926) e Charles Donovan (1863-1951). Na ocasião, Leishman observou corpúsculos em preparações de baço de um soldado falecido, procedente de Dumdum na Índia e Donovan observou estes parasitos em aspirados esplênicos de um menino hindu. Neste mesmo ano, Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922) e Félix Étienne Pierre Mesnil (1868-1938), descreveram o agente como *Piroplasma donovani*, sendo esta descrição posteriormente corrigida por Ronald Ross (1857-1932) para *Leishmania donovani* (Gibson, 1983; Lainson et al., 1986).

Leonard Rogers (1868-1962), em 1904, foi o primeiro a conseguir cultivar o parasito e observou sua forma flagelada em meios de cultivo (Rogers, 1904), e em 1908, Charles Jules Henri Nicolle (1866-1936) demonstrou o papel do cão como hospedeiro da *L. donovani*. Em 1931, a transmissão da *Leishmania* foi obtida pela picada de flebotomíneos em hamsters e estes foram formalmente incriminados como vetores (Lainson et al., 1986).

O primeiro caso da doença no Brasil foi descrito em 1913 por Migone e tratava-se de um paciente que havia contraído a doença no Mato Grosso (Migone, 1913). Em 1934, Henrique Penna realizando um estudo sobre a febre amarela na região amazônica observou a presença de amastigotas em 41 das 47.000 amostras de fígado avaliadas (Penna et al., 1934). A partir destes resultados, em 1936, Evandro Serafim Lobo Chagas (1905-1940) criou no Instituto Oswaldo Cruz uma comissão para estudar a LV no Brasil (Gibson, 1983).

Entre 1936 e 1939, extensos estudos foram realizados na região norte e nordeste, demonstrando a doença no homem e em cães e o flebotomíneo como vetor. Foi graças aos estudos desenvolvidos por diversos pesquisadores, tais como Leônidas de Mello Deane (1914-1993) e Maria José von Paumgartten Deane (1916-1995) em 1954, Sobral, Ceará, que se iniciaram as primeiras campanhas governamentais para o reconhecimento das áreas endêmicas e controle da LV no Brasil (Lainson et al., 1986).

3.2.2 Aspectos gerais

A LV é causada por espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo Donovanii, que inclui: *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania (Leishmania) donovani* (Ross, 1903) e *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937. Recentemente, a origem e a posição taxonômica da *Leishmania (L.) chagasi* vêm sendo discutidas (Dantas-Torres, 2006ab; Shaw, 2006). Com relação à origem, alguns autores acreditam que esta espécie foi importada da Europa durante a colonização espanhola e portuguesa (Killick-Kendrick, 1985; Rioux et al., 1990), outros acreditam que o parasito estaria presente nas Américas antes da colonização européia (Lainson & Rangel, 2005). Dantas-Torres (2006a) ressalta que talvez nunca se saiba a origem deste parasito.

Com relação à taxonomia da *L. chagasi*, sua identidade tornou-se objeto de questionamento em 1999, com base em resultados do estudo de Maurício et al. (1999). Desde então, muitos autores têm considerado a *L. chagasi* e a *L. infantum* como sendo a mesma espécie. Segundo Dantas-Torres (2006a), até Cunha, um ano após ter descrito a *L. chagasi*, concluiu que o agente da LV nas Américas era idêntico a *L. infantum*. Um fato que dificulta a comparação dos resultados dos estudos taxonômicos deste parasito é que diferentes técnicas têm sido utilizadas para a classificação (Dantas-Torres, 2006b). De acordo com Shaw (2006) há ainda muitas questões relativas à identidade da *Leishmania chagasi* não respondidas, sendo mais prudente utilizar o nome *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

No Brasil, a LV é causada pela *L. infantum chagasi* e é transmitida naturalmente pela picada de insetos do gênero *Lutzomyia*. A espécie *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 é a principal vetora da doença no Brasil (Deane & Deane, 1954) e a espécie *Lutzomyia cruzii* Mangabeira, 1938 é vetora nas áreas de Corumbá, Ladário e Jaciara no estado do Mato Grosso do Sul (Santos et al., 1998; Missawa et al., 2011). Além da transmissão vetorial, outras formas de transmissão também têm sido estudadas, tais como a transfusional (Luz et al., 1997; Urias et al., 2007), através de transplante de órgãos (Basset et al., 2005; Antinori et

al., 2008) e a congênita (Meineck et al., 1999, Figueiró-Filho et al., 2004; Zinchuk & Nadraga, 2010).

A *Leishmania* apresenta um ciclo heteroxênico passando pelo vetor invertebrado e por diversos hospedeiros vertebrados. No Brasil, além do homem, a *L. infantum chagasi* já foi identificada em cães domésticos, em marsupiais, em roedores e em raposas. Em ambiente urbano o cão é considerado o principal reservatório do protozoário, sendo seu tratamento proibido e a eutanásia de todos os animais sororeagentes e/ou com parasitológico positivo recomendada e regulamentada pela resolução nº714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Brasil, 2006). Os estudos realizados até o momento, avaliando a estratégia de eliminação canina têm mostrado resultados conflitantes, pelo menos quando utilizada separadamente do controle vetorial (Dietze et al., 1997; Ashford et al., 1998; Costa et al., 2007).

O antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime[®] - Sanofi-Aventis) é o medicamento de primeira escolha utilizado no tratamento dos pacientes no Brasil, sendo distribuído aos serviços pelo Ministério da Saúde. O Glucantime[®] é administrado por via endovenosa ou intramuscular durante um período mínimo de 20 dias. A droga é tóxica e nem sempre efetiva, sendo contra indicada a alguns grupos de pacientes, tais como gestantes nos dois primeiros trimestres de gestação e pacientes com insuficiência renal, hepática ou cardíaca (Brasil, 2006).

São efeitos colaterais comuns ao Glucantime[®], alterações cardiovasculares, vômito, náusea, dor de cabeça, dor abdominal, febre, entre outros. A necessidade de utilização de injetáveis, o longo esquema de tratamento e a toxicidade da droga constituem causas importantes de não adesão ao tratamento. Além disso, a medicação requer monitoração cardiológica, renal e hepática, o que em muitas localidades só é possível com a hospitalização do paciente (Brasil, 2006). Assim, o medicamento considerado como primeira escolha para o tratamento em todo o mundo está longe de ser satisfatório (Croft et al., 2006). Dados recentes indicam que a resistência do parasito ao antimoniato tem se tornado um problema de saúde pública em países como o Sudão e a Índia (Brasil, 2006; WHO, 2010a).

Algumas alternativas terapêuticas, tais como o desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal) têm sido utilizadas, entretanto diversos efeitos colaterais, tais como, cefaléia, febre, calafrios, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão, também têm sido relatados para este grupo de medicamentos (Brasil, 2006). Pesquisas na área de avaliação e desenvolvimento de drogas para LV são necessárias e têm sido realizadas. São alvos de estudos: o descobrimento de novos compostos ativos, a identificação de formulações orais, a redução da toxicidade e a melhoria na eficiência do tratamento.

Atualmente, o Brasil enfrenta uma mudança no perfil epidemiológico da LV, a doença que foi durante muito tempo tipicamente rural, vem se expandindo e se urbanizando para cidades de médio e grande porte, tais como São Luís (Maranhão), Belo Horizonte (Minas Gerais) e Teresina (Piauí) (Luz et al., 2001; Brasil, 2006; Costa et al., 2008). O aumento no número de casos da doença pode estar relacionado a movimentos migratórios e ao processo de urbanização. Este ocorre na maioria das vezes de forma desordenada, resultando em condições precárias de vida e destruição ambiental, fatores que podem influenciar a emergência da LV (Luz et al., 2001; Werneck et al., 2002; Brasil, 2006).

Atualmente considera-se que uma das principais dificuldades para o controle da LV seja sua interação com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), visto que, a LV tem emergido como uma importante doença oportunista associada a este vírus. A co-infecção dos parasitos já foi relatada em pelo menos 35 países, com tendências a aumentar sua área de abrangência (Alvar et al., 2008; WHO, 2010ab). A infecção concomitante pelo HIV aumenta o risco de desenvolvimento de LV ativa entre 100 e 2.320 vezes (WHO, 2010a).

No Brasil a co-infecção tem sido descrita em uma pequena série de casos, mas acredita-se que a sua real incidência possa estar subestimada (Rabello et al., 2003; Cruz et al., 2006). Esta hipótese pode ser amparada nos resultados do trabalho realizado por Orsini et al. (2012) avaliando a infecção assintomática da LV em pacientes portadores do HIV em Minas Gerais. No estudo a prevalência da LV foi de 10,8% pelo ELISA com antígeno bruto, 3,9% pela RIFI, 0,8% pelo ELISA com antígeno rK39 e 20,2% pela PCR, reforçando a necessidade de investigação e acompanhamento de pacientes HIV positivos na localidade. Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2011) deve-se oferecer o teste de HIV a todo paciente com diagnóstico de LV, considerando que a doença pode manifestar-se como doença oportunista em pessoas imunodeprimidas.

O programa brasileiro de controle da LV baseia sua estratégia em três grupos de medidas: diagnóstico e tratamento de casos humanos, controle dos reservatórios domésticos e controle de vetores (Brasil, 2006). Tais medidas apresentam diversos obstáculos para sua implantação. Em relação ao controle vetorial, que é baseado na aplicação de inseticidas em residências, existem problemas relacionados à complexa logística e ao alto custo. Em relação ao controle dos reservatórios animais, particularmente o cão, observa-se difícil implementação e sustentabilidade, sendo uma medida de eficácia controversa (Brasil, 2006; Costa et al., 2008). Para o tratamento, estão disponíveis drogas com elevada toxicidade e para o diagnóstico da doença, destaca-se a dificuldade de disponibilização das técnicas existentes para centros de atenção primária à saúde, mantendo-as restritas a laboratórios públicos ou serviços de referência.

3.2.3 Manifestações clínicas e diagnóstico diferencial

A suspeita diagnóstica de LV ocorre em paciente com febre e esplenomegalia proveniente de área com transmissão para a doença ou proveniente de área sem ocorrência de transmissão, desde que descartados os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região (Brasil, 2011). A LV apresenta período de incubação que varia entre dois e sete meses, geralmente com evolução arrastada (Brasil 2006; Piscoppo & Mallia Azzopardi, 2007). Entretanto, evoluções rápidas como 10 dias (WHO, 2010a) ou longas como mais de quatro anos, já foram relatadas (Neto, 1978).

A doença predomina em crianças nos primeiros anos de vida, relacionando-se à elevada letalidade, em contraposição, na fase adulta a letalidade aumenta proporcionalmente com a idade (Al-Jurayyan et al., 1995; Grech et al., 2000; Pedrosa & Rocha 2004; Braga 2007). No Brasil, nos anos de 2001 a 2008, a letalidade atingiu principalmente os pacientes menores de um ano e com 50 anos ou mais de idade (Brasil, 2011). Segundo a OMS, na Europa, oeste e norte da África e Ásia, até recentemente o grupo mais afetado pela LV era o de crianças com idade de um até quatro anos. Entretanto, atualmente na Europa, com o evento da co-infecção *Leishmania*/HIV, cerca de metade dos casos relatados são de adultos. Já na África e na Índia a maioria dos casos atualmente relatados ocorre em crianças e jovens adultos (WHO, 2010a).

A distribuição da LV na infância mostra-se semelhante em ambos os sexos, mas a partir da adolescência ocorre predominância em homens (Deane & Deane, 1962; Pedrosa & Rocha, 2004; Oliveira et al., 2006). A desnutrição tem sido descrita como um importante fator de risco para a aquisição da doença, principalmente em crianças (Cerf et al. 1987; Badaró et al., 1986a; Dye & Williams, 1993; Anstead et al., 2001; Caldas et al., 2002; Maciel et al., 2008).

Sob o ponto de vista clínico e laboratorial, a doença pode ser dividida em três formas, de acordo com as características apresentadas pelos pacientes: 1) assintomática; 2) subclínica ou oligossintomática e 3) clássica (Badaró et al., 1986ab). A taxa de incidência da infecção assintomática em relação a incidência de casos clínicos varia de 8:1 a 18:1 no Brasil (Badaró et al., 1986b e Evans et al., 1992), no Kênia é estimada em 4:1 (Schaefer et al., 1995), na Etiópia em 5,6:1 (Ali & Ashford, 1994), no Iran em 13:1 (Davies & Mazloumi Gavgani, 1999) e na Espanha em 50:1 (Moral et al., 2002). Sob o ponto de vista didático, o Ministério da Saúde divide a evolução clínica da doença clássica em três períodos: o período inicial, o período de estado e o período final (Brasil, 2006).

O período inicial da doença caracteriza-se pelo início da sintomatologia, que pode variar de paciente para paciente, podendo-se observar febre, palidez e hepatoesplenomegalia, sendo o aumento do baço quase sempre mais evidente que o aumento de fígado. Sinais e sintomas de co-infecções bacterianas como pneumonia, diarreia ou tuberculose, podem confundir a apresentação clínica no momento do diagnóstico inicial. O hemograma demonstra anemia, a contagem de leucócitos apresenta-se sem alterações significativas e a contagem de plaquetas ainda pode estar normal. Já as proteínas totais e frações podem estar discretamente alteradas (Brasil, 2006).

No período de estado, pode-se observar febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez e aumento da hepatoesplenomegalia. O quadro clínico apresenta-se arrastado com mais de dois meses de evolução, associado ao comprometimento do estado geral do paciente. Exames complementares mostram anemia, leucopenia, trombocitopenia e inversão da relação albumina/globulina (Brasil, 2006).

No período final, que ocorre na ausência do diagnóstico e tratamento, observa-se febre contínua e comprometimento intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca) e edema dos membros inferiores, que pode evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias, icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos, que podem levar o indivíduo à morte (Brasil, 2006).

3.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico pode ser feito com base em vários sinais e sintomas, tais como febre, emagrecimento e esplenomegalia, entretanto, o quadro clínico pode ser confundido com outras doenças que apresentam quadros clínicos semelhantes. Assim, é essencial a existência de métodos laboratoriais sensíveis e específicos para o diagnóstico da LV (WHO, 2010ac). De acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 2011) a confirmação dos casos clinicamente suspeitos deve preencher no mínimo um dos seguintes critérios: encontro do parasito no exame parasitológico direto; RIFI reativa ou teste rápido positivo. O diagnóstico laboratorial específico consiste basicamente em três grupos de exames: os parasitológicos, os imunológicos e os moleculares.

3.2.4.1 Exames parasitológicos

Os exames parasitológicos são considerados os padrões de referência no diagnóstico da LV e se baseiam na demonstração direta do parasito e no seu isolamento em cultivo (Herwaldt 1999; WHO, 2010a). As formas amastigotas de *Leishmania* spp. podem ser visualizadas através do exame direto após coloração (Giemsa ou Leishman) de tecidos do baço, medula óssea, fígado e linfonodos (Davies et al., 2003).

De maneira geral, em pacientes imunocompetentes, a sensibilidade desta técnica, varia de 93 a 99% para o exame do aspirado de baço (Chulay & Bryceson, 1983; Zijlstra et al., 1992; WHO, 2010a), 76 a 91% para o exame do aspirado de fígado, 53 a 86% para o exame do aspirado de medula óssea e 52 a 69% para o exame do aspirado de linfonodos (Ho et al., 1948; Siddig et al., 1988; Zijlstra et al., 1992; Babiker et al., 2007). No Brasil, Pastorino et al. (2002) avaliaram aspectos laboratoriais de crianças com LV, observando sensibilidade de 77% para o mielograma e de 66% para a mielocultura.

Apesar de o exame do aspirado esplênico apresentar maior sensibilidade, a dificuldade técnica e operacional para realizar com segurança este procedimento limita sua utilização (Kager & Rees, 1983). Srivastava et al. (2011) relatam que na Índia, nos últimos 10 anos, foram realizados 9.612 aspirados esplênicos e que dois sangramentos fatais ocorreram.

No Brasil, a punção aspirativa da medula óssea para a realização do exame direto e isolamento em cultivo é considerado o padrão de referência para o diagnóstico da doença (Brasil, 2006), embora também seja um método invasivo, que requer profissional treinado e infra-estrutura laboratorial para sua realização. O custo de um exame do aspirado de medula óssea é de R\$5,79 (Tabela de procedimentos e medicamentos do SUS, 2012). No país, recomenda-se a punção em crista ilíaca para adultos e crianças de qualquer idade, pois esta é menos dolorosa e mais segura que a punção externa. Esta última é indicada para pacientes obesos ou com imobilidade (Brasil, 2011).

O material do aspirado de medula óssea, baço ou outros tecidos pode ser inoculado em meios de cultura axênicos, onde posteriormente podem ser visualizadas formas promastigotas do parasito. O Novy-Nicolle-McNeal (NNN) é o meio mais utilizado, adicionado de outro meio como o *Liver Infusion Triptose* (LIT) ou o Schneider. As culturas devem ser mantidas entre 24 e 26°C e observadas em microscopia semanalmente, durante quatro semanas (Brasil, 2006). Nos aspirados de baço e medula óssea, a positividade do cultivo é bastante elevada (acima de 80%) (Guerin et al., 2002; Sundar & Rai, 2002). O cultivo dos parasitos aumenta a sensibilidade da pesquisa, mas pode retardar em semanas o diagnóstico.

Na prática clínica, a cultura da *Leishmania* spp é raramente necessária, entretanto, esta metodologia encontra-se indicada na complementação da abordagem diagnóstica, diante de falhas nas metodologias convencionais ou para permitir o isolamento e a caracterização da espécie. Além disso, o isolamento dos parasitos é útil na obtenção de material para produção de antígenos e triagem de drogas (Sundar & Rai, 2002).

O isolamento de parasitos em hamsters apresenta sensibilidade acima de 90%, mas pode levar meses para definir o diagnóstico e requer infra-estrutura complexa (Bryceson, 1996; Sundar & Rai, 2002). O animal pode ser infectado por diversas vias, sendo a intra-peritonal a mais utilizada. Semanalmente o animal deve ser examinado em busca de sinais e sintomas da doença e, em caso positivo, os parasitos podem ser recuperados através de biópsias esplênicas e hepáticas (Sundar & Rai, 2002).

As técnicas parasitológicas são altamente específicas, mas sua sensibilidade varia dependendo do tipo de tecido avaliado. A falha no padrão de referência pode afetar as estimativas de validade dos métodos diagnósticos, por isto, outras abordagens de avaliação de testes diagnósticos, tal como a ACL, têm sido propostas (Enøe et al., 2000).

3.2.4.2 Exames moleculares

Os ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) constituem, atualmente, a principal abordagem molecular de pesquisadores e profissionais de saúde (Reithinger & Dujardin, 2007; Srivastava et al., 2011). Nas últimas décadas, esta técnica também vem sendo avaliada para diagnóstico da LV, com diferentes objetivos, incluindo o diagnóstico da infecção, o diagnóstico da doença e o controle de cura (Adhya et al., 1995; Osman et al., 1997; Disch et al., 2003 e 2004; Viana et al., 2008).

Na PCR realiza-se a síntese “in vitro” do DNA, permitindo um aumento exponencial do número de seqüências específicas a partir de um único DNA alvo. A reação básica utiliza iniciadores (pequenas moléculas de DNA de fita simples) complementares às regiões que flanqueiam a seqüência a ser amplificada no DNA alvo, necessitando da presença de uma DNA polimerase e de deoxinucleotídeos trifosfatados. Para a geração exponencial de segmentos de DNA alvo da seqüência específica, são necessárias condições de desnaturação da fita molde, ligação dos iniciadores e extensão, em ciclos alternados, promovidos pela variação da temperatura na presença de componentes da reação (Saiki et al., 1985; Mullis & Faloona, 1987).

A seleção dos genes alvo da PCR é uma etapa crítica, pois pode influenciar tanto na sensibilidade quanto na especificidade da técnica. Entre os alvos de amplificação do DNA,

um dos mais usados é o DNA do cinetoplasto (kDNA), estrutura que contém uma região com grande homologia entre as espécies de *Leishmania* spp., a região conservada do kDNA (Schallig & Oskam, 2002a; Fisa et al., 2008).

De acordo com Reithinger e Dujardin (2007), o custo estimado por uma amostra biológica analisada pela PCR convencional no Instituto de Medicina Tropical, Antuérpia, Bélgica, é de US\$12. A técnica requer infra-estrutura laboratorial (pipetas, capelas de fluxo laminar e termociclador) e profissional treinado para sua realização. Entretanto, trata-se de um instrumento não-invasivo de diagnóstico, complementa o diagnóstico parasitológico e sorológico e apresenta alto desempenho. Mais recentemente, a PCR tem se mostrado útil na quantificação da carga parasitária em diferentes amostras biológicas, este fato é relevante para o monitoramento da progressão da doença e avaliação da terapia leishmanicida (Reithinger & Dujardin, 2007).

A técnica de PCR possibilita a amplificação do DNA do parasito presente em diferentes amostras biológicas, tais como sangue periférico, soro, aspirados de medula óssea, baço, fígado ou linfonodos. De maneira geral, em pacientes imunocompetentes, sensibilidade variando entre 91 a 100% e especificidade variando entre 87 a 100% têm sido relatadas para a PCR utilizando sangue periférico (Wu et al., 1997; Disch et al., 2003; Maurya et al., 2005). Quando se utiliza soro, sensibilidade variando entre 84 a 97% e especificidade variando entre 95 a 100% tem sido relatadas (Fissore et al., 2004; Machado de Assis et al., 2009). Já a sensibilidade do aspirado de medula óssea varia entre 83 a 100% (Katakura et al., 1998; Salotra et al., 2001; Cruz et al., 2006) e a do aspirado de linfonodos varia entre 87 a 100% (Andresen et al., 1997; Osman et al., 1997). Em pacientes imunocomprometidos a técnica utilizando aspirado medular tem mostrado sensibilidade variando entre 82 a 100% (Piarroux et al., 1994; Lachaud et al., 2000; Antinori et al., 2007).

Há um consenso para a necessidade de padronização dos métodos de PCR para o diagnóstico das leishmanioses. Dados da literatura evidenciaram por análise da base de dados “MEDLINE” em 2007 que havia mais de 400 publicações desde 1989 no diagnóstico das leishmanioses por PCR. Nestas publicações observou-se a utilização de uma variedade de protocolos para se evidenciar o DNA da *Leishmania*, diferentes condições de estocagem das amostras biológicas, bem como, diferentes protocolos de extração do DNA (Reithinger & Dujardin, 2007).

A PCR encontra-se restrita a centros de referência para a doença, sendo que não existe até o momento uma uniformização da utilização da mesma nos diferentes centros, dificultando a comparação dos resultados de desempenho da técnica. Diante disso, um estudo de validação da PCR faz-se necessário, visto que, os ensaios para validação de testes

diagnósticos são etapas importantes para consolidação de procedimentos de saúde pública, na medida em que somente a partir daí é possível sugerir técnicas diagnósticas adequadas para a estruturação de programas de controle da LV.

3.2.4.3 Exames imunológicos

O diagnóstico imunológico da LV é realizado a partir de diferentes testes sorológicos que são favorecidos pela expressiva resposta imune humoral característica da doença. A maioria das técnicas demanda tempo, equipamentos, laboratoristas treinados e não permite a distinção entre infecção ativa, subclínica ou passada. Esses métodos baseiam-se na detecção de anticorpos circulantes que surgem durante a doença e incluem a RIFI, o ELISA, o DAT, os testes rápidos, entre outros.

3.2.4.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

A RIFI tem sido amplamente usada no diagnóstico da LV desde 1964 (Duxbury & Sadun, 1964), e é atualmente o teste disponibilizado pelo sistema único de saúde no Brasil (Brasil, 2006). A técnica consiste em aderir antígenos constituídos de promastigotas mortas de *Leishmania* em lâminas de microscopia para fluorescência, onde é processada a reação com o soro a ser testado. Ao final na reação, a ligação antígeno-anticorpo é visualizada com o auxílio de um conjugado fluorescente e os resultados da imunofluorescência são expressos em diluições, sendo considerados reagentes os títulos iguais ou superiores a 1:80. Para títulos iguais a 1:40, recomenda-se a solicitação de uma nova amostra em 30 dias.

Os reagentes são acessíveis, entretanto, a RIFI não diferencia entre infecção ativa e passada (Manson-Bahr, 1987), requer laboratoristas treinados, equipamentos (geladeira, pipetas, estufa, lâminas e microscópio de imunofluorescência) e relativo tempo de incubação. Atualmente, o kit da RIFI é produzido por Bio-Manguinhos, unidade produtora de Imunobiológicos da FIOCRUZ, utilizando como antígeno promastigotas de *Leishmania major* like, tendo o custo de uma reação estimado em R\$ 1,27 (Daniel Avelar, informação pessoal, Fundação Ezequiel Dias). Devido às limitações da RIFI, o Ministério da Saúde no Brasil tem feito um esforço no sentido de disponibilizar um teste rápido para o diagnóstico da LV para centros de referência. Este processo de implantação encontra-se em fase inicial de desenvolvimento e carece de criterioso acompanhamento.

De maneira geral, sensibilidade variando de 61 a 100% e especificidade variando de 80 a 100% têm sido relatadas para a RIFI, dependendo da preparação antigênica e da espécie

de *Leishmania* utilizadas (Araujo & Mayrink 1968; Badaró et al. 1983; Boelaert et al. 1999a; Cañavate et al. 2011). Maia et al. (2012) avaliaram, através de meta-análise, o desempenho da RIFI, relatando sensibilidade estimada de 88% e especificidade estimada de 90%. Em pacientes imunocomprometidos o teste tem mostrado sensibilidade variando entre 11 e 67% (Medrano et al., 1992 e 1998; WHO 2000, Deniau et al., 2003; Fernández-Guerreiro et al., 2004; Pasqual et al., 2005; Malik et al., 2006).

No Brasil, Mayrink et al. (1967) avaliaram a sensibilidade da RIFI utilizando antígeno de *L. chagasi* em 18 casos de LV, observando 77% de sensibilidade. Em estudo subsequente, o mesmo grupo avaliou a especificidade do teste utilizando antígeno de *L. donovani* e de *L. braziliensis* em 17 controles (indivíduos portadores de outras doenças), observando especificidade de 94 e 88%, respectivamente (Araujo & Mayrink, 1968).

Badaró et al. (1983) avaliaram qual forma morfológica (amastigota ou promastigota) e qual espécie de *Leishmania* (*Leishmania mexicana* e *L. donovani chagasi*) eram mais indicadas para serem utilizadas como antígeno na RIFI realizada no Brasil. Foram avaliados 30 casos de LV e 40 controles (10 portadores de outras doenças e 30 indivíduos saudáveis), observando sensibilidade e especificidade de 93 e 91%, respectivamente, para amastigotas de *L. donovani chagasi* e 100 e 98%, respectivamente, para promastigas desta mesma espécie. Já a sensibilidade e a especificidade para amastigotas de *L. mexicana* foi de 97 e 80%, respectivamente e para promastigotas desta mesma espécie foi de 87 e 93%, respectivamente. No estudo, os autores recomendaram a realização da RIFI utilizando promastigotas de *L. donovani chagasi* no Brasil.

Garcez et al. (1996) no Pará, utilizando antígeno de amastigotas de *L. chagasi*, avaliaram a RIFI em 16 casos de LV (nove comprovados parasitologicamente e sete pela resposta adequada ao tratamento) e 222 controles (102 portadores de outras doenças e 120 indivíduos de área endêmica), observando 100% de sensibilidade e 97,5% de especificidade.

Pedras et al. (2008) no Brasil, utilizando kit fornecido por Bio-Manguinhos, analisaram o desempenho da RIFI sobre 88 casos de LV confirmados parasitologicamente e 105 controles (85 portadores de outras doenças e 20 indivíduos saudáveis de área endêmica), observando 92% de sensibilidade e 88% de especificidade. Posteriormente, Machado de Assis et al. (2008), também utilizando kit fornecido por Bio-Manguinhos, avaliaram o teste sobre 213 casos de LV confirmados parasitologicamente e 119 controles (indivíduos com a clínica sugestiva, parasitológico negativo e confirmação de doença), observando 88% de sensibilidade e 81% de especificidade.

A tabela 1 mostra o resumo dos estudos realizados até o momento avaliando a RIFI para o diagnóstico da LV humana em pacientes não portadores do HIV.

Tabela 1. Resumo dos estudos realizados avaliando a reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da LV humana, em pacientes não portadores do HIV.

Estudo	Origem da amostra	Casos/ Controles	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Duxbury & Sadun, 1964	Casos, não informada; controles, parte não informada e parte dos USA	30/218	86	92
Mayrink et al. 1967	Brasil	18/-	77	-
Araujo & Mayrink 1968	Brasil	-/17	-	88-94
Badaró et al. 1983	Brasil	30/40	87-100	80-98
Srivastava et al. 1984	Índia	47/71	61,7	97
El Harith et al. 1987	Kênia	27/373	80	98,5
Srivastava 1989	Índia	209/179	87	95
Alam et al. 1996	Bangladesh	81/404	81	96
Garcez et al. 1996	Brasil	16/222	100	97,5
Mittal et al. 1991	Índia	209/119	99	97
Muazzam et al. 1992	Bangladesh	125/150	100	100
Sinha & Sehgal 1994	Índia	45/120	100	100
Mikaeili et al. 2007	Iran	61/49	80,3	90,5
Machado de Assis et al. 2008	Brasil	213/119	88	81
Kiliç et al. 2008	Turquia	24/35	100	86
Pedras et al. 2008	Brasil	88/105	92	88
Cañavate et al. 2011	Etiópia	35/67; 246	100 e 96*, respectivamente	98,5 e 89,6*, respectivamente

* Sensibilidade e especificidade estimadas pela Análise de Classes Latentes

3.2.4.3.2 Ensaio imunoenzimático

Os métodos imunoenzimáticos têm sido utilizados desde 1971. Estes detectam anticorpos específicos contra o parasito e tem seu desempenho diretamente influenciado pelo antígeno utilizado (Ho et al., 1983). O método mostra-se bastante produtivo, entretanto requer infra-estrutura laboratorial e profissional especializado para sua realização, além de demandar várias etapas de incubação e requerer relativo tempo. Os critérios de positividade dependem dos cut-offs, que devem ser fixados para cada teste.

A baixa especificidade é a desvantagem comum aos métodos que utilizam antígenos não-purificados, causada pela reatividade cruzada. Para tentar contornar este problema, alguns antígenos purificados recombinantes têm sido identificados e posteriormente avaliados por ELISA (Maalej et al., 2003). Entre estes, a proteína recombinante K39, uma seqüência de 39

aminoácidos clonada e expressada em *Escherichia coli*, isolada do DNA encontrado no cinetoplasto da *L. chagasi*, complexo donovani-específico tem sido a mais amplamente avaliada (Burns et al., 1993).

De maneira geral, a sensibilidade do ELISA utilizando o antígeno bruto de *Leishmania* spp. varia entre 36 a 100% e a especificidade varia entre 62,5 a 100% (El Harith et al. 1987; Maalej et al., 2003; Abass et al. 2006; Mandal et al. 2008). Já o ELISA utilizando o antígeno rK39 apresenta sensibilidade variando de 93 a 100% e especificidade variando de 84 a 100% (Zijlstra et al. 1998; Mohapatra et al. 2010; Machado de Assis et al., 2008; Vaish et al. 2012). Maia et al. (2012), através de meta análise, avaliaram o desempenho do ELISA utilizando o antígeno bruto de *Leishmania* spp. e rK39, relatando sensibilidades de 87 e 92% e especificidades de 77 e 81%, respectivamente. Em pacientes imunocomprometidos, a sensibilidade do ELISA utilizando o antígeno bruto de *Leishmania* spp. varia entre 60 a 89% (WHO 2000; Deniau et al., 2003) e utilizando o rK39 entre 22 e 100% (Houghton et al., 1998; Medrano et al., 1998; Deniau et al., 2003; Viana 2006).

No Brasil, Badaró et al. (1986c), utilizando antígeno bruto de *L. infantum chagasi* e *Leishmania amazonensis*, avaliaram o ELISA em 119 casos e 256 controles portadores de outras doenças, observando sensibilidades de 98 e 99% e especificidades de 96 e 86%, respectivamente. Garcez et al. (1996) no Pará, utilizando antígeno bruto de *L. infantum chagasi*, avaliaram o teste em 16 casos de LV (nove comprovados parasitologicamente e sete pela resposta adequada ao tratamento) e 222 controles (102 portadores de outras doenças e 120 indivíduos de área endêmica), observando 100% de sensibilidade e 98,3% de especificidade. Braz et al. (2002) no Rio Grande do Norte, utilizando antígeno bruto de *L. infantum chagasi* e rK39, sobre 120 casos comprovados parasitologicamente e 33 controles portadores de outras doenças, observaram sensibilidades de 98 e 93,3, respectivamente, e especificidades de 71 e 99%, respectivamente.

Barbosa-de-Deus et al. (2002) no Brasil, utilizando antígeno bruto de *L. major*, avaliaram o ELISA em 49 casos de LV e 178 controles (indivíduos portadores de outras doenças), observando 92% de sensibilidade e 100% de especificidade. Posteriormente, Carvalho et al. (2003), utilizando o antígeno bruto de *L. chagasi*, avaliaram o ensaio imunoenzimático em 128 casos de LV confirmados parasitologicamente e 60 controles (50 portadores de outras doenças e 10 indivíduos saudáveis de área endêmica), observando sensibilidade de 89% e especificidade de 98%.

Machado de Assis et al. (2008), utilizando antígeno bruto de *L. chagasi* e rK39, avaliaram o desempenho do ELISA em 213 casos de LV confirmados parasitologicamente e 119 controles (indivíduos com a clínica sugestiva, parasitológico negativo e com confirmação

de doença), observando sensibilidades de 92 e 97% e especificidades de 77 e 84%. Pedras et al. (2008), utilizando antígeno bruto de *L. chagasi* e rK39, analisaram o desempenho do ensaio imunoenzimático sobre 88 casos de LV confirmados parasitologicamente e 105 controles (85 portadores de outras doenças e 20 indivíduos saudáveis de área endêmica), observando sensibilidades 88,6 e 95,5% e especificidades de 85 e 97%, respectivamente. Os autores concluíram que a ELISA rK39 poderia substituir a RIFI na rotina diagnóstica do país.

A tabela 2 mostra o resumo dos estudos realizados até o momento avaliando o ELISA para o diagnóstico da LV humana em pacientes não portadores do HIV.

Tabela 2 - Resumo dos estudos realizados avaliando o ensaio de imunossorbência ligado a enzima para o diagnóstico da LV humana, em pacientes não portadores do HIV.

Estudo	Origem da amostra	Casos/Controles	Antígeno	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Srivastava et al. 1984	Índia	47/71	Bruto de <i>L. donovani</i>	85,1	85,7
Badaró et al. 1986c	Brasil	119/256	Bruto de <i>L. donovani</i> e <i>L. amazonensis</i>	98 e 99, respectivamente	96 e 86, respectivamente
El Harith et al. 1987	Kênia	27/373	Bruto de <i>L. donovani</i>	60	62,5
Srivastava 1989	Índia	209/179	Bruto de <i>L. donovani</i>	85,1	81,8
Alam et al. 1996	Bangladesh	81/404	Bruto de <i>L. donovani</i>	81	96
Gareez et al. 1996	Brasil	16/222	Bruto de <i>L. chagasi</i>	100	98,3
Barbosa-de-Deus et al. 2002	Brasil	49/178	Bruto de <i>L. major</i>	92	100
Braz et al. 2002	Brasil	120/ 33	Bruto de <i>L. chagasi</i> e rK39	98 e 93,3, respectivamente	71 e 99, respectivamente
Maalej et al. 2003	Tunísia	38/108	Bruto de <i>L. infantum</i> , rgp63, rK39, proteína B, histonas rH2A, rH2B, rLACK, rPSA-2, r P20 e lipofosfoliglicanos	36-100	84-97
Carvalho et al. 2003	Brasil	128/60	Bruto de <i>L. chagasi</i>	89	98
Kurkjian et al., 2005	Bangladesh	33/4708	rK39	97	98,9
Abass et al. 2006	Sudão	40/158	Bruto de <i>L. donovani</i>	97,5	100
Mikaeili et al. 2007	Iran	61/49	Bruto de <i>L. infantum</i>	83,6	90,5
Takagi et al. 2007	Bangladesh	74/149	rKRP42	94,6	99,3
Machado de Assis et al. 2008	Brasil	213/119	Bruto de <i>L. chagasi</i> e rK39	92 e 97, respectivamente	77 e 84, respectivamente
Farajnia et al. 2008	Iran	93/130	Bruto de <i>L. infantum</i> e K26	95,7 e 96,8, respectivamente	87,7 e 100, respectivamente
Sarkari et al. 2008	Iran	61/87	Bruto de <i>L. infantum</i>	83,6	90,6

Kiliç et al. 2008	Turquia	24/35	Bruto de <i>L. infantum</i>	95,8	83
Pedras et al. 2008	Brasil	88/105	Bruto de <i>L. chagasi</i> e rK39	88,6 e 95,5, respectivamente	85 e 97, respectivamente
Mandal et al. 2008	Índia	94/40	Bruto de <i>L. donovani</i>	100	87
Mohapatra et al. 2010	Índia	55/22	rK 9, rK26, rK39 e bruto de <i>L. chagasi</i>	78, 38, 100 e 80, respectivamente	84, 80, 96 e 72, respectivamente
Abass et al. 2011	Sudão	105/187	Bruto de <i>L. donovani</i>	93,3	90,4
Vaish et al. 2012	Índia	252/236	rK 28 e rK39	99,6 e 99,6, respectivamente	94,1-100 e 92,2-100, respectivamente

* Sensibilidades e especificidades estimadas pela Análise de Classes Latentes

3.2.4.3.3 Teste de Aglutinação Direta

O DAT aplicado a LV foi descrito por Allain and Kagan em 1975, sendo um dos testes mais simples já desenvolvidos para o diagnóstico da doença. Este é de fácil realização e interpretação, sendo indicado para trabalhos no campo, onde as condições são mais restritas, entretanto, como os demais testes baseados em detecção de anticorpos, o teste não diferencia entre infecção ativa e passada, requer laboratoristas treinados, pipeta e placas de micro titulação (Zijlstra et al., 1992; Silva et al., 2005; Hailu et al., 2006).

O teste é semi-quantitativo, neste, soro, sangue ou urina são diluídos e misturados às partículas antigênicas de promastigotas mortas em sua forma íntegra. Após um período de incubação a aglutinação se completa e se, os anticorpos contra o protozoário estão presentes, uma reação de aglutinação é visível a olho nu (El Harith et al., 1986; El Harith et al., 1988; Ferreira & Ávila, 2001).

Atualmente, dois laboratórios europeus fabricam o DAT comercialmente, o *Royal Tropical Institute* na Holanda e o *Prince Leopold Institute* na Bélgica (Pedras et al., 2008). O custo aproximado do DAT disponível comercialmente é de US\$8.00 por teste (Edward José Oliveira, informação pessoal, FIOCRUZ). No Brasil, o desenvolvimento do DAT é um dos projetos do LPC, incentivado pela FIOCRUZ através do Programa de Desenvolvimento Tecnológico de Insumos para a Saúde.

Estudos avaliando o custo ou o custo-efetividade do DAT são escassos. Boelaert et al. (1999b) avaliaram no Sudão o custo-efetividade de quatro estratégias diagnóstico-terapêuticas para LV: A - Tratar todos os suspeitos clínicos, B - Realizar o aspirado de linfonodos ou medula e tratar todos os pacientes com esfregaço positivo, C - Realizar o DAT e tratar todos os suspeitos com altos títulos, e em suspeitos com resultado duvidoso, realizar a exame parasitológico seguido do tratamento se o resultado for positivo e D - Realizar o DAT e tratar casos com altos títulos. O custo-efetividade das estratégias A, B, C e D foram US\$ 1110, US\$ 448, US\$ 465 e US\$ 464 por morte evitada, respectivamente. Os autores ressaltaram que em áreas endêmicas a introdução da estratégia D seria mais lógica, porque esta é exclusivamente baseada em sorologia.

O DAT tem sido validado em diversas áreas endêmicas e está sendo utilizado como diagnóstico de primeira linha em centros de referência para a LV no Sudão (Ritmeijer et al., 2006; Lockwood & Sundar, 2006). De acordo com Horst et al. (2008), no oeste da África o DAT não está implementado em todos os serviços de saúde periféricos, assim, o soro coletado

precisa ser transportado para um laboratório central, resultando muitas vezes em um atraso no tratamento do paciente de uma a duas semanas.

Este teste também tem sido utilizado na abordagem diagnóstica realizada pelo Médicos Sem Fronteira da seguinte forma: Se o paciente apresenta títulos $\geq 1:3,200$ o mesmo deve ser tratado, se o paciente apresenta títulos $\leq 1:400$ excluí-se a possibilidade de LV, entretanto, se o paciente apresenta título entre $\geq 1:400$ mas $\leq 1:3,200$, um aspirado deve ser realizado. É relatado que com esta abordagem diagnóstica o número de aspirados realizados reduziu em torno de 80% (Ritmeijer et al., 2003; Horst et al., 2008).

De maneira geral, sensibilidade variando de 32 a 100% e especificidade variando de 59 a 100% têm sido relatadas (Alain & Kagan et al. 1975; El Harith et al., 1986; Boelaert et al., 1999c; Pedras et al. 2008). Em pacientes imunocomprometidos, a sensibilidade do teste varia entre 80 e 95,7% (Hailu & Bern, 2002; Sinha et al., 2006; Horst et al., 2008).

Chappuis et al. (2006) avaliaram o desempenho do DAT em trinta estudos, através de meta análise, relatando 94,8% de sensibilidade e 97,1% de especificidade. Segundo os autores o desempenho do teste não foi influenciado pela região ou espécie de *Leishmania*, entretanto, esta meta análise incluiu somente dois estudos realizados na América Latina, Garcez et al. (1996) e Andrade e Nascimento (1989), ambos realizados no Brasil e com tamanho amostral relativamente pequeno. Os autores também relataram que a maioria dos estudos incluídos na metanálise utilizaram controles saudáveis, o que pode ter favorecido a especificidade do teste avaliado.

No Brasil o DAT foi inicialmente avaliado por Andrade e Nascimento (1989) em 33 casos de LV (19 pacientes brasileiros e 14 africanos) e 351 controles (173 portadores de outras doenças e 178 indivíduos saudáveis), observando 100% de sensibilidade e 98% de especificidade. Posteriormente, Garcez et al. (1996) também avaliaram o teste em 16 casos (nove comprovados parasitologicamente e sete pela resposta adequada ao tratamento) e 222 controles (102 portadores de outras doenças e 120 indivíduos de área endêmica), observando sensibilidade de 100% e especificidade de 84,7%. Os autores concluíram que o DAT é útil e sua utilização em ampla escala é indicada no Brasil, desde que monitorada por um laboratório de referência que garanta a qualidade dos antígenos.

Schallig et al. (2002b) avaliaram o DAT sobre 21 casos de LV (11 pacientes brasileiros e 10 etíopios comprovados parasitologicamente) e 19 controles portadores de outras doenças, observando sensibilidade e especificidade de 100%. Na ocasião, os autores concluíram que o DAT é o teste mais adequado para ser utilizado nas situações de campo no país.

Posteriormente, o desempenho do DAT e do *Fast Agglutination Screening Test* (FAST) foram comparados no Brasil por Silva et al. (2005) em 115 casos (16 comprovados parasitologicamente e 99 pela resposta adequada ao tratamento) e 136 controles (112 portadores de outras doenças e 24 indivíduos saudáveis de área endêmica), observando 100% de sensibilidade para ambos os testes e especificidade de 97,8 e 92,5% para o DAT e o FAST, respectivamente. Os autores concluíram que os testes avaliados são ferramentas úteis e poderiam ser usados para o diagnóstico da LV.

Pedras et al. (2008), em estudo realizado no Brasil avaliaram o desempenho do DAT com antígeno liofilizado (DAT-Lio) produzido comercialmente e com antígeno preparado no próprio laboratório (DAT-LPC) em 88 casos de LV confirmados parasitologicamente e 105 controles (85 portadores de outras doenças e 20 indivíduos saudáveis de área endêmica), observando sensibilidades e especificidades de 96,6% e 98,1% pelo DAT-Lio, respectivamente, e de 95,5% e 88,6 % pelo DAT-LPC, respectivamente. Os autores concluíram que o DAT-Lio e o LPC poderiam substituir a RIFI na rotina diagnóstica do país.

Oliveira et al. (2009) avaliaram o desempenho do DAT, com uma alteração na preparação antigênica, em relação ao teste avaliado pelos autores em estudo anterior (Pedras et al., 2008) sobre 61 casos de LV comprovados parasitologicamente e 96 controles portadores de outras doenças, observando sensibilidade de 93,4% e especificidade de 96,9%. Os autores ressaltaram que as modificações introduzidas na preparação do antígeno reduziram as variações intra-lotes e resultaram em alto desempenho.

Em outro estudo, Oliveira et al. (2011) compararam o desempenho do DAT utilizando o reagente 2-mercaptoetanol que é tóxico e dos reagentes não tóxicos Kaolin e N-acetilcisteína em 89 casos de LV comprovados parasitologicamente e 130 controles (97 portadores de outras doenças e 33 indivíduos saudáveis de área endêmica). O DAT usando 2-mercaptoetanol, Kaolin e N-acetilcisteína apresentou sensibilidade de 94,4, 95,5 e 100% e especificidade de 99,2, 100 e 97,7%. Diante dos resultados, os autores recomendam a realização do DAT com o reagente N-acetilcisteína. Esta mesma equipe de pesquisadores produziu recentemente um protótipo de kit DAT-LPC contendo antígeno e reagentes necessários para a realização do DAT para o diagnóstico da LV (Edward José Oliveira, informação pessoal, FIOCRUZ).

A tabela 3 mostra o resumo dos estudos realizados até o momento avaliando o DAT para o diagnóstico da LV humana em pacientes não portadores do HIV.

Tabela 3 - Resumo dos estudos realizados avaliando o teste de aglutinação direta para o diagnóstico da LV humana, em pacientes não portadores do HIV.

Estudo	Origem da amostra	Casos/Controles	Material biológico	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Alain & Kagan et al. 1975	Índia, Mediterrâneo e EUA	31/187	Soro	96,7	65-98
El Harith et al. 1986	Kênia	21/280	Soro	100	99,3
El Harith et al. 1987	Kênia	27/373	Soro	100	72,6-100
Andrade & Nascimento, 1989	Brasil e África	33/351	Soro	100	98
Zijlstra et al., 1991	Sudão	67/65	Soro	94	72
Mengistu et al. 1992	Etiópia	10/37	Soro	80	100
Singla et al. 1993	Índia	58/95	Soro	96,5	100
Meredith et al. 1995	Kênia e Sudão	117/435	Soro	92	99,7
Oskam et al. 1999	Etiópia e Europa	205/116	Soro	88,3	99,2
Alam et al. 1996	Bangladesh	81/404	Soro	81	96
Garcez et al. 1996	Brasil	16/222	Soro	100	84,7
Boelaert et al. 1999c	Sudão, Kênia e Nepal	807/789	Soro	32-96	82-100
Boelaert et al. 1999a	Sudão	145/99	Soro	98 e 98*	59 e 79*
Bern et al. 2000	Nepal	92/113	Soro e sangue	100	93
Schallig et al. 2002b	Brasil e Etiópia	21/19	Soro e sangue	100	100
Veeken et al. 2003	Sudão	50/27	Soro	100	55
Islam et al. 2004	Bangladesh	75/225	Urina	90,7	96,4
Boelaert et al. 2004	Nepal	183/126	Soro	96,9*	93,7*
Abdallah et al. 2004	Sudão	107/126	Soro e sangue	91-96,8	96,2-96,6
Silva et al. 2005	Brasil, Uganda e Kênia	115/136	Soro	100	97,8
Goyal et al. 2004	Índia	100/60	Soro	98	95
Abass et al. 2006	Sudão	40/158	Soro	100	98,8
Sundar et al. 2006	Índia	150/358	Soro	96-97	85-87

Mutasim et al. 2006	Sudão	94/188	Soro e sangue	91-94	91,1-92,6
Ritmeijer et al. 2006	Sudão	201/133	Soro	98	72
Diro et al., 2007	Etiópia	49/51	Soro	93,5-95,3	62,7-65,1
Sundar et al. 2007	Índia	282/170	Soro	98,9	94
Mikaeili et al. 2007	Iran	61/49	Sangue	70,5	100
Terán-Angel et al, 2007	Venezuela	30/39	Soro	100	100
Boelaert et al. 2008	África e Índia	100/100	Soro	85,7-98,8*	81,9-98,2*
Farajnia et al. 2008	Iran	93/130	Soro	91,4	89,2
Mandal et al. 2008	Índia	94/40	Soro	100	100
Pedras et al. 2008	Brasil	88/105	Soro	95,5-96,6	88,6-98,1
Sarkari et al. 2008	Iran	61/87	Soro	70,5	100
Oliveira et al. 2009	Brasil	61/96	Soro	93,4	96,9
Alkhoundi et al. 2010	Iran	110/218	Soro	95,4	88,5
Singh et al. 2010	Índia	150/305	Soro e urina	93,3	93
Terán-Angel et al. 2010	Venezuela	50/42	Soro	89,7	81
Abass et al. 2011	Sudão	105/187	Soro	92,4	94,7
Cañavate et al. 2011	Etiópia	179/67	Soro	91,4	98,5
Oliveira et al. 2011	Brasil	89/130	Soro	94,4-100	97,7-100
El-Moamly et al. 2012	Sudão, Índia e Bangladesh	35/63	Soro	89	92

* Sensibilidades e especificidades estimadas pela Análise de Classes Latentes

3.2.4.3.4 Teste rápido

Um teste rápido (Arista Biologicals, USA) utilizando como antígeno a proteína rK39 foi inicialmente avaliado na Índia por Sundar et al. (1998). Este é de simples realização e interpretação, não necessita de infra-estrutura laboratorial quando realizado utilizando sangue capilar digital ou profissional especializado, pode ser feito usando sangue capilar digital ou soro, pode ser estocado em temperaturas até 30°C e fornece resultado rápido (até 20 minutos), sendo considerado adequado para uso em campo (Sundar et al. 1998; Sundar & Rai 2002; WHO, 2010ac). Entretanto, assim como outros métodos diagnósticos sorológicos, apresenta a desvantagem de não diferenciar infecção ativa e passada, devendo ser utilizado associado à clínica sugestiva da doença (WHO, 2010a).

O teste rápido é uma abordagem diagnóstica não invasiva, que permite a detecção rápida de anticorpos contra *Leishmania* spp. Neste, os anticorpos presentes no material biológico do doente reagem contra o antígeno recombinante que está impregnado na fita teste, proporcionando após alguns minutos uma reação de cor. O teste é considerado positivo quando é possível visualizar as duas linhas, teste e controle, e negativo quando somente a linha controle é visualizada. (Sundar et al. 1998; Sundar & Rai 2002; WHO, 2010c).

Atualmente, algumas empresas, tais como: Bio-Rad Laboratories (IT-LEISH[®]), InBios International (Kala-Azar Detect[®]), Span Diagnostic (Crystal[®] KA) e CTK Biotech (Onsite Leishmania Ab Rapid[®]) produzem em escala comercial testes rápidos para LV humana. O custo aproximado do Kala-Azar Detect[®] e do IT-LEISH[®] disponíveis comercialmente é de US\$ 2.00 (aquisição em grande quantidade, pelo Ministério da Saúde, Mauro Arruda, Ministério da Saúde, informação pessoal) e US\$ 8.70 por teste (aquisição em pequena quantidade por laboratório de pesquisa, Luciana Inácia, Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR, informação pessoal). O Kala-Azar Detect[®] é padronizado para uso em soro e o IT-LEISH[®] para uso em soro e sangue. Estudos avaliando o custo ou o custo-efetividade de testes rápidos são inexistentes.

Os testes rápidos têm sido validados em diversas áreas endêmicas, sendo observadas, de maneira geral, em pacientes imunocompetentes, sensibilidade variando de 67 a 100% e especificidade variando de 59 a 100% (Sundar et al., 1998; Zijlstra et al., 2001; Veeken et al., 2003; Terán-Ángel et al. 2010). Em pacientes imunocomprometidos, o teste rápido apresenta sensibilidade de 77,3% (Horst et al., 2008). Chappuis et al. (2007) ressalta que cada nova marca de teste rápido disponibilizado no mercado deve ser validado na região endêmica onde pretende-se utilizá-lo.

Chappuis et al. (2006) avaliaram o desempenho do teste rápido, através de meta-análise em treze estudos, relatando 93,9% de sensibilidade e 90,6% de especificidade. Estudos de validação de testes rápidos têm mostrado resultados variáveis, dependendo da região geográfica do estudo, do produto e da metodologia empregada (Ritmeijer et al., 2006).

Diante dos diversos produtos disponíveis no mercado, a WHO (2011) realizou um estudo multicêntrico em três regiões endêmicas: oeste da África (Sudão e Kênia), América do Sul (Brasil) e subcontinente indiano (Índia, Nepal e Bangladesh), avaliando diversas características de sete testes rápidos (quatro testes disponíveis comercialmente e três protótipos). Com relação ao desempenho, a sensibilidade e a especificidade dos testes avaliados variaram de 61,5% a 92% e 95,6 a 98,8%, respectivamente, na América do Sul, 36,8% a 87,2% e 90,8% a 98,0%, respectivamente, no oeste da África e 92,8% a 100% e 96% a 100%, respectivamente, no subcontinente indiano

No Brasil, um teste rápido (Kala-Azar detect[®]) aplicado à LV humana foi inicialmente avaliado por Carvalho et al. em 2003 em 128 casos de LV confirmados parasitologicamente e 60 controles (50 portadores de outras doenças e 10 indivíduos saudáveis de área endêmica), observando 90% de sensibilidade e 100% de especificidade, respectivamente. Os autores relataram que uma limitação do estudo é o número pequeno de controles avaliados.

Posteriormente, Machado de Assis et al. (2008) validaram o teste rápido IT-LEISH[®] em 213 casos de LV confirmados parasitologicamente e 119 controles (indivíduos com a clínica sugestiva, parasitológico negativo e com confirmação de outra etiologia), observando 93% de sensibilidade e 97% de especificidade. Os resultados obtidos permitiram recomendar o IT-LEISH[®] para diagnóstico rápido da LV no país com o devido acompanhamento da sua implantação nos serviços de saúde para avaliar o seu desempenho em condições de uso rotineiro. Em outro estudo realizado no Brasil, Amato Neto et al. (2009) avaliaram o desempenho do IT-LEISH[®] em 30 casos de LV e 110 controles (indivíduos saudáveis e portadores de outras doenças), observando 100% de sensibilidade e 96-100 de especificidade.

Durante o ano de 2009 o Ministério da Saúde do Brasil adquiriu 12.000 kits Kala-Azar detect[®] e os disponibilizou em 2010 a laboratórios de referência para avaliação do seu desempenho (Mauro Arruda, Ministério da Saúde, informação pessoal), além disso, solicitou ao Centro de Referência em Leishmanioses (CRL) do CPqRR a avaliação do teste comprado, nas mesmas amostras utilizadas para o estudo de validação do IT-LEISH[®] (Machado de Assis et al., 2008). Nesta avaliação o Kala-Azar detect[®] e o IT-LEISH[®] apresentaram sensibilidades de 88,1% e 93,3% ($p > 0.05$), respectivamente, enquanto as especificidades observadas foram de 90,6% e 96,5% ($p > 0.05$), respectivamente (CRL, CPqRR, 2010).

A tabela 4 mostra o resumo dos estudos realizados até o momento avaliando testes rápidos para o diagnóstico da LV humana em pacientes não portadores do HIV. Já a tabela 5 apresenta um resumo de características apresentadas por diferentes testes diagnósticos.

Acredita-se que com a utilização do teste rápido, principalmente em serviços de saúde periféricos, a redução entre o tempo de diagnóstico e tratamento dos pacientes poderá ser observada, trazendo grande avanço no controle da doença. Em 2005, na Assembléia Mundial da Saúde, o governo da Índia, Nepal e Bangladesh assinaram um acordo de eliminar a LV até 2015. Como não há vacina para a doença, a detecção precoce e o tratamento adequado dos casos é uma estratégia chave para o controle da doença, sendo o uso do teste rápido crucial para o sucesso deste objetivo comum. Segundo a OMS o teste rápido é atualmente a melhor opção diagnóstica nas áreas periféricas do subcontinente indiano, portanto sua distribuição e uso dentro de um algoritmo definido devem ser promovidos (WHO, 2010ac).

Segundo Lockwood & Sundar (2006) uma preocupação com relação à utilização dos testes rápidos é assegurar a produção dos mesmos pelos fabricantes. Duas empresas (Arista Biological e Amrad) já pararam de produzir o teste, assim a OMS poderia ajudar a assegurar que testes rápidos permanecem disponíveis para as pessoas que precisam deles. Segundo os autores o progresso no controle das doenças negligenciadas, como a LV, é muitas vezes prejudicado pela falta de compromisso da indústria, sendo que a produção de testes diagnósticos e drogas é interrompida quando os lucros são insuficientes.

De acordo com a OMS, em serviços primários de saúde localizados em regiões rurais endêmicas, o teste rápido deveria ser utilizado. Pacientes apresentando clínica suspeita, com um teste rápido positivo e nenhuma história prévia de LV deveriam ser tratados. Em hospitais distritais, que possuam infra-estrutura suficiente, além do teste rápido, o DAT e o parasitológico poderiam ser utilizados. Já em centros de referência para LV, além do teste rápido, do DAT e do parasitológico, outros métodos também podem ser utilizados, tais como RIFI, ELISA e PCR (WHO, 2010a).

Tabela 4 – Resumo dos estudos realizados avaliando teste rápidos para o diagnóstico da LV humana, em pacientes não portadores do HIV.

Autores	Origem da amostra	Companhia/Nome comercial	Casos/ Controles	Material biológico	Sensibilidade (%)	Especificidade(%)
Sundar et al. 1998	Índia	Arista	127/217	Sangue	100	98
Jelinek et al. 1999	Índia e Yemen	Acon	14/82	Soro	71,4	100
Bern et al. 2000	Nepal	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	92/113	Sangue	100	100
Zijlstra et al. 2001	Sudão	Arista	55/-	Sangue	67	-
Delgado et al. 2001	Venezuela	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	41/76	Soro	88	100
Schallig et al. 2002b	Brasil e Etiópia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	21/19	Soro	85,7	82
Sundar et al. 2002	Índia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	122/120	Sangue	98	99
Brandonisio et al. 2002	Itália	Intersep	11/103	Soro	100	100
Goswami et al., 2003	Índia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	200/100	Sangue ou soro	100	90
Carvalho et al. 2003	Brasil	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	128/60	Soro	90	100
Sarker et al. 2003	Bangladesh	Amrad	60/120	Soro	97	98
Chappuis et al. 2003	Nepal	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	139/45	Soro	97	71
Veeken et al. 2003	Sudão	Amrad	50/27	Soro	92	59
Boelaert et al. 2004	Nepal	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	183/126	Soro	87,4 e 77*	90,1 e 93,1*
Chappuis et al. 2005	Uganda	DiaMed/IT-LEISH [®] e Inbios/Kala-Azar Detec [®]	131/121	Soro	97 e 82, respectivamente	99 e 97, respectivamente
Mathur et al. 2005	Índia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	51/116	Soro	100	100
Sundar et al. 2006	Índia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	150/358	Soro	99	89
Alborzi et al. 2006	Shiraz	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	47/161	Sangue ou soro	82,4	100
Chappuis et al. 2006	Nepal	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	85/57	Soro	89	90
Ritmeijer et al. 2006	Sudão	DiaMed/IT-LEISH [®]	201/133	Sangue	90	99
Diro et al., 2007	Etiópia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	49/52	Soro	71,7 e 74,4	82,4 e 74,1

Sundar et al., 2007	Índia	DiaMed/IT-LEISH [®] e Inbios/Kala-Azar Detec [®]	206/356	Sangue ou soro	99/100 e 98/100, respectivamente	95/100 e 76,4/97,3, respectivamente
Takagi et al. 2007	Bangladesh	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	74/149	Soro	93,2	-
Machado de Assis et al. 2008	Brasil	DiaMed/IT-LEISH [®]	213/119	Sangue	93	97
Boelaert et al. 2008	África e Índia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	100/100	Soro	75,4-84,7* (África) e 96-99,6* (Índia)	70-91,8* (África) e 91* (Índia)
Saghroumi et al. 2008	Tunísia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	574/355	Soro	87,1	94,4
Mandal et al. 2008	Índia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	94/40	Soro	100	87
Amato Neto et al. 2009	Brasil	DiaMed/IT-LEISH [®]	30/110	Soro	100	96-100
Singh et al., 2010	Índia	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	160/305	Soro	98	89
Terán-Ángel et al. 2010	Venezuela	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	50/42	Soro	94,15	100
Khan et al.2010	Bangladesh	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	100/75	Úrina	95	93
Abass et al. 2011	Sudão	DiaMed/IT-LEISH [®]	105/187	Soro	83,8	93
Cañavate et al. 2011	Etiópia	DiaMed/IT-LEISH [®] e Inbios/Kala-Azar Detec [®]	179/67	Soro	91,4 e 94,3, respectivamente	98,5 e 94, respectivamente
Khan et al. 2011	Bangladesh	CTK Biotech/Onsite Leishmania Ab Rapid Test	100/100	Soro	94	96
El-Moamly et al. 2012	Sudão, Índia e Bangladesh	Inbios/Kala-Azar Detec [®]	35/63	Soro	94	95

* Sensibilidades e especificidades estimadas pela Análise de Classes Latentes

Tabela 5 – Características apresentadas por diferentes testes diagnósticos.

Teste diagnóstico	Exame do aspirado de medula	RIFI	ELISA	DAT	Teste rápido em sangue capilar digital	PCR
Sensibilidade em pacientes não portadores do HIV (%)	52-86	61-100	36-100	32-100	67-100	84-100
Especificidade em pacientes não portadores do HIV (%)	-	80-100	62-100	59-100	59-100	87-100
Infra-estrutura laboratorial	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Profissional especializado	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim
Tempo mínimo para execução e realização em centros de referência para LV	Algumas horas	2 horas	5 horas	5 horas	20 minutos	1 dia
Custo	R\$ 5,79	R\$ 1,27	-	US\$ 8,00	US\$ 2,0-8,7	US\$ 12
Situação do método diagnóstico no Brasil	Implantado	Implantado	Não implantado	Não implantado	Em processo de implantação	Implantado

Estudos de validação de métodos diagnósticos, especialmente testes em formato de imunocromatografia, têm sido desenvolvidos utilizando diferentes metodologias, mas algumas vezes, pontos importantes para a segurança dos resultados publicados não têm sido observados, por exemplo, tamanho amostral pequeno, grupos controles e padrão de referência inadequados, critérios de inclusão e exclusão de pacientes indefinidos, fatores estes que podem influenciar a avaliação de desempenho dos métodos diagnósticos. Para auxiliar a condução adequada dos estudos de validação de métodos diagnósticos para doenças infecciosas, a OMS lançou uma recomendação denominada STARD (The Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy), que contém um “check list” que deve ser levado em consideração durante o desenho dos estudos de validação de métodos diagnósticos, para maior sucesso do estudo e segurança dos resultados publicados (Bossuyt & Reitsma, 2003; Peeling et al., 2006).

Segundo Boelaert et al. (2007) um teste diagnóstico para uso em serviços periféricos e laboratório tem que apresentar ≥ 95 de sensibilidade e ≥ 98 de especificidade, além do resultado estar disponível em até 30 minutos. De acordo com Romero e Boelaert et al. (2010) algumas questões ligadas ao diagnóstico humano da LV são chave para o controle da doença na América Latina e precisam ser discutidas, tais como: qual deverá ser o algoritmo diagnóstico para uso em serviços primários de saúde na detecção de casos ativos; como assegurar a qualidade do teste diagnóstico rápido disponível e qual o desempenho dos métodos diagnósticos em pacientes com a co-infecção *Leishmania/HIV*.

O uso de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, de fácil execução e interpretação, que necessitam de pequena infra-estrutura laboratorial e de profissionais especializados, tais como o teste rápido e o DAT, poderá trazer benefícios importantes para o diagnóstico preciso e rápido da LV. O maior impacto poderá ser sentido nas localidades onde o acesso aos exames laboratoriais mais complexos é mais difícil e por este mesmo motivo a possibilidade de atraso de diagnóstico e de tratamento adequados, maior. Outra maneira de melhorar a abordagem diagnóstica para LV seria por meio do desenvolvimento de modelos preditivos, utilizando um sistema de pontuação, que associasse características clínicas, epidemiológicas e resultados de testes laboratoriais.

3.3 Modelos de predição

Modelos de predição têm sido desenvolvidos para auxiliar profissionais de saúde a melhorar a avaliação do risco individual de doenças ou prever resultados. Para isto, utiliza-

se um conjunto de dados de um grupo de pacientes com desfecho conhecido, para construir modelos que possam ser utilizados para prever o desfecho de novos pacientes.

Martins (1988) ressalta que em muitas situações práticas o pesquisador vê-se envolvido com a necessidade de construir um modelo matemático. Este pode ser definido como uma abstração de um sistema real, que possa ser utilizado com propósitos de predição, com dois atributos conflitantes, a realidade e a simplicidade. Modelos preditivos podem ser desenvolvidos utilizando diferentes técnicas, tais como a regressão logística e a árvore de decisão.

A análise de regressão logística tem por objetivo relacionar, através de um modelo, a variável resposta categórica (desfecho), geralmente dicotômica, com as variáveis explicativas, categóricas ou contínuas, que hipoteticamente influenciam a ocorrência do desfecho em questão. Assim, no modelo logístico usa-se valores de uma série de variáveis independentes para prever a ocorrência de um desfecho, por exemplo, doença (Hosmer & Lemeshow, 1989). A medida de associação estimada à partir da regressão logística é a *odds ratio* (Agresti, 1990; Kleinbaun, 1994).

Em comparação com as técnicas conhecidas em regressão, em especial a regressão linear, a regressão logística distingue-se essencialmente pelo fato de a variável resposta ser categórica (Agresti, 1990; Kleinbaun, 1994). A regressão logística é uma técnica paramétrica que impõe uma estrutura rígida para as relações entre as variáveis explicativas e o desfecho, por exemplo, assume-se que variáveis explicativas contínuas relacionam-se linearmente com o logaritmo da chance de ocorrência do desfecho (Abreu et al., 2009).

Uma alternativa menos rígida para fins de desenvolvimento de modelos de predição são as árvores de classificação e regressão (CART). O algoritmo CART foi proposto por Breiman et al. (1984) e consiste em uma técnica não-paramétrica que induz tanto árvores de classificação (quando a variável resposta assume valores categóricos), quanto árvores de regressão (quando a variável resposta assume valores contínuos). No caso das árvores de classificação, o método avalia, assim como a regressão logística, relações entre variáveis independentes e uma variável resposta binária (Rodrigues, 2004).

O objetivo dos modelos CART é subdividir o conjunto de dados em grupos mais homogêneos em relação à probabilidade do desfecho que está sendo avaliado. Em geral, cada posição da árvore é chamada de nó, sendo o primeiro nó da árvore, que equivale ao conjunto de dados completo, conhecido como nó raiz. Os nós gerados pela divisão de um nó pai já existente recebem o nome de nós filhos ou descendentes. Quando o conjunto de dados contido

em um determinado nó não é dividido entre dois nós descendentes, o nó é declarado terminal, também conhecido como nó folha (Santos, 2003).

CART realiza uma partição recursiva binária a partir do nó raiz. O processo é binário porque os nós pais são sempre divididos exatamente em dois nós filhos e recursivamente porque o processo pode ser repetido tratando cada nó filho como um nó pai. O modelo é ajustado mediante sucessivas divisões binárias para tornar os subconjuntos cada vez mais homogêneos (Santos, 2003). Os critérios de seleção para a melhor divisão são baseados em diferentes medidas, sendo que a maior parte dos algoritmos de indução busca dividir os dados de um nó pai de forma a minimizar o grau de impureza dos nós filhos (Rodrigues, 2004).

Para medir a impureza de determinado nó duas medidas são frequentemente usadas em CART, o índice de Gini e a função *deviance*. Com base nestas medidas o algoritmo realiza uma pesquisa para todas as variáveis selecionando a variável que promove a melhor divisão em termos de gerar grupos mais homogêneos em relação à probabilidade do desfecho.

Árvores de maior tamanho tendem a possuir menor *deviance*, porém são excessivamente baseadas nos dados acarretando um problema conhecido como sobreajuste, que demonstra um aprendizado muito específico da amostra em treinamento, não permitindo que o modelo seja generalizado para novas amostras. Neste caso, o modelo obtém um desempenho quase perfeito nos dados usados para estimação, mas um desempenho pobre para novos dados (Rodrigues, 2004).

Para reduzir o tamanho destas árvores são utilizados métodos de poda (“*pruning*”), cujo objetivo é encontrar um equilíbrio entre grau de homogeneidade alcançado em uma amostra específica e taxa de classificação correta do modelo quando aplicado a um novo conjunto de dados. Assim, a árvore podada se torna mais simples, facilitando a interpretação por parte do usuário. Para cada nó interno da árvore o algoritmo calcula a taxa de erro caso um determinado ramo da árvore seja podado. Esse processo se repete progressivamente, gerando um conjunto de árvores podadas. Finalmente, para cada árvore gerada é calculada a acurácia na classificação de um conjunto de dados (Rodrigues, 2004).

O desenvolvimento de modelos preditivos pode ajudar na tomada de decisão diagnóstica dos pacientes, especialmente em locais onde o acesso aos métodos diagnósticos é difícil, sendo uma ferramenta útil e custo-efetiva em serviços de saúde com recursos limitados. Neste contexto, emerge a possibilidade de se desenvolver e utilizar modelos preditivos clínico-laboratoriais para LV humana. Estes modelos, se desenvolvidos de maneira adequada e alimentados com dados que tenham qualidade e que sejam representativos de determinada população analisada, podem auxiliar médicos, assim como administradores da saúde pública, na abordagem diagnóstica de pacientes suspeitos de terem a doença.

3.4 Análise de classes latentes

A ACL consiste em um recurso matemático muito utilizado em ciências sociais e mais recentemente incorporado na área de saúde. Esta análise tem sido indicada em estudos de avaliação de testes diagnósticos como uma alternativa à AVC, que utiliza métodos referência (Rindskopf & Rindskopf, 1986; Hadgu & Qu, 1998).

A ACL utiliza o método de máxima verossimilhança (*maximum-likelihood method*) para modelar associações entre variáveis observadas, que imperfeitamente medem uma variável não observada (latente). Para a aplicação da ACL básica a premissa de independência condicional entre os testes diagnósticos avaliados deve ser cumprida (Hui & Walter, 1980). Toft et al. (2001) definem que independência condicional entre dois testes significa que o resultado de um teste não é afetado pelo resultado de outro.

Quando um teste diagnóstico é validado em uma população, o status de doença pode ser considerado como uma variável latente com duas classes: doença e não doença. ACL estima a sensibilidade e a especificidade de todos os testes diagnósticos sem a necessidade de comparação com um método referência. Em outras palavras, o que o método irá extrair é a probabilidade de pertencimento àquela classe (Hui & Walter, 1980).

O modelo de ACL foi empregado pela primeira vez no diagnóstico da LV humana em um estudo realizado no Sudão por Boelaert et al. (1999a). Neste trabalho, o DAT, a RIFI e o exame parasitológico (aspirado de medula ou linfonodos) foram validados, utilizando a AVC e a ACL, sendo que, o desempenho dos métodos por ambos os modelos foi semelhante. Os autores concluíram que a modelagem por ACL é uma ferramenta útil, dando estimativas consistentes das características dos métodos diagnósticos. Em outro estudo realizado na mesma localidade, Boelaert et al. (2004) compararam a validade da pancitopenia, da RIFI, do DAT e de um teste rápido (Kala-Azar Detect[®]) para LV utilizando a AVC e a ACL. Diante dos resultados, os autores ressaltaram que o DAT ou o teste rápido avaliado poderiam substituir o exame parasitológico em serviços periféricos do Nepal.

Em um estudo multicêntrico realizado na África e subcontinente Indiano, o DAT, um teste rápido (Kala-Azar Detect[®]) e o teste para antígeno de látex em urina foram avaliados utilizando a ACL. Os autores recomendaram a utilização do DAT e do teste rápido para o diagnóstico da LV e concluíram que o modelo de ACL é adequado para estudos de validação de métodos diagnósticos (Boelaert et al., 2008).

Canavate et al. (2011) avaliaram o desempenho da RIFI, do DAT e dos testes rápidos Kala-Azar Detect[®] e IT-LEISH[®] através da ACL. No estudo a RIFI, o DAT, o Kala-Azar Detect[®] e o IT-LEISH[®] apresentaram sensibilidades e especificidades de: 96 e 89,6%; 88,8 e

97,4%; 90,5 e 90,7% e 89 e 91%, respectivamente. Os autores ressaltaram que um dos motivos que os fizeram utilizar a ACL foi que somente 35 pacientes dos 246 avaliados tinham sido submetidos ao exame parasitológico e/ou a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Atualmente a ACL com independência condicional poder ser realizada facilmente e rapidamente, entretanto, a análise é pouco difundida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Artigo 1 - Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil.



Contents lists available at ScienceDirect

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/trstmh>

Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil

Tália S.M. de Assis^a, Alexandre S. da C. Braga^a, Mariana J. Pedras^a, Edward Oliveira^a, Aldina Barral^b, Isadora C. de Siqueira^{b,c}, Carlos H.N. Costa^d, Dorcas L. Costa^d, Thiago A. Holanda^d, Vítor Y.R. Soares^d, Mauro Biá^d, Arlene de J.M. Caldas^e, Gustavo A.S. Romero^f, Ana Rabello^{a,*}

^a Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil

^c Hospital da Criança - Obras Sociais de Irmão Dulce, Salvador, Bahia, Brazil

^d Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brazil

^e Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil

^f Universidade de Brasília (UNB), Brasília, Distrito Federal, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2010

Received in revised form 6 September 2010

Accepted 6 September 2010

Available online 20 October 2010

Keywords:

direct agglutination test

rapid test rk39

visceral leishmaniasis

sensitivity

specificity and diagnostic accuracy

ABSTRACT

The diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) is still a major problem in Brazil and several other countries where the disease is endemic. The use of an easy-to-use and interpret, sensitive, and specific method that requires no complex infrastructure or specialized professionals, such as direct agglutination test (DAT) and the rk39-based rapid immunochromatographic test may enhance the diagnosis of disease. This study evaluated the performance of a rapid test (DiaMed-IT-LEISH®) and the DAT for the diagnosis of VL in 213 parasitologically confirmed cases and 119 controls with clinical suspicion of VL and confirmation of another etiology. The sensitivities and specificities of the rapid test were 93% and 97%, respectively and those of the DAT were 90% and 96%, respectively. The positive predictive values of the rapid test and the DAT were 98% and 97%, respectively and the negative predictive values were 89% and 84%, respectively. The Kappa index showed agreement between both methods classified as substantial (0.77). This study showed that the DAT and the rapid test can be used to diagnose VL in Brazil, following a pilot study for implementation of the rapid test in the health services.

© 2010 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) affects up to 500 000 people yearly in approximately 65 countries.¹ In Brazil, where the disease is caused by *Leishmania (L.) chagasi*, syn. of *Leishmania (L.) infantum*, approximately 3500 cases have been reported annually since 2002, with a mean incidence of two

cases per 100 000 inhabitants and a case-fatality rate of 5.5% over the last 12 years.² If left untreated, VL has a case-fatality rate as high as 100%.³ Other diseases that manifest with hepatosplenic febrile syndrome can share the same presentation. Therefore, laboratory testing is necessary to confirm the VL diagnosis.⁴

The reference standard for VL diagnosis is the demonstration of the parasite in smears and/or cultures of the spleen, bone marrow, lymph nodes or liver. These parasitological techniques are highly specific, but their sensitivity varies depending on the tissue evaluated. The sensitivity

* Corresponding author. Tel.: +55 31 33497708.

E-mail address: ana@cpqrr.fiocruz.br (A. Rabello).

of the stained smear of the splenic aspirate is high, above 95%, but because of the risk of bleeding, the use of a splenic aspirate is restricted.⁵ The bone marrow aspirate, with a sensitivity varying from 52% to 69%, is the most commonly used.⁶ These techniques require clinical and laboratory expertise, both of which are usually limited in endemic areas.

Serological tests have been developed to replace parasitological methods for the diagnosis of VL in the field. These methods present the advantages of being non-invasive and highly sensitive; however, anti-*Leishmania* antibodies may last for months after clinical cure and may be found in healthy persons who had been infected but remained asymptomatic.⁵ In Brazil, the test available for the Public Health System is the indirect fluorescence antibody test (IFAT), despite it depending on fluorescence microscopes and the requirement of well-equipped laboratories. Sensitivities varying from 88% to 92% and specificities ranging from 67% to 83%, depending on the antigen used, have been reported.^{7,8}

The direct agglutination test (DAT), developed in the 1980s, has been validated in several endemic areas and is being used in countries such as Sudan and Ethiopia.^{9,10} Sensitivity varying from 93.4–97% and specificity of 81–98% has been reported.^{10–12} A study by Oliveira et al.¹² in Brazil evaluated the performance of a locally produced DAT, reporting sensitivity of 93.4%, specificity of 96.9% and diagnostic efficiency of 95.5%. The authors concluded that DAT constituted a useful test and can replace IFAT as the routine diagnostic test used by the Brazilian Leishmaniasis Control Program.

A rapid test using the rK39 protein as antigen is easy to perform and provides a visual interpretation of the reactions.¹³ The test can be performed using blood or serum and the results are obtained within 20 minutes. A sensitivity varying from 67–100% and a specificity ranging from 71–100% has been reported.^{4,7,13–16} A study by Carvalho et al.¹⁶ evaluated the performance of a rK39-based rapid test in Brazil showing sensitivity of 90% and specificity of 100%. The authors concluded that the test could be used for the diagnosis of VL in Brazil.

The use of an easy-to-use and interpret, sensitive, and specific method that requires no complex infrastructure or specialized professionals, such as rapid test and the DAT, may enhance the diagnosis of VL. The purpose of this study was to compare the performance of DAT with the rK39-based immunochromatographic test for the diagnosis of human VL in Brazil.

2. Methods

2.1. Study site and patients

This was a prospective multi-centre study conducted between May 2005 and May 2007 in four states of Brazil: Maranhão, in the Federal University of Maranhão, Piauí, in the Federal University of Piauí, Bahia, in the Gonçalo Moniz Research Center and Minas Gerais, in the René Rachou Research Center. We evaluated 213 cases and 119 non-cases. Informed consent was obtained from all the adults and from minors' parents or legal guardians. The patients

underwent a clinical examination and bone marrow aspiration, and peripheral blood was collected for the serological tests.

2.2. Sample size

The sample was calculated based on data from a pilot study conducted at the René Rachou Research Center, considering sensitivity, specificity, a 95% confidence level and 4% accuracy. The aim was to enroll at least 115 true cases of VL and 115 true non-cases in the study. Patients were enrolled consecutively until the required sample size was achieved.

2.3. Inclusion and exclusion criteria

Patients with a history of fever accompanied by at least one of several clinical signs (splenomegaly, hepatomegaly, anemia, leucopenia or trombocitopenia) were included. The exclusion criteria were patients with a known immunodeficiency, use of an immunosuppressive agent and past history of VL. A patient was considered as a case when he or she presented the above mentioned symptoms and signs and had a diagnosis of VL confirmed by parasitological methods. A non-case was defined as a patient presenting the suggestive clinical picture, with a negative parasitological diagnosis and a firm diagnosis of another disease.

2.4. Direct parasite identification

In order to detect active VL, bone marrow smears were stained with Giemsa and evaluated under a 1000× oil immersion lens on an optic microscope. At least two bone marrow smears were evaluated for each patient.

2.5. Direct agglutination test

The antigen was prepared as previously described by Pedras et al.⁸ Sera were diluted in a saline citrate solution containing 1% 2-ME. Two-fold dilution series of the serum samples were made, from 1:100 to 1:102,400. Fifty microliters of the DAT antigen solution (concentration of 5×10^7 parasites/mL) were added to each well of the V-shaped microtiter plates (Nunc-Immuno Plate Brand Products, Roskilde, Denmark) containing 50 µL of diluted serum. After the samples were incubated for 18 h at room temperature, the end titer was read as the dilution immediately before the well containing a clear, sharp-edged blue spot identical to the negative control. Appropriate control samples with known DAT titers were included as controls. The cut-off value was determined by analyzing the receiver-operating characteristic curve. Based on this analysis, 1:1600 was established as optimal cut-off for interpreting positive and negative results without compromising the sensitivity and the specificity (data not shown).

2.6. Rapid test

The kit IT-LEISH® was provided by the Diamed Latino-America S. A. (Cressier sur Morat, Switzerland). The test kit

Table 1

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of serological diagnostic methods for visceral leishmaniasis evaluated in four research centers in Brazil.

Methods	Sensitivity (%) ^a (CI: 95%)	Specificity (%) ^b (CI: 95%)	PPV (%) ^c (CI: 95%)	NPV (%) ^d (CI: 95%)
DAT	90 (85.3–94.0)	96 (90.5–99.0)	97 (94.2–99.2)	84 (77.2–90.1)
Rapid test	93 (89.2–96.4)	97 (92.0–99.1)	98 (95.0–99.5)	89 (82.5–94.0)

^aRapid test vs. DAT: $P=0.29$; ^bRapid test vs. DAT: $P=1.00$; ^cRapid test vs. DAT: $P=0.52$.

^dRapid test vs. DAT: $P=0.25$. CI: Confidence interval

is composed of a membrane coated with a line of recombinant antigen K39 across the strip. Antibodies against the *Leishmania* present in a blood sample reacted with the K39 antigen, and their presence was evaluated with a mouse anti-human antibody conjugated to an indicator. A finger prick sample (10 μ L) of blood was added to a well and mixed with a drop of buffer. A test strip was placed vertically in the well, and the diluted blood migrated up the nitrocellulose strip. After the blood was completely wicked up, the strip was transferred to the next well, which contained a few drops of wash buffer, and was allowed to clear. The process took approximately 20 minutes, and the results were read visually. The test was positive when two red lines appeared in the middle of the nitrocellulose membrane, negative when only one red line appeared and invalid when no line was evident.

2.7. Data analysis

The database was constructed using SPSS 12.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and contained epidemiological and clinical characteristics of all patients and laboratory test results. Epi Info 6.04 software (Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA) was used to calculate the confidence intervals. Statistical analysis was performed using the χ^2 test for comparison of proportions. The significance level was fixed at $P < 0.05$. Agreement between the serologic tests was evaluated with the Kappa test and interpreted according to Landis and Koch: 1.00–0.81 almost perfect, 0.80–0.61 substantial, 0.60–0.41 moderate, 0.40–0.21 fair and 0.20–0.0 slight.¹⁷

3. Results

A total of 332 patients (213 parasitologically confirmed VL cases and 119 non-cases with clinical suspicion of VL but with another confirmed etiology) were included in the analysis: 57 (17.2%) from Minas Gerais, 119 (35.8%) from Bahia, 121 (36.4%) from Piauí, and 35 (10.5%) from Maranhão. The median age of the patients was 13 years (one month to 76.8 years), and 58% were male. The median time for symptoms in the cases group was 53 days (5–360 days; DP= 55.0), and for non-VL cases was 71 days (3–720 days, DP= 136.0).

Patients with VL had the following signs and symptoms: weight loss (169/202; 83.6%), paleness (98/136; 72.1%), cough (85/206; 41.3%), diarrhea (57/205; 27.7%), abdominal pain (68/136; 49.6%), jaundice (28/204; 13.7%) and bleeding (31/204; 15.1%). The signs and symptoms presented by non-cases were as follows: weight loss (71/108; 65.7%), paleness (82/95; 86.3%), cough (45/109; 41.3%), diarrhea (24/109; 22.0%), abdominal pain (39/88; 44.3%),

Table 2

Kappa index between the direct agglutination test (DAT) and the rK39-based rapid immunochromatographic test.

Rapid test	DAT		
	Positive	Negative	Total
Positive	182	21	203
Negative	15	114	129
Total	197	135	332

Kappa: 0.77; Confidence interval 95%: 0.72–0.82

jaundice (25/112; 22.3%) and bleeding (25/108; 23.1%). A significantly higher frequency of weight loss was registered among the cases and of paleness among the non-cases ($P < 0.05$).

The sensitivity of the DAT and the rapid test were 90% (CI: 85.3–94.0) and 93% (CI: 89.2–96.4), respectively, while the specificity of both tests were 96% (CI: 90.5–99.0) and 97% (CI: 92.0–99.1), respectively. Sensitivity and specificity were similar for both methods ($P > 0.05$) (Table 1). The simulation of parallel testing showed sensitivity and specificity of 99.3% (CI: 95%: 97–99.9) and 93.1% (CI: 95%: 87.2–97), respectively. The simulation of sequential testing, first the rapid test and then the DAT, showed sensitivity and specificity of 84% (CI: 78.4–89) and 100% (CI: 98.2–100), respectively.

The positive predictive values (PPVs) of the DAT and the rapid test were 97% and 98%, respectively, and the negative predictive values (NPVs) were 84% and 89%, respectively. These results represent the totals for the four centers. There was no significant difference in PPVs and NPVs between

both methods ($P > 0.05$) (Table 1). The Kappa index demonstrated agreement classified as substantial (0.77) between the rapid test and the DAT (Table 2).

4. Discussion

The DAT is the serological method of choice for the diagnosis of VL in several countries. This method can be used in the field and requires minimal laboratory infrastructure. In the present study, the DAT showed sensitivity and specificity of 90% and of 96%, respectively. These results corroborate the data reported by Chappuis et al.,⁴ Pedras et al.,⁸ Sundar et al.,¹¹ and Oliveira et al.,¹² who showed sensitivities ranging from 93.4–97% and specificities ranging from 81–98%.

The rapid test IT-LEISH® (Diamed Latino-America, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) was designed for the qualitative detection of antibodies against *Leishmania* spp. rK39 antigen. The rK39 contains a 39-amino acid repeat that is part of a 230-kDa protein predominant in members of the *L. donovani* complex.¹⁸ This commercial test can be performed

with blood obtained by a finger prick, does not require laboratory complex structure or expertise in its interpretation, and the results are available within 20 minutes. The rapid tests have also been validated in several endemic areas. In Uganda, the rapid test IT-LEISH[®] was introduced as a first-line test for patients presenting clinical suspicion of VL.¹⁹

In the current study, the rapid test showed a sensitivity of 93% and a specificity of 97%; these results corroborate the data reported by Carvalho et al.¹⁶ in a study in Brazil, the rapid test Kala-azar Detect[®] (InBios International, Seattle, WA, USA) demonstrated 90% sensitivity and 100% specificity. In another study performed in Brazil, Amato-Neto et al.¹⁵ evaluated the incidence of false-positive results using the rapid test IT-LEISH[®] in patients with confirmed Chagas disease and healthy volunteers, reporting sensitivity and specificity of 100%. The authors concluded that the rapid test is a useful diagnostic assay, pointing out that a false-positive result rarely occurs in patients with a serological diagnosis of Chagas disease.

Both tests showed satisfactory performance and could be used for the diagnosis of VL in Brazil. The DAT has the advantage of being a quantitative test, but it has drawbacks that make it less suitable as a test in the field. It requires more pipetting and several hours of incubation. The price of the rapid test ranges from about US\$2.00 per test, comparable to that of the DAT, to US\$8.00 per test (Arruda M, personal information, Ministry of Health of Brazil). According to Sundar et al.,¹¹ the rapid test currently appears to be the best available option for VL diagnosis under field conditions. In regions where laboratories are equipped to perform DAT successfully, this test can also be used. Either

test, if positive in a person with clinical suspicion of VL, warrants specific treatment or other parasitological investigation, depending on the epidemiological and clinical presentation.

When analyzing the performance of both methods simultaneously, there was a gain in sensitivity (99%) and a loss in specificity (93%) compared with the performance of the methods individually. In endemic settings where the two methods can be performed, the simultaneous assessment would be recommended. This strategy would provide high reliability in treatment of the suspect patient. When the methods were evaluated sequentially, there was a loss in sensitivity (84%) and a gain in specificity (100%) compared with the performance of the methods individually. Thus, the evaluation of the methods in sequence would be useful to increase reliability to exclude the diagnosis of VL, even in the presence of suggestive clinical picture, when other etiologies need to be further investigated. Undoubtedly, the cost-effectiveness of those combined strategies needs evaluation.

In our previous study we evaluated the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the rK39 antigen in the same group of patients included in the present study; the sensitivity of the ELISA was 97%, and the specificity was 84%.⁷ Analysis of the performance of the rapid test and the rK39-ELISA in sequence revealed sensitivity of 91% and specificity of 99%. There was a loss in sensitivity and improvement of specificity, which could represent a gain for the diagnosis of VL.

The high PPV found in this study is due to the high frequency of VL among patients attending the specialized services. Therefore, the data must be interpreted with caution and should not be extrapolated to situations of low prevalence scenarios or epidemiological surveys. Present data are not valid for patients who do not show clinical signs consistent with VL.

The present work was conducted taking into account the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy.²⁰ This study showed that both the DAT and the rapid test can be used for the diagnosis of VL in Brazil. The implementation of these tests in the health services should be carried out cautiously. As with any diagnostic test, a laboratory result is a part of the diagnostic decision made by an experienced and well-trained medical doctor. Therefore, the introduction of one of these methods requires an algorithm and should take into account the effectiveness, costs and their potential sustainability.

Authors' contributions: AR, GASR and TSMA conceived and designed the study; TSMA, ASCB, MJP, AB, ICS, CHNC, DLC, TAH, VYRS, MB, AJMC and EO carried out the clinical management and the laboratorial assays; TSMA, GASR and AR carried out the analysis and interpretation of the data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. AR is guarantor of the paper.

Funding: Secretary of Health Surveillance, Brazilian Ministry of Health, CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) and Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ

Conflicts of interest: None declared.

Ethical approval: The study was conducted in agreement with the principles of the Helsinki Declaration and the Resolution 196/96 of the National Health Council of the Ministry of Health that regulates research involving human subjects in Brazil. The Research Ethics Committee of Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz, Salvador, Bahia, Brazil, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil and Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil, previously approved the informed consent forms and procedures.

References

- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004;**27**:305–18.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna E. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saúde Pública* 2008;**24**:2941–7.
- Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol* 2009;**47**:412–23.
- Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BMS, Das ML, et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected Kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health* 2003;**8**:277–85.
- Boelaert M, El-Safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and Katex in east Africa and the Indian subcontinent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;**102**:32–40.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brazil, 2006. <http://portal.saude.gov.br>. [accessed 23 September 2009].

7. Assis TSM, de Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN, et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saude* 2008;**17**:105–16.
8. Pedras MJ, Viana LG, Oliveira E, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;**102**:172–8.
9. Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngetich S, O'Keefe C, Davidson RN. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2006;**74**:76–80.
10. Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 2006;**333**:723.
11. Sundar S, Singh RK, Bimal SK, Gidwani K, Mishra A, Maurya R, et al. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop Med Int Health* 2007;**12**:284–9.
12. Oliveira A, Pedras MJ, De Assis IE, Rabello A. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;**12**:1279–81.
13. Sundar S, Reed SG, Singh R, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998;**351**:563–5.
14. Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;**6**:108–13.
15. Amato-Neto V, Amato VS, Tuon FF, Gakiya E, Marchi CR, Souza RM, et al. False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. *Int J Infect Dis* 2009;**13**:182–5.
16. Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003;**68**:321–4.
17. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;**33**:159–74.
18. Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Chalibt HW, Badaro R, Reed S. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci* 1993;**90**:775–9.
19. Chappuis F, Mueller Y, Nguimfack A, Rwakimari JB, Couffignal S, Boelaert M, et al. Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:5973–7.
20. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns D, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Fam Pract* 2004;**21**:4–10.

4.2 Artigo 2 - Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil.

* Em anexo (anexo 3 e 4), duas tabelas que complementam o resultado dos modelos preditivos gerados por CART apresentados no artigo.

Predictive Models for the Diagnostic of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil

Tábia S. Machado de Assis¹, Ana Rabello^{1*}, Guilherme L. Werneck²

¹Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ²Departamento de Epidemiologia, Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Background and Objectives: In Brazil, as in many other affected countries, a large proportion of visceral leishmaniasis (VL) occurs in remote locations and treatment is often performed on basis of clinical suspicion. This study aimed at developing predictive models to help with the clinical management of VL in patients with suggestive clinical of disease.

Methods: Cases of VL (n=213) had the diagnosis confirmed by parasitological method, non-cases (n=119) presented suggestive clinical presentation of VL but a negative parasitological diagnosis and a firm diagnosis of another disease. The original data set was divided into two samples for generation and validation of the prediction models. Prediction models based on clinical signs and symptoms, results of laboratory exams and results of five different serological tests, were developed by means of logistic regression and classification and regression trees (CART). From these models, clinical-laboratory and diagnostic prediction scores were generated. The area under the receiver operator characteristic curve, sensitivity, specificity, and positive predictive value were used to evaluate the models' performance.

Results: Based on the variables splenomegaly, presence of cough and leukopenia and on the results of five serological tests it was possible to generate six predictive models using logistic regression, showing sensitivity ranging from 90.1 to 99.0% and specificity ranging from 53.0 to 97.2%. Based on the variables splenomegaly, leukopenia, cough, age and weight loss and on the results of five serological tests six predictive models were generated using CART with sensitivity ranging from 90.1 to 97.2% and specificity ranging from 68.4 to 97.4%. The models composed of clinical-laboratory variables and the rk39 rapid test showed the best performance.

Conclusion: The predictive models showed to be a potential useful tool to assist healthcare systems and control programs in their strategic choices, contributing to more efficient and more rational allocation of healthcare resources.

Citation: Machado de Assis TS, Rabello A, Werneck GL (2012) Predictive Models for the Diagnostic of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 6(2): e1542. doi:10.1371/journal.pntd.0001542

Editor: Richard Reithinger, George Washington University, United States of America

Received: August 16, 2011; **Accepted:** January 10, 2012; **Published:** February 28, 2012

Copyright: © 2012 Machado de Assis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ana@cpqcr.fiocruz.br

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease caused by the intracellular protozoan parasite *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*). The disease is endemic to 65 countries and 90% of world cases are reported in India, Bangladesh, Nepal, Ethiopia, Brazil, and the Sudan [1]. In Brazil, more than 15,000 VL cases were reported between 2007 and 2010, with 880 deaths [2]. The disease primarily affects the poorest people and is fatal if untreated. The control strategies used in Brazil to reduce the disease morbidity and mortality rates consists on the early diagnosis and treatment of human cases and the control of the populations of domestic reservoirs and vectors [3].

Early diagnosis is a challenge in Brazil, as in other affected countries, where the disease is still frequently treated only on the basis of clinical suspicion. Clinically, the disease is characterized by prolonged fever, substantial weight loss, hepatomegaly, splenomegaly, pancytopenia, hypergammaglobulinemia [3,4]. The firm diagnosis of VL needs to rely on efficacious laboratorial support.

The current reference test for disease diagnostic is the microscopic demonstration of *Leishmania* in spleen, bone marrow, lymph nodes or liver aspirates, but both the aspiration procedure and the reading of slides require a high level of expertise that makes them unsuitable for generalized field use [1,3].

Several serological diagnostic methods have been widely evaluated for the diagnosis of VL, such as the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with different antigens and the indirect fluorescence antibody test (IFAT). In Brazil, IFAT is the serologic test made available by the Public Health System. ELISAs and IFAT depend on equipment and laboratorial infrastructure. Two other tests easy to use have been appointed as appropriate for the diagnosis of VL in control programs: the Direct Agglutination Test (DAT) and the rk39 rapid tests [5–8].

The development of predictive models could help in the management of patients, especially in towns where the access to diagnostic methods is difficult, being useful as a cost-effective tool in a health care system with limited resources. This study aimed at developing models based on scoring systems using logistic

Author Summary

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease endemic to 65 countries, including Brazil, where the disease frequently occurs in remote locations and treatment is often performed on the basis of clinical suspicion. Predictive models based on scoring systems could be a helpful tool for the clinical management of VL. Based on clinical signs and symptoms, and five different serological tests of 213 patients with parasitologically confirmed (cases) and 119 with clinical suspicion of VL but with another confirmed etiology (non-cases), twelve prediction models using logistic regression and classification and regression trees (CART) for VL diagnosis were developed. The model composed of the clinical-laboratory variables and the rK39 rapid test showed the best performance in both logistic regression and CART (Sensitivity of 90.1% and specificity ranging from 97.2–97.4%). The scoring system is simple and based on the clinical-laboratory findings that are easily available in most clinical settings. The results suggest that those models might be useful in locations where access to available diagnostic methods is difficult, contributing to more efficient and more rational allocation of healthcare resources.

regression and classification and regression trees (CART) to predict the occurrence of VL in patients with suggestive clinical of disease in Brazil.

Methods

Settings and patient selection

The models were developed using a database generated from a prospective study conducted in four states of Brazil, published elsewhere [7,9]. We evaluated a group of 332 patients with symptoms and/or signs suggestive of VL referred for diagnostic and eventual treatment in states of Maranhão (Federal University

of Maranhão, 35 patients enrolled), Piauí (Federal University of Piauí, 121 patients), Bahia (Gonçalo Muniz Research Center, 119 patients) and Minas Gerais (René Rachou Research Center, 57 patients), from May 2005 and May 2007.

By the end of clinical investigation, all VL cases had the diagnosis confirmed by parasitological methods. The non-cases had suggestive clinical presentation of VL, a negative parasitological diagnosis and the accomplished diagnosis of another disease. The non-cases were diagnosed with various diseases, such as leukemia, liver disease, schistosomiasis, ascariasis, liver fibrosis, lymphoma, rheumatoid arthritis, malaria, mononucleosis, typhoid fever, marrow aplasia, liver cirrhosis, meningitis, lupus erythematosus, encephalitis, tuberculosis, among others.

Procedures and diagnostic tests

Patients underwent a standardized interview regarding epidemiological and clinical history and a physical examination. IFAT was performed with an industrial kit (Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Samples scored positive when fluorescent microscopy showed clear evidence that they produced a cytoplasmic or membranous fluorescence with promastigotes using a cut-off dilution of 1:80. *L. chagasi*-ELISA and rK39-ELISA were performed according to Assis et al. (2008) [9]. The cutoff of reactions was determined as the mean plus two standard deviations of the absorbance of control sera ($n=20$). DAT was performed according to Pedras et al. (2008) [10]. The cutoff value was determined by analyzing

the receiver operator characteristic curve. Rapid test (IT-LEISH[®] Diamed Latino-America S. A. - Cressier sur Morat, Switzerland) was performed according to the manufacturer's instructions and Assis et al. (2008) [9]. The test was positive when two red lines appeared in the middle of the nitrocellulose membrane, negative when only one redline appeared and invalid when no line was evident. The rapid test and the bone marrow aspirate were performed at the center of origin of the patients evaluated; all other serological tests were performed at the René Rachou Research Center.

Ethical issues

The Research Ethics Committee of René Rachou Research Center and all other institutions involved in this study had previously approved the informed consent forms and procedures. Written informed consent was obtained from all the adults and from minors' parents or legal guardians. The study was conducted in agreement with the principles of the Helsinki Declaration and the Resolution 196/96 of the National Health Council of the Ministry of Health that regulates research involving human subjects in Brazil (CEPSH/CPqRRn[°]: 13/2003).

Statistical analysis

The original data set was randomly divided into 2 parts: the "test sample" (patients from Maranhão, Piauí and Minas Gerais, $n=213$) was used to construct the models and the "validation sample" (patients from Bahia, $n=119$) was used to validate the models. Predictive models were built using logistic regression and CART. Statistical analyses were performed using Stata, version 10.0 (Stata), and Splu, version 4.5 (StatSci).

For developing predictive models with logistic regression, initially the most important factors associated with the occurrence of visceral leishmaniasis were identified. A p -value of ≤ 0.2 for the univariate association with visceral leishmaniasis was used for selecting variables for the multivariate model. A stepwise elimination procedure was performed, using a p -value of ≤ 0.05 as the criterion for variables to remain in the model.

A predictive model based on a scoring system, with points allocated to each prognostic factor, was created from the final logistic regression model run in the test sample. The scoring system was generated by dividing the value of the regression coefficient of each variable by the smallest coefficient and rounding the quotients to the closest integer [11]. Posteriorly, the final score was obtained through the sum of points attributed to the presence of each predictive variable that remained in the final model and to the results of five diagnostic methods: IFAT, *L. chagasi*-ELISA, rK39-ELISA, DAT and rapid test.

For constructing predictive model using CART all available variables were initially included in the analysis. The CART method was used to build a binary classification tree through successive partitions, dividing the data into more homogeneous subgroups at each split ("node"). At each node, the algorithm selected the variable with the greatest capacity for discriminating between the 2 outcome groups (VL and non-VL). The first division of the tree corresponds to the variable with the greatest ability to discriminate between VL cases and non-VL patients; the discriminatory power decreases with each subsequent division ("branch").

The CART algorithm adds nodes until they are homogenous or contains few observations. The problem of creating a useful tree is to find suitable guidelines to achieve a tree with a lower level of misclassification but, at the same time, not too much adjusted to the data. This can be accomplished by downsizing ("pruning") the tree. The general principle of pruning is that the tree of best size

would have the lowest misclassification rate for an individual not included in the original data [12]. Pruning was achieved by decreasing the number of nodes without a significant increase of deviance, with the aid of a graph that shows the relationship between deviance and the number of nodes on the tree [13]. The best tree suggested by our analysis had 7 leaves.

The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and area under the receiver operator characteristic (ROC) curve were used to evaluate the performance of the models. The sensitivity is the probability of the test result be positive among patients with the disease, specificity is the probability of the test result be negative among patients without the disease and PPV is the probability that a patient has the disease given a positive test result. The ROC curve consists of a graph of sensitivity versus false positive rate and the area under this curve provides a summary of the ability of a test to discriminate two groups (here, VL and non-VL patients).

Results

Three hundred thirty-two patients were included in the analysis, 213 parasitologically confirmed VL cases and 119 non-cases with clinical suspicion of VL but with another confirmed etiology. Detailed description of the group and validation of the rK39 rapid test and DAT is reported by Assis et al. (2011) [7]. The average age of the VL cases in test sample was 21 years (1 month to 74 years), and 63% (n = 88) were female and the average age of the non-cases was 16 years (2 months to 66 years), and 60% (n = 44) were female. Table 1 shows the clinical and laboratory characteristics of subjects in the test sample. Table 2 shows the predictive variables that remained in the final logistic regression model: Splenomegaly, leukopenia and cough. The score system generated by using logistic regression attributed -1 point for cough, 1 point for leukopenia, 3 points for splenomegaly and positive IFAT, 4 points for positive *L. chagasi* ELISA, 5 points for positive rK39 rapid test, 6 points for positive rK39-ELISA and 7 points for positive DAT (Table 3).

The CART model was composed by the variables splenomegaly, leukopenia, cough, age and weight loss (Figure 1). The variable with the greatest discriminative power was splenomegaly. The probabilities of VL, as predicted in the leaves of the tree, ranged from 0% to 87%.

Table 3 and 4 show the comparison of the predictive performance of different models generated using logistic regression and CART in terms of the area under the ROC curve, sensitivity, specificity, and PPV evaluated in both test and validation samples. Using logistic regression it was possible to generate predictive models for the diagnostic of VL with sensitivity ranging from 90.1 to 99.0% and specificity ranging from 53.0 to 97.2%. Using CART it was possible to generate predictive models for VL with sensitivity ranging from 90.1 to 97.2% and specificity ranging from 68.4 to 97.4%. Logistic regression and CART in the test sample and validation sample had similar performance for most models.

Figure 2 presents one example, based in models developed using logistic regression, on how a chart could be used to help health professionals with the tests interpretation and the physicians with the clinical decision. In the validation sample, in the first model, composed only by clinical-laboratory variables, patients with score ≥ 3 (82/107-51%) showed a probability of having VL of 79% (data not shown). In the second model, when IFAT was added, patients with score ≥ 4 (78/107-73%) had a probability of VL of 90%. In the third model, which included clinical and laboratorial features and *L. chagasi* ELISA, patients with a score ≥ 5 (68/107-63%) had 94.1% probability of VL. In the model combining

clinical-laboratory variables plus rK39 ELISA, patients with score ≥ 7 (72/107-67%) presented 94.4% VL probability. In the fifth model, adding DAT to clinical and laboratorial findings, patients with score ≥ 5 (68/107-63%) showed also a 94% probability of a VL diagnostic. Still, in the sixth model (clinical-laboratory plus rK39 rapid test) patients with score ≥ 5 (65/107-61%) showed the higher VL probability (PPV 98.5%).

Discussion

VL is a serious disease, with repeatedly recognition of the lack of sufficient means for its elimination. Rapid diagnostic and adequate treatment of cases would certainly help to reduce morbidity and mortality and it may contribute also to decrease transmission where antroponotic VL transmission occurs. Clinical diagnosis of VL is inaccurate because it's clinical presentation shares common features to several other diseases and can vary in different endemic areas. In the present study, splenomegaly, leukopenia and cough were the clinical-laboratory variables that remained in the predictive model using logistic regression; and splenomegaly, leukopenia, cough, age and weight loss were the clinical-laboratory variables that remained in the predictive model using CART for VL diagnosis.

Splenomegaly is a classic sign of VL that with the advance of disease can cause abdominal distension and pain. In the study by Tanoli et al. (2005) [14] in Pakistan, 95% of patients had splenomegaly and in the study by Daher et al. (2008) [15] and Rocha et al. (2011) [16] in Brazil, 96% and 94% of the patients, respectively, showed this signal, as well. Leukopenia and weigh loss are reported frequently in clinical studies involving patients with VL. In the study by Dursun et al. (2009) [17] in Turkey, 74% of the patients had leukopenia, and in the study by Queiroz et al. (2004) [18] and Daher et al. (2008) [15] in Brazil, 85% of the patients showed leukopenia and 95% showed weigh loss, respectively. Several authors have reported that the VL is predominant in children early in life and is associated with high morbidity and high number of deaths [17-18]. Other manifesta-

tions can be seen less consistent with the LV, such as cough and diarrhea [16,18]. In this study cough was a sign negatively correlated to LV. Therefore, VL should be suspected in endemic areas when patients present enlarged spleen, leukopenia and weigh loss, especially in children early in life.

Laboratory diagnosis of VL is, still now, complex. The sensitivity of parasitological tests is suboptimal, ranging from 53-86% for bone marrow up to 93-99% for spleen aspirates [1]. Diagnostic research in VL has been damaged by the lack of a perfect gold standard. An alternative to the classical validation approach using parasitological diagnostic methods as the gold standard is the latent class analysis (LCA). LCA is based on the concept that the observed results of different imperfect tests for the same disease are influenced by a latent common variable, the true disease status, which cannot be directly measured [19-21]. Several studies used LCA methodology for the evaluation of diagnostic tests for VL, such as Boelaert et al. (1999, 2004 and 2008) [22-24], Horst et al. (2009) [25] and Menten et al. (2008) [26].

Less invasive methods are being evaluated for VL diagnosis. IFAT, ELISA, and a polymerase chain reaction are examples of these efforts. Unfortunately, all of these tests require laboratory infrastructure and specialized professionals. More recently, alternatives to the methods mentioned above, such as DAT and rapid test have become available. DAT and rK39 show high sensitivity, specificity, rapid results and are easy to use [5-7]. In the multicenter study performed in Brazil, which served as the basis for the development of the predictive models presented, the IFAT

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of VL and non-VL cases, among 213 patients with clinical suspicion of VL in test sample.

Clinical and laboratory characteristics	VL cases		Non- VL cases		OR	95% CI	p value
	N	%	N	%			
Age (years)		Continuous			0.9	0.96-0.99	0.001
Sex							
Female	88	62.9	44	60.3	1.0		
Male	52	37.1	29	39.7	0.9	0.50-1.60	0.70
Weight loss							
Yes	115	87.8	51	78.5	2.0	0.90-4.34	0.09
No	16	12.2	14	21.5	1.0		
Cough							
Yes	48	35.6	35	52.2	0.5	0.28-0.91	0.02
No	87	64.4	32	47.8	1.0		
Diarrhea							
Yes	34	25.4	19	28.4	0.9	0.44-1.70	0.6
No	100	74.6	48	71.6	1.0		
Jaundice							
Yes	19	14.3	21	30.4	0.4	0.19-0.77	0.01
No	114	85.7	48	69.6	1.0		
Bleeding							
Yes	13	9.8	15	22.7	0.4	0.16-0.83	0.02
No	120	90.2	51	77.3	1.0	-	-
Splenomegaly							
Yes	127	90.7	36	49.3	10.0	4.83-21.0	<0.001
No	13	9.3	37	50.7	1.0	-	-
Hepatomegaly							
Yes	95	67.9	32	43.8	2.7	1.51-4.84	0.001
No	45	32.1	41	56.2	1.0	-	-
Leukopenia							
Yes	99	74.4	30	42.3	4.0	2.16-7.33	<0.001
No	34	25.6	41	57.7	1.0	-	-
Plaqueopeny							
Yes	81	72.3	34	50.8	2.5	1.35-4.78	0.004
No	31	27.7	33	49.2	1.0	-	-

doi:10.1371/journal.pntd.0001542.t001

Table 2. Variables significantly associated with visceral leishmaniasis in multiple logistic regression, clinical-laboratory (final model).

Variable	OR	95% CI	p value
Splenomegaly			
Yes	17.0	6.0-47.4	0.00
No	1.00		
Leukopenia			
Yes	4.5	2.0-10.4	0.00
No	1.00		
Cough			
Yes	0.37	0.16-0.84	0.02
No	1.00		

doi:10.1371/journal.pntd.0001542.t002

showed sensitivity of 88% and specificity of 81%, the *L. chagasi* ELISA showed sensitivity of 92% and specificity of 77%, the rK39-ELISA showed sensitivity of 97% and specificity of 84% [9], the rapid test IT-LEISH[®] showed sensitivity of 93% and specificity of 97% and the DAT showed sensitivity of 90% and a specificity of 96% [7].

In the present study, it was possible to generate predictive models for VL with good general predictive performance. It was observed that the generated models showed better performance compared to the model based only on clinical-laboratory variables, reinforcing the importance of diagnostic tests in patients' management. From the standpoint of performance and practicality, the sixth model, composed of clinical-laboratory variables and the rK39 rapid test, developed using both logistic regression and CART, may represent the best suitability for use in peripheral services and referral centers, since the rapid test is easy to perform and to interpret, with result available within 20 minutes. Other models, such as the second, composed of clinical-laboratory

Table 3. Predictive performance of different multivariate models in multiple logistic regression.

Models	Variation points	Score cut-off point	Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	Area under ROC Curve (%) (95% CI)	Positive predictive value (%) (95% CI)
1. Clinical-laboratory*	(-1/4)	≥3	81.4 (74.0-88.0)	65.2 (52.4-76.5)	79.4 (72.0-87.0)	82.0 (74.3-88.3)
2. Clinical-laboratory*			91.5 (82.5-97.0)	53.0 (35.5-70.0)	74.0 (61.3-86.3)	79.3 (69.0-87.4)
1. Clinical-laboratory*+L. chagasi-ELISA	(-1/8)	≥5	91.5 (85.3-96.0)	80.3 (69.0-89.1)	93.1 (89.5-97.0)	90.1 (84.0-95.0)
2. Clinical-laboratory*+L. chagasi-ELISA			90.1 (81.0-96.0)	89.0 (74.0-97.0)	91.0 (85.0-97.3)	94.1 (86.0-98.4)
1. Clinical-laboratory*+IFAT	(-1/7)	≥4	90.0 (83.4-94.5)	77.3 (65.3-87.0)	90.4 (86.0-95.0)	88.5 (82.0-93.4)
2. Clinical-laboratory*+IFAT			99.0 (92.4-100)	78.0 (61.0-90.0)	95.0 (89.0-100)	90.0 (81.0-95.5)
1. Clinical-laboratory*+rK39-ELISA	(-1/10)	≥7	98.0 (93.4-99.5)	88.0 (77.5-95.0)	97.0 (94.1-100)	94.0 (89.0-97.4)
2. Clinical-laboratory*+rK39-ELISA			96.0 (88.1-99.1)	89.0 (74.0-97.0)	93.4 (87.0-100)	94.4 (86.4-98.5)
1. Clinical-laboratory*+DAT	(-1/11)	≥5	90.0 (83.4-94.5)	97.0 (89.5-100)	97.3 (95.4-99.2)	98.3 (94.0-100)
2. Clinical-laboratory*+DAT			91.5 (82.5-97.0)	92.0 (77.5-98.2)	97.0 (88.0-99.1)	94.0 (87.3-100)
1. Clinical-laboratory*+rK39 rapid test	(-1/9)	≥5	94.0 (88.1-97.3)	95.5 (87.3-99.1)	98.5 (97.2-100)	98.0 (93.1-99.5)
2. Clinical-laboratory*+rK39 rapid test			90.1 (81.0-96.0)	97.2 (85.5-100)	95.5 (91.4-99.4)	98.5 (92.0-100)

1 Test sample; 2 Validation sample;

*The model Clinical-laboratory was composed by variables: Splenomegaly and Leukopenia. Points assigned to variables in the models: Cough = -1, leukopenia = 1, splenomegaly and IFAT = 3, L. chagasi-ELISA = 4, rK39 rapid test = 5, rK39-ELISA = 6 and DAT = 7.

doi:10.1371/journal.pntd.0001542.t003

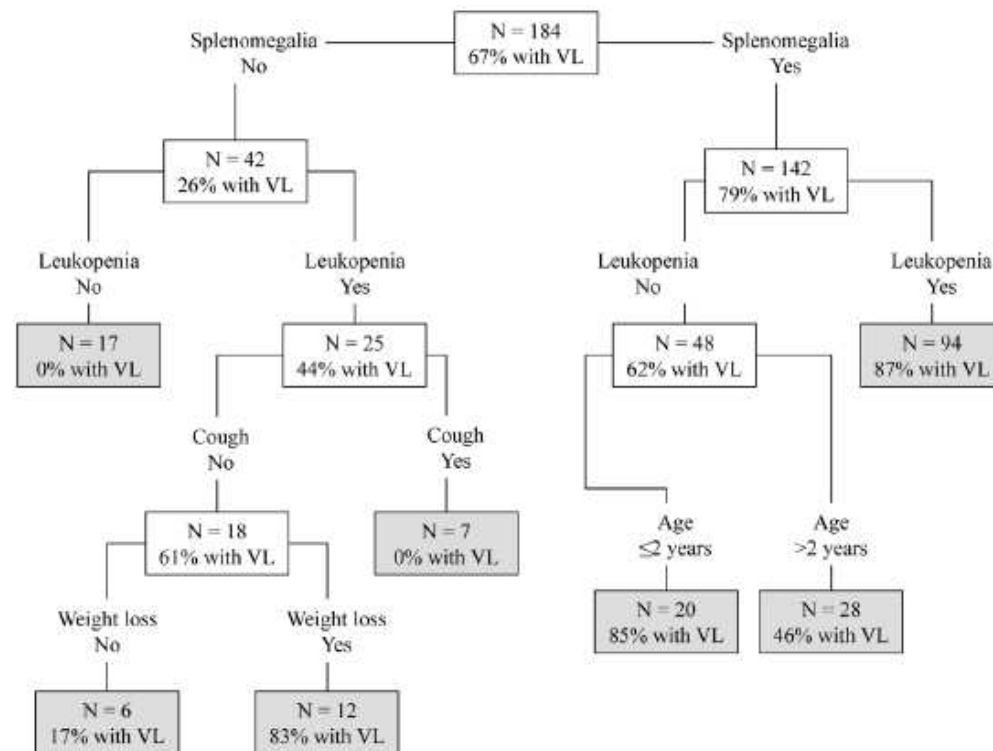


Figure 1. Classification and regression tree for predicting visceral leishmaniasis in patients with suggestive clinical. Classification and regression tree model for predicting VL. The number of patients (N) and the probability of VL (% with VL) are shown at each node. Terminal nodes are shaded.

doi:10.1371/journal.pntd.0001542.g001

Table 4. Predictive performance of different models in classification and regression trees (CART).

Models	Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	Area under ROC Curve (%) (95% CI)	Positive predictive value (%) (95% CI)
1. CART*	80.4 (73.0–87.0)	75.4 (63.5–85.0)	84.0 (76.2–91.3)	86.3 (79.0–92.0)
2. CART*	90.1 (81.0–96.0)	68.4 (51.3–82.5)	86.0 (75.3–96.0)	84.2 (74.0–92.0)
1. CART*+L. chagasi-ELISA	92.0 (86.0–96.0)	85.5 (75.0–93.0)	94.0 (90.2–97.4)	92.4 (86.5–96.3)
2. CART*+L. chagasi-ELISA	90.1 (81.0–96.0)	89.5 (75.2–97.0)	95.2 (91.4–99.0)	94.1 (86.0–98.4)
1. CART*+IFAT	92.5 (87.0–96.3)	71.0 (59.0–81.3)	94.0 (90.2–97.1)	86.0 (79.2–91.2)
2. CART*+IFAT	97.2 (92.2–100)	76.3 (60.0–89.0)	95.0 (89.0–100)	88.5 (79.2–95.0)
1. CART*+rK39-ELISA	98.0 (93.5–99.5)	88.4 (78.4–95.0)	97.2 (95.0–100)	94.2 (89.0–97.5)
2. CART*+rK39-ELISA	96.0 (88.1–99.1)	89.5 (75.2–97.1)	93.4 (87.0–100)	94.4 (86.4–98.5)
1. CART*+DAT	90.2 (84.0–95.0)	97.1 (90.0–100)	98.0 (96.1–99.5)	98.4 (94.2–100)
2. CART*+DAT	91.5 (82.5–97.0)	92.1 (79.0–98.3)	94.0 (87.3–100)	96.0 (88.0–99.1)
1. CART*+rK39 rapid test	94.0 (88.5–97.4)	98.5 (92.2–100)	99.0 (98.0–100)	99.2 (96.0–100)
2. CART*+rK39 rapid test	90.1 (81.0–96.0)	97.4 (86.2–100)	97.3 (95.0–100)	98.5 (92.0–100)

1 Test sample; 2 Validation sample.
 *The CART model was composed by variables: Splenomegaly, leukopenia, cough, age and weight loss.
 doi:10.1371/journal.pntd.0001542.t004

variables and the IFAT could be useful in services that have this technique already implemented.

Clinical prediction models have been developed to help physicians improve the assessment of an individual's risk of a disease or to predict an outcome, for a great number of diseases, such as tuberculosis and pneumonia. It is the first time that this type of predictive model is developed for human VL and it represents an innovative approach in disease diagnosis. It was out of the scope of this study to evaluate the interference of epidemics or the seasonality of the disease and the possible use of other models as the early warning systems (EWS) based on environmental variables that have been developed to predict the occurrence of epidemics of cutaneous leishmaniasis and could be also applied to VL [27].

The use of a control group (non-VL patients) with a variety of diseases that can mimic VL and representative of the population

that seeks references centers for VL in Brazil is one of the strong features of this study, providing a realistic scenario for the use of the predictive models generated. However, there are also some methodological limitations in our study that should be considered before deciding to apply the results of models in clinical practice. First, although our modeling strategy used geographically different samples for deriving and validating the models, one needs to be cautious about the possibility that the patients enrolled in our study may not be representative of populations from other settings. Second, the patients were already identified at admission to be at risk for VL, in this sense our models were developed for a population attending to referral centers and might not be useful in different circumstances. Third, the small size of the validation sample, as compared to sample derivation contributed to the relatively low precision of sensitivity, specificity, PPV and the area under the receiver operator characteristic estimates in the

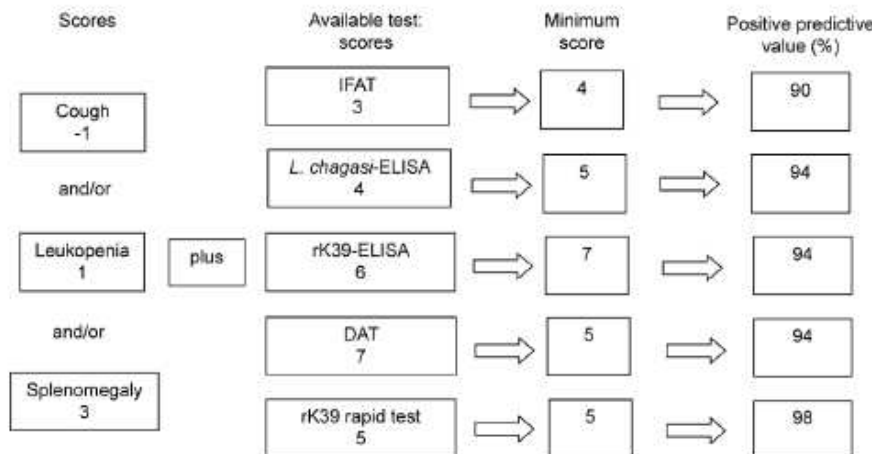


Figure 2. Example, based in models developed using logistic regression, on how a chart could be used.
 doi:10.1371/journal.pntd.0001542.g002

validated models. Fourth, the use of leukopenia as a predictor might impair the use of such models in many endemic areas where a complete blood count is difficult to be performed. Unfortunately, a model without leukopenia did not performed well in our sample. Therefore, the development of simpler models with good predictive performance in settings where blood counts are not readily available is a challenge that should be explored in other studies.

The scoring system derived from logistic regression and the classification scheme based on CART models are simple and based on the clinical-laboratory findings that are easily available in most clinical settings. The model composed of clinical-laboratory variables and the rK39 rapid test developed using both logistic regression and the model CART showed the best performance and it could be used in health services. This assessment tool could

support a physician's decision but should not preclude his assistance.

Acknowledgments

We thank Alexandre S. C. Braga, Mariana J. Pedras, Edward Oliveira, Aldina Barral, Isadora C. de Siqueira, Carlos H. N. Costa, Dorcas L. Costa, Thiago A. Holanda, Victor Y. R. Soares, Mauro Biá, Arlene J. M. Caldas and Gustavo A. S. Romero, involved in the previous prospective study of validation of diagnostic tests for visceral leishmaniasis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TSMdA AR GLW. Performed the experiments: TSMdA AR GLW. Analyzed the data: TSMdA AR GLW. Contributed reagents/materials/analysis tools: TSMdA AR GLW. Wrote the paper: TSMdA AR GLW.

References

- World Health Organization (2010) Control of the Leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organization.
- Brazil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Available: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh2/sinanet/leishni/bases/leishvbrnet.def>. Accessed 2011 Aug 08.
- Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (2006) Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde.
- Zijlstra EE, El-Hassan AM (2001) Leishmaniasis in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 27–58.
- Ritzmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngech S, O'Keefe C, et al. (2006) Evaluation of the new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 74: 76–80.
- Sundar S, Singh RK, Bimal SK, Gidwani K, Mishra A, et al. (2007) Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop Med Int Health* 12: 284–289.
- Assis TSMde, Braga ASC, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, et al. (2011) Multi-centric prospective evaluation of K39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 81–85.
- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB (2000) Use of the recombinant rK39 diagnostic test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 63: 153–157.
- Assis TSMde, Braga ASC, Pedras MJ, Barral A, Siqueira IC, et al. (2008) Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde* 17: 105–116.
- Pedras MJ, Viana LG, de Oliveira EJ, Rahello A (2008) Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 172–178.
- Barquet N, Domingo P, Cayla JA, González J, Rodrigo C, et al. (1997) Prognostic factors in meningococcal disease. Development of a bedside predictive model and scoring system. *JAMA* 278: 491–496.
- Clark LA, Pregibon D (1993) Tree-based models. In: Chambers JM, Hastie TJ, eds. *Statistical Models in S*. Chapman & Hall, New York. pp 377–419.
- Venables WN, Ripley BD (1999) *Modern Applied Statistics with S-PLUS*. Third Edition. New York: Springer.
- Tanolli ZM, Rai ME, Ghandabur AS (2005) Clinical presentation and management of visceral leishmaniasis. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 17: 51–53.
- Dahe EF, Evangelista LF, Silva Junior GB, Lima RSA, Aragão EB, et al. (2008) Clinical Presentation and Renal Evaluation of Human Visceral Leishmaniasis (Kala-azar): A Retrospective Study of 57 Patients in Brazil. *Braz J Infect Dis* 12: 329–332.
- Rocha NA, Silva Junior GB, Oliveira MJC, Abreu KLS, Franco LSLG, et al. (2011) Visceral leishmaniasis in children: a cohort of 120 patients in a metropolitan city of Brazil. *Tur J Pediatr* 53: 154–160.
- Dursun O, Ersir S, Yesilipek A (2009) Visceral childhood leishmaniasis in southern Turkey: experience of twenty years. *Tur J Pediatr* 51: 1–5.
- Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB (2004) Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *J Pediatr* 80: 141–146.
- Hui SL, Walter SD (1980) Estimating error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36: 167–171.
- Rindskopf D, Rindskopf W (1986) The value of latent class analysis in medical diagnosis. *Stat Med* 5: 21–27.
- Randolph AG, Guyatt GH, Calvin JE, Doig G, Richardson WS (1998) Understanding articles describing prediction tools. *Crit Care Med* 26: 1603–1612.
- Boelaert M, Sayda ES, Goeghebeur E, Gomes-Pereira S, Ray DL, et al. (1999) Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 4: 395–401.
- Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Balmasingh K, et al. (2004) A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Hyg* 70: 72–77.
- Boelaert M, El-saf S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, et al. (2006) Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in east Africa and the Indian subcontinent. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 102: 32–40.
- Horst R, Tefera T, Assefa G, Ebrahim AZ, Davidson RN, et al. (2009) Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 80: 929–934.
- Menten J, Boelaert M, Lesaffre E (2008) Bayesian latent class models with conditionally dependent diagnostic tests: a case study. *Stat Med* 27: 4469–4488.
- Chaves LF, Paauw M (2007) Comparing models for early warning systems of neglected tropical diseases. *PLoS Neg Trop Dis* 1: 1–6.

4.3 Artigo 3 Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil

Tália Santana Machado de Assis¹, Ana Rabello¹ & Guilherme Loureiro Werneck²

1- Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais; 2- Departamento de Epidemiologia, Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

Ana Rabello (corresponding author). Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, CEP 30190-002. Telefone: (31) 33497708, email: ana@cpqrr.fiocruz.br.

SUMMARY

Objective To estimate the sensitivities and specificities of different diagnostic tests for visceral leishmaniasis (VL) using latent class analysis (LCA). **Methods** This study was performed using data from a prospective study conducted in four Brazilian states from May 2004 to May 2007. Five diagnostic tests for VL: microscopy, indirect fluorescence antibody test (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant K39 antigen (rK39-ELISA), direct agglutination test (DAT), and the rK39 rapid test, were evaluated in 285 VL cases and 119 non-cases. **Results** The microscopy showed sensitivity of 77.0% (CI: 71.5-81.5) and specificity of 99.0% (CI: 94.0-99.7). The IFAT and the DAT showed similar sensitivities, 88.3% (CI: 84.0-92.0) and 88.5% (CI: 84.1-92.0), respectively, but the DAT had a higher specificity (95.4%, CI: 89.2-98.1) than did the IFAT (83.0%, CI: 75.0-88.2). The rK39-ELISA and the rK39 rapid test showed sensitivities of 99.0% (CI: 96.3-99.6) and 94.0% (CI: 90.1-96.3), and specificities of 82.5% (CI: 75.0-88.3) and 100% (CI: 97.0-100.0%), respectively. **Conclusions** Considering the lack of an adequate reference standard, LCA proved to be a useful tool in validating diagnostic methods for VL. The DAT and the rK39 rapid test showed better performance. Thus, clinically suspected of VL in a Brazilian endemic area should be treated based on the positivity of one of these tests.

KEY WORDS: Visceral leishmaniasis, diagnosis and latent class analysis

1. INTRODUCTION

The validation of diagnostic methods for visceral leishmaniasis (VL) should be carefully performed, because a naïve evaluation may generate biased conclusions, particularly due to the lack of an appropriate reference standard. New tests are usually compared with existing imperfect ones, and their accuracy might seriously be underestimated or overestimated using such approach (Thibodeau 1981; Valenstein 1990). Current recommendations for a definitive diagnosis of VL rely on parasitological confirmation by means of invasive procedures, requiring infrastructure and professional expertise. Unfortunately, the sensitivity of bone marrow and lymph node aspirates is suboptimal, ranging from 53% to 86% (World Health Organization 2010).

Flawed estimates of test accuracy properties have a serious potential impact from the clinical point of view. False positive results may lead to overtreatment, augmented financial cost, unnecessary exposure of individuals to the side effects of drugs and delay of treatment of other serious conditions. On the other hand, a false negative result may extend suffering, delay appropriate treatment and aggravate prognosis. An alternative to the classical validation approach using parasitological diagnostic methods as the reference standard is the latent class analysis (LCA) (Hui & Walter 1980; Rindskopf & Rindskopf 1986).

LCA is based on the concept that the observed results of different imperfect tests for the same disease are influenced by a latent common variable, the true disease status, which cannot be directly measured. In basic LCA models, the observed variables are assumed to be conditionally independent. In a group of patients with unknown disease status, for whom results from several diagnostic tests are available, LCA will model the probability of each combination of test results on the latent class, and will provide an estimate of sensitivity and specificity for each of the diagnostic tests evaluated (Hui & Walter 1980; Rindskopf & Rindskopf 1986).

Several studies have used LCA for the evaluation of diagnostic tests, such as Langhi Junior *et al.* (2002) and Andrade and Gontijo (2008) for Chagas' disease, Girardi *et al.* (2009) for tuberculosis, and Koukonari *et al.* (2009) for schistosomiasis. Boelaert *et al.*

(1999, 2004, and 2008), using LCA for the diagnosis of human VL, concluded that the model is a useful tool and provides more realistic estimates of the performance of diagnostic tests compared with the classical validation approach. However, these studies were developed in East Africa and in the Indian subcontinent where VL is caused by a different parasite species and presents different epidemiological features. Therefore, the purpose of this study was to apply LCA to estimate the sensitivity and specificity of five diagnostic tests for VL caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* (syn. *Leishmania infantum*) in Brazil.

2. METHODS

The analysis was performed using data from a prospective multicentric study conducted in four Brazilian states (Maranhão, Piauí, Bahia, and Minas Gerais) between May 2004 and May 2007 (Machado de Assis *et al.* 2008; Machado de Assis *et al.* 2011).

The following diagnostic tests were evaluated: (1) microscopy (bone marrow smears were stained with Giemsa and evaluated under a 1000× oil immersion lens on an optic microscope); (2) indirect fluorescence antibody test (IFAT), performed with a commercial kit (Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brazil); (3) enzyme-linked immunosorbent assay using K39 antigen (rK39-ELISA), performed according to Machado de Assis *et al.* (2008); (4) direct agglutination test (DAT), performed as in Pedras *et al.* (2008); and (5) the rapid test (IT-LEISH[®] Diamed Latino-America S. A. - Cressier sur Morat, Switzerland) performed according to Machado de Assis *et al.* (2011). The Research Ethics Committee of the Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR-FIOCRUZ) approved the study (CEPSH/CPqRRnº: 13/2003).

Data analysis. A database containing the epidemiological and clinical characteristics of all patients and the results of the laboratory tests was constructed using SPSS 12.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Five variables were included in the LCA, the results of microscopy, IFAT, rK39-ELISA, DAT, and rapid test. LCA was performed using TAGS software implemented in R version 2.2 (R Development Core Team and R Foundation for Statistical Computing, 2005). In the present study, we implemented the basic latent class model, using the assumption of conditional independence given the

latent class. In basic LCA, there are no associations between the observed variables within each category of the latent variable. The latent variable is the true status on the disease and the hypothesis is that there are two latent classes (presence or absence of VL). The fit of LCA model for the assumption of conditional independence was performed through the Goodness-of-fit test followed by evaluation of residual correlations between tests, that showed randomly distributed around 0.

The serial reading was determined using the following formulas: Sensivity OR rule = $se A + (1 - se A) \times se B$ and Specificity OR rule = $sp A \times sp B$. The serial reading using OR rule considers that if the first test is positive, the diagnosis is positive; otherwise, the second test is performed. If the second test is positive after a negative first test, then the diagnosis also is positive; otherwise, the diagnosis is negative.

3. RESULTS

A total of 404 patients with clinical suspicion for VL as defined by fever, accompanied by splenomegaly, hepatomegaly, anemia, leucopenia, or thrombocytopenia, were enrolled in the study. Of these patients, 285 had a firm diagnosis of VL; the diagnosis was reached by parasitological methods in 213 patients and a positive serological test and adequate response to treatment in 72 patients. The other 119 patients had a negative parasitological examination and confirmation of disease from another etiology. The non-cases were diagnosed with various diseases, such as leukemia, liver disease, schistosomiasis, ascariasis, liver fibrosis, lymphoma, rheumatoid arthritis, malaria, mononucleosis, typhoid fever, marrow aplasia, liver cirrhosis, meningitis, lupus erythematosus, encephalitis, tuberculosis, among others. The median age of the patients was 13 years (range: 1 month to 76.8 years, standard deviation: 17 years), and 58% were male. The median time for symptoms of the patients was 56 days (range: 3 to 720 days, standard deviation: 86 days).

The disease prevalence estimated by LCA was 67%. The parasitological test showed sensitivity of 77.0% (CI: 71.5-81.5) and specificity of 99.0% (CI: 94.0-99.7). The IFAT and the DAT showed sensitivities of 88.3% (CI: 84.0-92.0) and 88.5% (CI: 84.1-92.0), respectively, but the specificity of the DAT was higher than the observed for IFAT (95.4%, CI: 89.2-98.1 vs 83.0%, CI: 75.0-88.2).

The rK39-ELISA and the rK39 rapid test showed sensitivities of 99.0% (CI: 96.3-99.6) and 94.0% (CI: 90.1-96.3) and specificities of 82.5% (CI: 75.0-88.3) and 100% (CI: 97.0-100.0%), respectively (Table 1). Table 2 shows the frequencies of diagnostic test patterns. The difference of sensitivity of rapid test and all others tests evaluated, DAT *vs* rK39-ELISA, DAT *vs* microscopy, rK39-ELISA *vs* IFAT, rK39-ELISA *vs* microscopy, microscopy *vs* IFAT and the difference of specificity of rapid test *vs* rK39-ELISA, rapid test *vs* IFAT, DAT *vs* rK39-ELISA, DAT *vs* IFAT, rK39-ELISA *vs* microscopy, microscopy *vs* IFAT were significant ($p \leq 0.05$). DAT *vs* IFAT showed sensitivity similar ($p > 0.05$) and rapid test *vs* DAT, rapid test *vs* microscopy, DAT *vs* microscopy and rK39-ELISA *vs* IFAT showed specificity similar ($p > 0.05$).

In the serial reading of diagnostic tests evaluated sensitivities equal or above 99.0% were reached. However, specificities equal or above 95% were obtained only by rapid test *vs* DAT and rapid test *vs* microscopy (Table 3).

4. DISCUSSION

The diagnosis of VL is not a simple task, as it shares clinical features with other diseases; therefore, accurate laboratory diagnostic tests are essential. The current reference test for disease diagnosis is the microscopic demonstration of *Leishmania* in spleen, bone marrow, lymph nodes, or liver aspirates, but both the aspiration procedure and the reading of slides require a high level of expertise that makes them unsuitable for generalized field use. Diagnostic research in VL has been damaged by the lack of a perfect reference standard. The parasitological test is highly specific, but its sensitivity is influenced by the tissue sample, time, and quality of the reading.

Because of the limitations of direct methods, several immunological tests have been evaluated. IFAT is the test utilized by the Brazilian Leishmaniasis Control Program, with sensitivity and specificity values of 88% to 92% and 81% to 92%, respectively (Ministério da Saúde, 2006). ELISA using rK39 antigen is considered a valuable tool and has estimates of sensitivity of 95% to 97% and specificity of 84% to 97% (Machado de Assis *et al.* 2008; Pedras *et al.* 2008). DAT is simple to perform, with sensitivity

estimates of 95% to 99%, and specificity of 88% to 98% (Sundar *et al.* 2007; Pedras *et al.* 2008; Oliveira *et al.* 2009; Machado de Assis *et al.* 2011). Rapid tests are also simple to perform, do not require laboratory structure, and have estimates of sensitivity and specificity varying from 67% to 100% and from 59% to 100%, respectively (Sundar *et al.* 1998; Zijlstra *et al.* 2001; Veecken *et al.* 2003; Carvalho *et al.* 2003; Machado de Assis *et al.* 2008).

Sheps and Schechter (1984) report that, in practice, very few real reference standards are available, and one-third of medical articles dealing with diagnostic test evaluation used no well-defined reference standard and Guyatt *et al.* (1986) report that most new diagnostic technologies have not been assessed adequately to determine if their application improves public health. Therefore, research on this issue needs a better and more standardized validation methodology and LCA has been suggested as a potential solution to the problem of imperfect reference standards (Hadgu & Qu 1998), although softwares for this purpose are not widely available (Pouilot *et al.* 2002).

The design of validation studies based on LCA is not necessarily much more expensive than the classical alternative, since a minimum of three tests and roughly 100 observations are required for a model of conditional independence (Boelaert *et al.* 1999). One nice feature is that LCA based on serological tests might provide good estimates of the sensitivity and specificity of tests, avoiding the discomfort of the bone marrow aspiration required to perform the parasitological test. Reviews of publications on diagnostics have shown that although the quality of diagnostic trials is improving, many are still lacking in rigor. Some common design problems are evaluation in an inappropriate study group or in an inappropriate setting, small sample size, and lack of an adequate standard test (Ransohoff & Feinstein 1978; Reid *et al.* 1995; Peeling *et al.* 2006).

In this study, LCA estimated sensitivity of 77% and specificity of 99% for the bone marrow aspirate. These results corroborate the data reported by Boelaert *et al.* (2004), where LCA estimated a sensitivity of 78.1% and a specificity of 94.8%. This strengthens the view that bone marrow aspirate cannot be considered a reference standard for the validation of diagnostic tests for VL and that complementary approaches such as LCA might be useful for studies of validation. Boelaert *et al.* (2007)

recommends that in cases where spleen aspiration cannot be used, researchers can opt to use either a composite reference standard or LCA. Spleen aspirate is not recommended by the Brazilian Leishmaniasis Control Program due to the high risk of severe accidents related to this procedure.

LCA estimated a sensitivity of 88.3% and a specificity of 83.0% for the IFAT. These findings contrast with those reported by Boelaert *et al.* (2004), analyzing patients from Nepal where LCA estimated a sensitivity of 30.0% and a specificity of 98.3%; however, the findings corroborate the data presented by Machado de Assis *et al.* (2008), and Pedras *et al.* (2008), which reported sensitivities ranging from 88% to 92% and specificities ranging from 81% to 88% using classical validation approaches.

LCA estimated sensitivity of 99.0% and specificity of 82.5% for the rK39-ELISA. This is the first time that the performance of ELISA for VL has been assessed using LCA. The data presented here support those by Machado de Assis *et al.* (2008) and Pedras *et al.* (2008), which reported sensitivities ranging from 95% to 97% and specificities ranging from 84% to 97% for rK39 antigen, using classical validation.

In this study the DAT showed sensitivity of 88.5% and specificity of 95.4%. The results of the sensitivity of DAT using LCA agree with those presented by Boelaert *et al.* (2008) for the Sudan (85.7%), however, disagree those presented by Boelaert *et al.* (2004 and 2008 for the Ethiopia, Kenya, India and Nepal) (range: 94 to 98.8%). The results of the specificity of DAT agree with those observed by Boelaert *et al.* (2004 and 2008 for the Ethiopia, Sudan, India and Nepal) (range: 91 to 98.2%), but disagree those reported by Boelaert *et al.* (2008 for the Kenya) (81.9).

The results of the sensitivity of the rK39 rapid test in this study (94.0%) are in agreement with those reported by Boelaert *et al.* (2004 and 2008 for the India and Nepal), (range: 90.1 to 99.6%), however, disagree those presented by Boelaert *et al.* (2008 for the Ethiopia, Kenya and Sudan) (range: 75.4 to 84.7%). The results of the specificity of the rK39 rapid test in this study (100%) disagree those presented by Boelaert *et al.* (2004 and 2008) (range: 70 to 93%). Discrepancies between our findings and those of other investigators might be explained by possible differences in the test

accuracy between subspecies of the *L. donovani* complex, by genetic differences in patients, by methodological differences between studies and the use of different brands of rapid tests and standardization of DAT.

One way to improve the performance of diagnostic tests is to use serial reading. Usually, in the serial approach a simpler and cheaper test is carried out first. Taking into account the performance of the tests evaluated, we recommend that the first test to be performed is a rapid test, which provides results within 20 minutes, followed, if necessary, by DAT, which is a non-invasive test and requires minimal structure. In Brazil, the Ministry of Health has recently purchased rapid tests, and hopefully these will be increasingly available for the diagnosis of patients in health services. Studies on the cost effectiveness of such approaches should be conducted to analyze the feasibility of associations between diagnostics tests studied.

In conclusion, as described in other studies in East Africa and in the Indian subcontinent, LCA proved to be a useful tool for the validation of diagnostic methods for human VL caused by *L. infantum*. In the absence of an adequate reference standard, LCA gave consistent estimates of test characteristics. The DAT and the rK39 rapid test showed better performance and should be considered as strong tools to be used under supervised conditions by the Public Health System in Brazil.

Financial support. Secretary of Health Surveillance, Brazilian Ministry of Health, CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development), and Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ.

Conflicts of interest. None declared.

REFERENCES

Andrade AQ & Gontijo ED (2008) Triagem neonatal para infecção chagásica congênita: Aplicação de análise de classe latente para avaliação dos testes diagnósticos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **41**, 615-20.

Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F *et al* (2007) Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nature Reviews* **5**: 30-39.

Boelaert M, El-safi S, Hailu A *et al.* (2008) Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in east Africa and the Indian subcontinent. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**, 32-40.

Boelaert M, Rijal S, Regmi S *et al.* (2004) A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *American journal of tropical medicine and hygiene* **70**, 72-77.

Boelaert M, Sayda ES, Goetghebeur E *et al.* (1999) Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health* **4**, 395-401.

Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R *et al.* (2003) Performance of recombinant K39 antigen in diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *American journal of tropical medicine and hygiene* **68**, 321-324.

Girardi E, Angeletti C, Puro V *et al.* (2009) Estimating diagnostic accuracy of tests for latent tuberculosis infection without a gold standard among healthcare workers. *European Surveillance* **29**, 14.

Guyatt GH, Tugwell PX, Feeny DH *et al.* (1986) A framework for clinical evaluation of diagnostic technologies. *Canadian Medical Association Journal* **134**, 587-94.

Hadgu A & Qu Y (1998) A biomedical application of latent class models with random effects. *Applied Statistics* **47**, 603-16.

Hui SL & Walter SD (1980) Estimating error rates of diagnostic tests. *Biometrics* **36**, 167-71.

Koukounari A, Webster JP, Donnelly CA *et al.* (2009) Sensitivities and specificities of diagnostic tests and infection prevalence of *Schistosoma haematobium* estimated from data on adults in villages northwest of Accra, Ghana. *American journal of tropical medicine and hygiene* **80**, 435-41.

Langhi Junior DM, Bordin JO, Castelo A *et al.* (2002) The application of latent class analysis for diagnostic test validation of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **6**, 181-87.

Machado de Assis TS de, Braga ASC, Pedras MJ *et al.* (2008) Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde* **17**, 105-16.

Machado de Assis TS de, Braga ASC, Pedras MJ *et al.* (2011) Multi-centric prospective evaluation of rK39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **105**, 81-5.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil 2006 <http://portal.saude.gov.br> Accessed 23 September 2009.

Oliveira A, Pedras MJ, De Assis IE and Rabello A (2009) Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **12**, 1279-81.

Peeling RW, Smith PG, Bossuyt PMM (2006) A guide for diagnostic evaluations. *Nature Reviews. Microbiology*; 2-6.

Pedras MJ, Viana LG, Oliveira EJ de, Rabello A (2008) Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**, 172-78.

Pouillot R, Gerbier G, Gardner IA (2002) TAGS, a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine* **53**, 67-81.

Ransohoff DF & Feinstein AR (1978) Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests. *New England Journal of Medicine* **299**, 926-30.

Reid MC, Lachs MS & Feinstein A (1995) Use of methodological standards in diagnostic test research. Getting better but still not good. *Journal American Medical Association* **274**, 645-51.

Rindskopf D & Rindskopf W (1986) The value of latent class analysis in medical diagnosis. *Statistics in Medicine* **5**, 21-27.

Sheps SB & Schechter MT (1984) The assessment of diagnostic tests. *Journal American Medical Association* **252**, 2418-22.

Sundar S, Reed SG, Singh R *et al.* (1998) Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* **351**, 563-65.

Sundar S, Singh RK, Bimal SK *et al.* (2007) Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Tropical Medicine & International Health* **12**, 284-89.

Thibodeau LA 1981 Evaluating diagnostic tests. *Biometrics* **37**, 801-4.

World Health Organization. Technical Report Series 2010 Control of the Leishmaniasis.

Valenstein P (1990) Evaluation diagnostic tests with imperfect standards. *American Journal of Clinical Pathology* **93**: 252-58.

Veeken H, Ritmeijer K, Searman J *et al.* (2003) Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudão. *Tropical Medicine & International Health* 8, 164-167.

Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P *et al.* (2001) Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 6, 108-113.

Table 1. Values of sensitivity and specificity of diagnostic methods for visceral leishmaniasis as estimated by basic latent class analysis

	Microscopy	IFAT	rK39-ELISA	DAT	rK39 Rapid test
Se ¹ (%)	77.0	88.3	99.0	88.5	94.0
(95% CI)	(71.5-81.5)	(84.0-92.0)	(96.3-99.6)	(84.1-92.0)	(90.1-96.3)
Sp ² (%)	99.0	83.0	82.5	95.4	100
(95% CI)	(94.0-99.7)	(75.0-88.2)	(75.0-88.3)	(89.2-98.1)	(97.0-100.0%)

¹ Sensitivity; ² Specificity

Significant differences ($p \leq 0.05$): sensitivity of rapid test vs all others tests evaluated, DAT vs rK39-ELISA, DAT vs microscopy, rK39-ELISA vs IFAT, rK39-ELISA vs microscopy, microscopy vs IFAT and specificity of rapid test vs rK39-ELISA, rapid test vs IFAT, DAT vs rK39-ELISA, DAT vs IFAT, rK39-ELISA vs microscopy, microscopy vs IFAT.

No significant differences ($p > 0.05$): sensitivity of DAT vs IFAT and specificity of rapid test vs DAT, rapid test vs microscopy, DAT vs microscopy and rK39-ELISA vs IFAT.

Table 2. Observed frequencies of tests patterns as estimated by latent class analysis model

Rapid test	IFAT	Microscopy	rK39-ELISA	DAT	Observed frequency
0	0	0	0	0	87
0	0	0	0	1	1
0	0	0	1	0	15
0	0	0	1	1	3
0	0	1	0	0	1
0	0	1	0	1	1
0	1	0	0	0	15
0	1	0	0	1	2
0	1	0	1	0	6
0	1	0	1	1	3
0	1	1	1	1	11
0	1	1	1	0	1
1	0	0	1	1	7
1	0	1	0	0	1
1	0	1	1	0	3
1	0	1	1	1	20
1	1	0	1	0	11
1	1	0	1	1	41
1	1	1	0	1	2
1	1	1	1	0	15
1	1	1	1	1	158

Table 3. Values of sensitivity and specificity of diagnostic methods using serial reading

Test combination	Serial reading	
	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Rapid test/ IFAT (95% CI)	99.3 (97.5-99.9)	83.0 (74.3-88.7)
Rapid test/ DAT (95% CI)	99.3 (97.5-99.9)	95.4 (89.3-98.1)
Rapid test/K39-ELISA (95% CI)	99.9 (98.1-100.0)	82.5 (74.3-88.7)
Rapid test/ Microscopy (95% CI)	99.0 (96.9-99.8)	99.0 (95.4-99.9)

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O DAT e o teste rápido IT-LEISH[®] apresentaram desempenho satisfatório e devem ser utilizados para o diagnóstico de pacientes com suspeita de LV no Brasil;

Os modelos preditivos desenvolvidos e validados para o diagnóstico da LV, utilizando RLM e CART, apresentaram habilidade discriminatória equivalente;

Os modelos preditivos gerados tanto por RLM quanto por CART associados ao teste rápido foram os que apresentaram melhor desempenho;

Os modelos preditivos desenvolvidos representam uma abordagem simples e poderiam ser utilizados no diagnóstico da LV no Brasil;

O DAT e o teste rápido IT-LEISH[®] apresentaram melhor desempenho pela ACL em relação à RIFI e ao ELISA rK39;

A ACL mostrou-se uma ferramenta útil em estudos de validação de testes diagnósticos utilizados no Brasil e quando possível deve ser utilizada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A disponibilização de testes rápidos para o diagnóstico da LV no Brasil representa um avanço na abordagem do paciente, entretanto, é possível que o teste rápido que trará maior impacto será aquele a ser feito em sangue capilar digital. Os kits que permitem uso de sangue capilar (em beira de leito) oferecem maior possibilidade de acesso para diagnóstico em atenção primária, desde que haja qualificação.

O uso de um teste rápido que utiliza soro, apesar de interessante, continua a retardar o diagnóstico do paciente. O tempo relatado entre a coleta e o envio do soro para realização do Kala-Azar detect[®] nos laboratórios de referência durante o ano de 2010 variou de 1 a 49 dias, com média de quatro dias e o tempo de realização deste teste rápido e liberação do resultado pelo laboratório de referência variou de 1 a 98 dias, com média de 7 dias (Mauro Arruda, apresentação em mesa redonda, Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Uberaba 2010).

Considerando que há um DAT padronizado com sucesso no Brasil e que o mesmo apresenta superioridade operacional e de desempenho quando comparado à RIFI, a produção nacional do teste, visando à substituição da RIFI nos serviços de saúde deve ser incentivada. Os benefícios da produção nacional do DAT vão além do alto desempenho observado pelo teste, estão relacionados à autonomia nacional em produzir o teste com independência e baixo custo. A implantação do DAT poderá representar um avanço no diagnóstico de pacientes com LV, uma vez que pode aumentar o acesso ao diagnóstico nos municípios.

Outra preocupação está relacionada à implantação monitorada do teste rápido, sendo necessária a definição de algoritmos, fluxos e capacitação do profissional para tomada de decisão. Uma questão que deve ser assegurada pelo Ministério da Saúde é a produção constante dos testes rápidos. É necessário o incentivo ao desenvolvimento de testes rápidos em produção nacional. Como deve se dar para todo novo método laboratorial, a implantação do DAT e do teste rápido deve ser planejada e progressiva, com treinamento, avaliação e monitoramento.

O uso de modelos preditivos para a doença representa uma tentativa de melhorar a abordagem diagnóstica do paciente. Estes modelos têm sido desenvolvidos para um grande número de doenças, tais como: doença meningocócica (Barquet et al., 1997 e Werneck et al., 1999), tuberculose (Mello et al., 2006) e pneumonia (Santos et al.,

2007). Costa (2009) no Piauí desenvolveu modelos preditivos de prognóstico, baseado em um sistema de escores, para avaliar o risco de morte em 825 pacientes com LV. No estudo, a autora relatou que o sistema de escores clínico e laboratorial poderia ser útil na definição precoce de estratégias clínicas. Recentemente, a Ministério da Saúde recomendou a utilização de dois modelos preditivos desenvolvidos por Costa (2009) (Ministério da Saúde, 2011).

Assim como os modelos preditivos gerados por Costa (2009), os modelos preditivos gerados neste trabalho poderiam ser implantados em serviços de saúde para o qual foram validados. Entretanto, o uso destes modelos deve ser acompanhado de capacitação e treinamento daqueles que os irão utilizar.

A ACL representa uma abordagem interessante e útil para estudos de validação de testes diagnósticos, entretanto, a análise é complexa e pouco difundida.

As abordagens diagnósticas avaliadas constituem instrumentos de enfrentamento da LV. Com a introdução do DAT em laboratórios municipais, a adequada utilização de teste rápido em beira de leito nos serviços de atenção primária qualificados, com a utilização de modelos de predição em serviços e principalmente, com a intensiva capacitação dos profissionais para a adequada suspeição clínica, o Ministério da Saúde pode reduzir a elevada taxa de letalidade por LV no país.

Estabelecer a efetividade das melhores abordagens diagnósticas disponíveis para LV deve ser apenas um dos componentes do processo decisório do sistema de saúde, pois à medida que a demanda pelo sistema público tem aumentado e os recursos se tornado mais escassos, os gestores têm sido forçados a reexaminar os benefícios e custos das tecnologias.

Enquanto houver limitações relacionadas ao diagnóstico da LV, novas pesquisas serão necessárias. São focos destas pesquisas a busca e a avaliação de novos antígenos, a padronização de novos testes diagnósticos; a validação dos testes diagnósticos padronizados em diferentes grupos, especialmente aqueles portadores do HIV; o estabelecimento e a avaliação de algoritmos e a realização de análises de custo-efetividade das tecnologias disponíveis.

7. ANEXOS

Anexo 1: Ficha Clínica

1) Dados de Identificação do paciente	
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Código do paciente neste estudo	
Data de atendimento do paciente: ____/____/____	
Nome do Paciente: _____	
Nome do responsável: _____	
Serviço: _____	
Número do Prontuário: _____	
2) Dados sócio-demográficos	
Sexo: Masc <input type="checkbox"/> Fem <input type="checkbox"/>	
Data de nascimento: (dia/mês/ano) ____/____/____	Idade : _____ (Para menores de um ano expressar a idade em meses)
Grau de instrução: Sem instrução <input type="checkbox"/> , Fundamental <input type="checkbox"/> , Médio <input type="checkbox"/> , Superior <input type="checkbox"/> , Não se aplica <input type="checkbox"/> .	
Ocupação: _____	
Endereço: Rua _____ Telefone: _____	
Nº _____	Bairro: _____
Município: _____	Estado _____
CEP: _____	

3) Dados Clínicos:

Sintomas/Sinais		Início dos sintomas a : ____ meses, ____ dias.			
	Sim	Não	Dado não disponível	Tempo do sintomas:	Observações
Febre					
Emagrecimento					
Palidez					
Tosse					
Diarréia					
Dor abdominal					
Icterícia					
Sangramento					
Outros					
Detalhar história de outras infecções: Doença de Chagas, tuberculose, leishmaniose tegumentar, malária, hanseníase, outras.					
Exame clínico					
	Sim	Não	Observações/ detalhamento		
Febre			Temperatura axilar:		
Palidez					
Edema					
Sangramentos					
Baço:			Medida em centímetros:		
Fígado:			Medida em centímetros:		
Outros:					

Diagnóstico Laboratorial

Hemograma	Resultado	Observação
Data:		
Hemácias (cels/mm ³)		
Hemoglobina (g/dL)		

Hematócrito (%)		
Leucócitos (cels/mm ³)		
Bastonetes (%)		
Neutrófilos (%)		
Linfócitos (%)		
Monócitos (%)		
Basófilos (%)		
Eosinófilos (%)		
Plaquetas (cels/mm ³)		
Proteínas Totais (g/dL)		
Albumina (g/dL)		
Globulina (g/dL)		

Diagnóstico específico leishmaniose

	Resultado		Observação
Medula Óssea <input type="checkbox"/> Data: ___/___/___	Positivo	Negativo	
Pesquisa de amastigotas em esfregaço corado			
Pesquisa de promastigotas em cultivo			
	Resultado		Observação
Data: ___/___/___ RIFI <input type="checkbox"/> Outro: _____	Positivo	Negativo	
Data: ___/___/___ ELISA <i>L. chagasi</i> Outro: _____	Positivo	Negativo	
Data: ___/___/___ ELISA rK39 Outro: _____	Positivo	Negativo	
IT-LEISH® (data da realização): ___/___/___			
Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>			

Conclusão Diagnóstica do Paciente (resumo clínico)
Exames laboratoriais/propedêutica que possibilitam a conclusão de outra etiologia que não leishmaniose visceral:

Houve indicação de testar HIV? SIM NÃO

Se sim: indique:

Data do exame	Método (s)	Resultado

Amostras de soros estocadas: SIM NÃO

Tipo de material: Soro , Sangue total

Em caso de abandono ou do paciente não completar o estudo, indique data e razões e descreva as etapas que não foram cumpridas:

Grupo de alocação final do paciente: Caso Não-caso

Nome do responsável pelo preenchimento da Ficha Clínica

Local/Data/Assinatura

Anexo 2: Termo de Consentimento livre e esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NO PROJETO: Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH[®] no diagnóstico da leishmaniose visceral humana

INFORMAÇÕES AO VOLUNTÁRIO

Você, _____, está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa e para isto, sendo esclarecido sobre o significado do trabalho e os procedimentos que serão realizados durante sua participação.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL

Dra. Ana Rabello. Médica, Doutora em Medicina Tropical, Coordenadora do Centro de Referência em Leishmaniose, Chefe do Laboratório de Pesquisas Clínicas - Centro de Pesquisas René Rachou - CPqRR, FIOCRUZ

INFORMAÇÕES GERAIS

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença causada por um microorganismo chamado *Leishmania* que infecta o ser humano pela picada de um inseto chamado flebótomo (mosquito palha). A infecção causa febre, emagrecimento, cansaço, aumento de fígado e baço e alterações do sangue com anemia, baixa de defesa do organismo e possibilidade de sangramentos. Outras doenças podem ter sintomas parecidos e por isto os médicos precisam de exames de laboratório para confirmar a leishmaniose, fazer o tratamento adequado e curar o paciente. O exame que dá mais certeza do diagnóstico é a procura do parasito na medula dos ossos. Uma amostra deste material é aspirada com uma agulha e examinada em microscópio. Mas nem sempre é possível encontrar estes parasitos e por isto são necessários outros tipos de exames. Existem os exames que são feitos com o soro do paciente, para procurar anticorpos, que são substâncias de defesa do organismo contra a doença. Há poucos anos, foi desenvolvido um método que procura estes anticorpos em sangue da ponta do dedo da mão e dá o resultado em trinta minutos, sem precisar levar para o laboratório. Estamos avaliando nesta pesquisa, se um destes testes, IT-LEISH[®], vai funcionar bem para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

DESCRIÇÃO DA PESQUISA

OBJETIVO

Avaliar se o teste IT-LEISH[®] vai dar resultados positivos nos pacientes com leishmaniose visceral e negativo em pacientes que tem doença parecida com leishmaniose visceral, mas de outras causas.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Os pacientes que procurarem o Centro de Referência em Leishmanioses para consulta ou que tiverem soro ou material de medula óssea enviados para exame neste Centro e apresentarem febre há mais de duas semanas e aumento de baço ou fígado ou diminuição das células do sangue serão convidados para participar da pesquisa. Para a pesquisa, será realizada a punção de medula óssea, a coleta de 15 ml de sangue de veia de braço para o exame de sangue (hemograma), a pesquisa de anticorpos em soro e a coleta de sangue de ponta de dedo para a pesquisa de anticorpos em sangue. O exame de medula óssea e os exames de sangue de veia são parte da rotina do atendimento de suspeita de leishmaniose visceral. Apenas o exame de ponta de dedo está sendo acrescentado devido à pesquisa. Seu médico indicará outros exames que ele ache importante para definir seu diagnóstico. Assim que for definido seu diagnóstico, você receberá o tratamento indicado pelo Ministério da Saúde para leishmaniose visceral ou o tratamento adequado para a sua doença.

BENEFÍCIOS

Sua participação neste trabalho não lhe trará benefício direto, além do que já lhe é assegurado pelo seu atendimento neste serviço.

RISCOS POTENCIAIS

Os procedimentos médicos a serem realizados (exame clínico, punção de medula óssea, punção venosa para coleta de sangue e punção de ponta de dedo) têm risco mínimo. A coleta de sangue pode causar dor local no momento da coleta e durante três ou quatro dias após.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DOS DADOS /CONFIDENCIALIDADE

Todos os seus registros serão confidenciais, isto quer dizer que todo esforço será feito no sentido de resguardar a confidencialidade dos dados fornecidos por você, bem como dos resultados de seus exames.

ENTENDIMENTO POR PARTE DOS PARTICIPANTES

Eu pude fazer perguntas relacionadas com todos os exames e objetivos da pesquisa e os pesquisadores estavam aptos a respondê-las. Autorizo, por este documento, a Dra. Ana Rabello e sua equipe a me incluir neste projeto. Fui informado e entendi que posso retirar meu consentimento e interromper minha participação neste projeto a qualquer momento, e que a suspensão de meu consentimento não impedirá que eu continue a receber a assistência médica necessária. Posso discutir as questões relacionadas aos meus direitos e os problemas relacionados com minha participação neste projeto, durante ou depois de sua realização, com Dra. Ana Rabello e/ou sua equipe, pelo telefone (031) 3349 7783 ou no CPqRR, situado à Av. Augusto de Lima, nº 1715, Barro Preto, Belo Horizonte ou com o Presidente do Comitê de Ética da Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, Dr. Álvaro Romanha, no mesmo endereço,

CONSENTIMENTO

Com base no exposto acima, dou meu consentimento para participar voluntariamente desta pesquisa. Tenho conhecimento que a minha cooperação com os compromissos marcados (consultas, exames) é essencial para o êxito do projeto, e autorizo os pesquisadores a me contatarem dentro de 5 dias, conforme as orientações que eu forneci, caso não justifique minha ausência a um compromisso marcado.

Nome do participante

Nome do pesquisador

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

Assinatura do responsável legal (em caso de menores de 18 anos)

Local: _____ Data: ____ / ____ / ____

Anexo 3

Tabela 6. Perfis e pontuação relacionados a árvore de classificação apresentada na página 5 do artigo *Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6; 1-7; 2012.

Perfil	Variáveis	Ponto(s)
1	Esplenomegalia e leucopenia –	0
2	Esplenomegalia –, leucopenia e tosse +	1
3	Esplenomegalia –, leucopenia +, tosse e emagrecimento –	2
4	Esplenomegalia +, leucopenia– e idade > 2 anos	3
5	Esplenomegalia –, leucopenia +, tosse – e emagrecimento +	4
6	Esplenomegalia +, leucopenia – e idade ≤ 2	5
7	Esplenomegalia e leucopenia +	6
—	RIFI	3
—	ELISA <i>L. chagasi</i>	4
—	Teste rápido	7
—	ELISA K39	8
—	DAT	8

- Negativo e + Positivo

Anexo 4

Tabela 7. Desempenho dos diferentes modelos, variação de pontos e cut-off para escores na árvore de classificação e regressão (CART) apresentada na página 5 do artigo *Predictive models for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6; 1-7; 2012.

Modelos	Varição de pontos	Cut-off para escores	Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	Área sob a curva ROC (%) (IC 95%)	Valor preditivo positivo (%) (IC 95%)
1. CART*	(0/6)	≥ 5	80,4 (73,0-87,0)	75,4 (63,5-85,0)	84,0 (76,2-91,3)	86,3 (79,0-92,0)
2. CART*			90,1 (81,0-96,0)	68,4 (51,3-82,5)	86,0 (75,3-96,0)	84,2 (74,0-92,0)
1. CART* + <i>L. chagasi</i> -ELISA	(0/10)	≥ 7	92,0 (86,0-96,0)	85,5 (75,0-93,0)	94,0 (90,2-97,4)	92,4 (86,5-96,3)
2. CART* + <i>L. chagasi</i> -ELISA			90,1 (81,0-96,0)	89,5 (75,2-97,0)	95,2 (91,4-99,0)	94,1 (86,0-98,4)
1. CART* + IFAT	(0/9)	≥ 6	92,5 (87,0-96,3)	71,0 (59,0-81,3)	94,0 (90,2-97,1)	86,0 (79,2-91,2)
2. CART* + IFAT			97,2 (92,2-100)	76,3 (60,0-89,0)	95,0 (89,0-100)	88,5 (79,2-95,0)
1. CART* + rK39-ELISA	(0/14)	≥ 9	98,0 (93,5-99,5)	88,4 (78,4-95,0)	97,2 (95,0-100)	94,2 (89,0-97,5)
2. CART* + rK39-ELISA			96,0 (88,1-99,1)	89,5 (75,2-97,1)	93,4 (87,0-100)	94,4 (86,4-98,5)
1. CART* + DAT	(0/14)	≥ 7	90,2 (84,0-95,0)	97,1 (90,0-100)	98,0 (96,1-99,5)	98,4 (94,2-100)
2. CART* + DAT			91,5 (82,5-97,0)	92,1 (79,0-98,3)	94,0 (87,3-100)	96,0 (88,0-99,1)
1. CART* + rK39 rapid test	(0/13)	≥ 8	94,0 (88,5-97,4)	98,5 (92,2-100)	99,0 (98,0-100)	99,2 (96,0-100)
2. CART* + rK39 rapid test			90,1 (81,0-96,0)	97,4 (86,2-100)	97,3 (95,0-100)	98,5 (92,0-100)

1 Amostra teste; 2 Amostra de validação. * O CART foi composto pelas variáveis: Esplenomegalia, leucopenia, tosse, idade e emagrecimento. Pontos das variáveis: CART (variação de 0 a 6 pontos de acordo com o perfil do paciente, para mais detalhes verificar tabela 6), RIFI= 3, ELISA *L. chagasi* = 4, teste rápido = 7, ELISArK39 e DAT = 8.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah KAA, Nour BYM, Schallig HDFH, Mergani A, Hamid Z, Elkarim AA, et al. Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. Trop Med Int Health 2004 Oct 9(10): 1127-31.

Abass EM, Mansour D, El Mutasim M, Hussein M, El Harith A. Beta-mercaptoethanol-modified ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis. J Med Microbiol 2006 Sep; 55(9): 1193-96.

Abass EM, Mahamoud A, Mansour D, Mohebbi M, El Harith A. Validation of a β -ME ELISA for detection of anti *Leishmania donovani* antibodies in Eastern Sudan. Iran J Immunol 2011 Sep; 8(3): 150-8.

Abreu MNS, Siqueira AL, Caiiffa W. Regressão logística ordinal em estudos epidemiológicos. Rev Saúde Pública 2009; 43(1): 183-94.

Adhya S, Chatterjee M, Hassan MQ, Mukherjee S, Sen S. Detection of *Leishmania* in the blood of early Kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995 Nov; 89(6): 622-4.

Agresti A. Categorical data analysis. New York: John Wiley, 1990.

Alam MJ, Rahman KM, Asna SM, Muazzam N, Ahmed I, Chowdhry MZ. Comparative studies on IFAT, ELISA & DAT for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. Bangladesh Med Res Counc Bull 1996 Apr; 22(1): 27-32.

Alborzi A, Rasouli M, Nademi Z, Kadivar MR, Pourabbas. Evaluation of rK39 strip test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in infants. East Mediterr Health J 2006 May-Jun; 12(3-4): 294-9.

Allain DR & Kagan IG. A direct agglutination test for leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1975; 24(2): 232-6.

Amato Neto Vicente, Amato VS, Tuon FF, Gakiya E, Marchi CR de, Souza RM de; et al. False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. *Int J Infect Dis* 2009 Mar; 13(2): 182-185.

Andrade CR & Nascimento AE. *Leishmania donovani donovani* and *Leishmania donovani chagasi* as antigens in a direct agglutination assay for the diagnosis of kala-azar. *Brazilian J Med Biol Res* 1989; 22(5): 611-615.

Andresen K, Gasim S, El Hassan AM, Khalil EA, Barker DC, Theander TG, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymphnode samples from patients from the Sudan. *Trop Med Int Health* 1997 Mai; 2(5): 440-444.

Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001Ago; 69(8): 4709-4718.

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 e HIV uninfected. *Clin Infect Dis* Mar 2007; 44: 1602–10.

Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis* 2008 Mar; 8:191-199.

Ali A & Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. Prevalence, incidence and relation of infection to disease in an endemic area. *Ann Trop Med Parasitol* 1994; 88(3): 289-93.

Al-Jurayyan NA, Al-Nasser MN, Al-Fawaz IM, Al Ayed IH, Al Herbish AS, Al-Mazrou AM, et al. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. *J Trop Pediatr* 1995 Jun; 41(3): 143-8.

Alkhoundi B, Mohebali M, Babakhan L, Edrissian GH, Eslami MB, Keshavarz, et al. Rapid detection of human *Leishmania infantum* infection: a comparative field study using the fast

agglutination screening test and the direct agglutination test. *Travel Med Infect Dis* 2010 Set; 8(5): 305-10.

Alvar VARJ, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008 Abr; 21(2): 334-59.

Araujo FG & Mayrink W. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1968 Jan-Fev; 10(1): 41-5.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1998 Jul; 59(1): 53-7.

Babiker ZO, Davidson R, Mazinda C, Kipnetich S & Ritmeijer K. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 2007 Abr; 76(4), 689-93.

Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensibility and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg* 1983 Mai; 32(3): 480-84.

Badaró R, Jones TC, Lourenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986a Out; 154(4): 639-49.

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986b Dez; 154(6): 1003-11.

Badaró R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of micro enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies in American visceral leishmaniasis antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 1986c Jan; 35(1): 72-8.

Barbosa-de-Deus R, Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, et al. *Leishmania* major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 Nov; 9(6): 1361-66.

Barquet N, Domingo P, Caylà JÁ, González J, Rodrigo C, Fernández- Viladrich P, et al. Prognostic factors in meningococcal disease: development of a bedside predictive model and scoring system. *JAMA* 1997 Ago; 278(6): 491-96.

Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, Pratlong F, et al. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect.* 2005 Out; 7(13): 1370-75.

Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD & Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 2000 Set; 63(3,4): 153-7.

Boelaert M, Safi SE, Goetghebeur E, Gomes-Pereira S, Le Ray D, Stuyft PVD. Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 1999 Mai; 4(5): 395-401a.

Boelaert M, Lynen L, Desjeux P, Van der Stuyft P. Cost-effectiveness of competing diagnostictherapeutic strategies for visceral leishmaniasis. *Bull World Health Organ* 1999, 77(8): 667-677b.

Boelaert M, El Safi S, Mousa H, Githure J, Mbatia P, Gurubacharya VL, et al. Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 1999 Jan; 4(1), 31-37c.

Boelaert M, El-safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in east Africa and the Indian subcontinent. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2008 Jan; 102(1): 32-40.

Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004 Jan; 70(1): 72-77.

Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi SH, Hailu A, Mondal D, et al. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov: S30-39.

Bossuyt PM & Reitsma JB. Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. The STARD initiative. Lancet 2003 Jan; 361(9351):12122-128.

Braga ASC. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

Brandonísio O, Fumarola L, Maggi P, Cavaliere R, Spinelli R, Pastore G. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002 Jun; 21(6): 461-64.

Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. Am J Trop Med Hyg 2002 Oct; 67(4): 344-48.

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: Recomendações clínicas para a redução da letalidade. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: MS, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: MS, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: MS, 2006.

Breiman L, Friedman J, Stone CJ, Olshen RA. Classification and regression trees. New York: Chapman & Hall; 1984.

Bryceson AM. Leishmaniasis. In: Manson's tropical Diseases, 20th edition, Cook, G.C. (editor). London: W.B. Saunders 1996; 1213-1243.

Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesis-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci 1993 Jan; 90: 775-79.

Caldas AJ, Costa JM, Silva AA, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002 Jan-Feb; 96(1): 21-8.

Cañavate C, Herrero M, Nieto J, Cruz I, Chicharro C, Aparicio P, et al. Evaluation of Two rK39 Dipstick Tests, Direct Agglutination Test, and Indirect Fluorescent Antibody Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in a New Epidemic Site in Highland Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 2011 Jan; 84(1): 102-6.

Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003 Mar; 68(3): 321-4.

Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1987 Dez; 156(6): 1030-33.

Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BM, Das ML, et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health* 2003 Mar; 8(3): 277-85.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov; 5(11): 873-82.

Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *MJJ* 2006 Out; 333(7571): 1-5.

Chappuis F, Rijal S, Jha UK, Desjeux P, Karki BM, Koirala S, et al. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. *Trop Med Int Health* 2006 Jan; 11(1): 31-40.

Chappuis F, Mueller Y, Nguimfack A, Rwakimari JB, Couffignal S, Boelaert M, et al. Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. *J Clin Microbiol* 2005 Dez; 43(12): 5973-77.

Chulay JD & Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1983 Mai; 32(3): 475–79.

Colin RB. Bioestatística usando R: Apostila para biólogos. Bragança, 2004.

Costa CHN, Tapety CMM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. Rev Soc Bras Med Trop 2007Jul-Ago; 40(4): 415-19.

Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saúde Pública 2008 Dez; 24(12): 2959-63.

Costa DL. Fatores de prognóstico na leishmaniose visceral: Alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb A. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006 Jan; 19(1): 111-26.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Canavate C, Figueras MC, et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006 Jul; 44(7): 2343-2347.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. Indian J Med Res 2006 Mar; 123(3): 357-88.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the Law of priority. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006a Fev; 101(1): 117-18.

Dantas-Torres F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006b Dez; 101(8): 929-30.

Davies CR & Mazloumi Gavgani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. Parasitology 1999 Set; 119(3): 247-57.

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 2003 Fev; 326(7385): 377-82.

Deane LM & Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de Kalazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *O Hospital* 1954; 45(4): 119-21.

Deane LM & Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1962 Mai-Jun; 4(3): 198-212.

Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A & Arias J. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of american visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 2001 Dez; 8(4): 355-357.

Deniau M, Canavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* 2003 Out; 97(1): 391-95.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997 Nov; 25(1): 1240-42.

Diro E, Techane Y, Tefera T, Assefa Y, Kebede T, Genetu A, et al. Field evaluation of FD-DAT, rK39 dipstick and KATEX (urine látex agglutination) for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007 Set; 101(9): 908-14.

Disch J, Maciel MC, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans R Trop Med Hyg* 2003 Jul-Ago; 97(4): 1-5.

Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2004 Nov-Dez; 92(3): 279-83.

Duxbury RE & Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1964 Jul; 13(4): 525-29.

Dye C & Williams BG. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. *Proc Biol Sci* 1993 Oct; 254(1339): 33-9.

El Harith A, Kolk AHJ, Kager PA. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80(4): 583-587.

El Harith A, Kolk AHJ, Kager PA, Leeuwenburg J, Faber FJ, Muigai R, et al. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81(4): 603-6.

El Harith A, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, et al. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1988 Jul; 26(7):1321-25.

El-Moamly A, El-Sweify M, Hafeez M. Performance of rK39 immunochromatography and freeze-dried direct agglutination tests in the diagnosis of imported visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2012 Jan; 110(1): 349-54.

Enøe C, Georgiadis MP, Johnson WO. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true state of disease is unknown. *Prev Vet Med* 2000 May; 45(1-2): 61-81.

Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa A, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992 Nov; 166(5): 1124-32.

Farajnia S, Darbani B, Babael H, Alimohammadian MH, Mahboudi F, Gavvani AM. Development and evaluation of *Leishmania infantum* rK26 ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Iran. *Parasitology* 2008 Aug; 135(9): 1035-41.

Ferreira AW & Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Figueiró-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Maia TL. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2004; 12(1): 31–40.

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* 2008 Mai; 78(5): 741-44.

Fissore C, Delaunay P, Ferrua B, Rosenthal E, Del Giudice P, Aufreuve JP, et al. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2004 Nov; 42(11): 5332-33.

Garcez LM, Shaw JJ & Silveira F. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. *Rev Bras Soc Med Trop* 1996 Mar; 29(2): 165-80.

Gibson M. The identification of the Kalazar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Med Hist* 1983 Abr; 27(2): 203-213.

Goswami RP, B Bairagi, Kundu Gowsmani. K39 Strip Test - Easy, Reliable and Cost-Effective Field Diagnosis for Visceral Leishmaniasis in Índia. *JAPI* 2003 Ago; 51: 759-61.

Goyal RK & Mohapatra TM. Superiority of DAT over ELISA as a diagnostic and seroepidemiological tool for the diagnosis of Indian Kala-azar. *Indian J Med Microbiol* 2004 Jan-Mar; 22(1): 57-60.

Grech V, Mizzi J, Mangion M, Vella C. Visceral leishmaniasis in Malta- an 18 year pediatric, population based study. *Arch Dis Child* 2000 Mai; 82(5): 381-85.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002 Ago; 2(8): 494-501.

Hailu A & Berhe N. The performance of direct agglutination test (DAT) in the diagnosis of visceral leishmaniasis among Ethiopian patients with HIV co-infection. *Ann Trop Med Parasitol* 2002 Jan; 96(1): 25-30.

Hailu A, Schoone GJ, Diro E, Tesfaye A, Techane Y, Tefera T, et al. Field evaluation of a fast anti-*Leishmania* antibody detection assay in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006 Jan; 100(1): 48-52.

Hadgu A & Y Qu. A biomedical application of latent class models with random effects. *J R Stat Soc Ser* 1998 Jan; 47(4): 603-16.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999 Out; 354(9185): 1191-9.

Ho EA, Soong T, Li Y. Comparative merits of sternum, spleen, e liver punctures in the study of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1948 Mar; 41(5): 629-36.

Ho M, Leeuwenburg J, Mbugua G, Wamachi A, Voller A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(5): 943-946.

Horst R, Tefera T, Assefa G, Ebrahim AZ, Davidson RN, Ritmeijer K. Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 2009 Jun; 80(6): 929-34.

Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley, 1989. 307p.

Hosmer DW & Lemeshow S. *Applied logistic regression*. 2. Ed. New York: Jonh Wiley & Sons; 2000.

Houghton RL, Petrescu M, Benson DR, Sheiky YA, Scalone A, Bararó R, et al. A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J Infect Dis* 1998 Mai; 177(5): 1339-44.

Hui SL & Walter SD. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 1980 Mar; 36, 167-71.

Islam MZ, Itoh M, Mirza R, Ahmed I, Saifuddin EKram ARM, Sarde AH, et al. Direct Agglutination test with urine samples for the diagnostic of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004 Jan; 70(1): 78-82.

Jelinek T, Eichenlaud S, Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999 Sep; 18(9): 669-70.

Khan MGM, Alam MS, Podder MP, Jamil MIKM, Raque S, Wagatsuma Y. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. *Parasites & Vectors* 2010; 3: 114.

Khan GM, Alam MS, Bhuiyan AT, Jamil MA, Saha B, Islam M, et al. Evaluation of a New Rapid Diagnostic Test for Quality Assurance by Kala Azar Elimination Programme in Bangladesh. *J Parasitol Res* 2011 Nov; 1-3.

Kager PA & Rees PH. Splenic aspiration, review of the literature. *Trop Geogr Med* 1983 Jun; 35(2): 111-24.

Katakura K, Kawazu SI, Sanjyoba C, Naya T, Matsumoto Y, Ito M, et al. Leishmania mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. *Tokai J Exp Clin Med* 1998 Dez; 23(6): 393-99.

Kiliç S, Taylan Ozkan A, Babur C, Tanir G, Shallig H. Evaluation of serological tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Turk J Med Sci* 2008; 38(1): 13-19.

Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Path Exot* 1985; 78(5): 747-55.

Kurkjian KM, Vaz LE, Haque R, Cetre-Sossah C, Akhter S, Roy S, et al. Application of an improved method for the recombinant K39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin Diag Lab Immunol* 2005 Dez; 12(12): 1410-15.

Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reyenes 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* 2000 Jan; 38(1): 236-40.

Landis JR & Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977 Mar; 33(1): 159-74.

Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Dez; 100(8): 811-27.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ryan L, Povia MM, et al. *A Leishmania e as leishmanioses*. Ministério da Saúde, Fundação serviços de saúde pública 1986; 1: 80-124.

Lockwood DNJ & Sundar S. Serological tests for visceral leishmaniasis. *BMJ* 2006 Out; 333(7571): 711-12.

Luz ZMP, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001 Mai-Jun; 34(3): 249-54.

Luz KG, Silva VO da, Gomes EM, Machado FC, Araujo MA, Fonseca HE, et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. *Am J Trop Med Hyg* 1997 Ago; 57(2): 168-71.

Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Salah AB, Bahloul C, Amri F, et al. Comparative evaluation of Elisas based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003 Mar; 68(3): 312-20.

Machado de Assis TS de, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN, et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde* 2008 Jun; 17(2): 105-116.

Machado de Assis TS, Caligiorme RB, Romero GAS, Rabello A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009 Dez; 103(13), 1269-72.

Maciel BLL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvão J, Pontes NN, Dimenstein SEM, et al. Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg 2008 Oct; 79(4): 591-8.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM de, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad Saúde Pública 2008 Dez; 24(12): 2941-47.

Maia Z, Lírio M, Mendes CMC, Mehta SR, Badaró R. Comparative study of Rk39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. PLOS Negl Trop Dis 2012 Jan; 6(1): 1-8.

Malik ANJ, Lawrence J, Bryceson DM, Lockwood DN. Changing pattern of visceral leishmaniasis, United Kingdom, 1985-2004. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1257-1259.

Mandal J, Khurana S, Dubey ML, Bhatia P, Varma N & Malla N. Short report: Evaluation of direct agglutination test, rK39 test, and ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2008; 79(1): 76-8.

Manson-Bahr PEC. The leishmanin test and immunity in Kala-azar. East Afr Med J 1987 Apr; 38: 1596-601.

Maurício IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology 1999 Sep; 119(3): 237-46.

Martins CAC. Análise de regressão logística. 1998. 53 f. (Dissertação de Mestrado) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1988.

Mayrink W, Araujo FG, Magalhães PA. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. Rev Inst Med Trop São Paulo 1967; 172-175.

Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. J Clin Microbiol 2005 Jul; 43(7): 3038-41.

Mathur P, Samantaray J & Kumar N. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of kala-azar & post kala-azar dermal leishmaniasis at a tertiary care centre of north India. *Indian J Med Res* 2005 Dez; 122(6): 485-90.

Medrano FJ, Hernández-Quero J, Jiménez E, Pineda JA, Rivero A, Sánchez-Quijano, et al. A. Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain? *AIDS* 1992 Dez; 6(12): 1499-503.

Medrano FJ, Canavate 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* 1998 Jul; 59(1): 155-62.

Mengistu G, Akuffo H, Fehninger TE, Negese Y, Nilsen R. Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 Mar-Abr; 86(2): 154-57.

Mello FCQ. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

Mello FCQ, Bastos LGV, Soares SLM, Rezende VMC, Conde MB, Chaisson RE, et al. Predicting smear negative pulmonary tuberculosis with classification trees and logistic regression: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 2006 Fev; 6: 1-8.

Meredith SEO, Kroon NC, Sondorp E, Seaman J, Goris MGA, Van Ingen CW, et al. Leish-KIT, a Stable Direct Agglutination Test Based on Freeze-Dried Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1995 Jul; 33(7): 1742-45.

Meineck CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala Azar) From an Asymptomatic Mother to Her Child. *Pediatrics* 1999 Nov; 104(5): 65.

Migone LE. Un caso de kala-azar a Assuncion. *Bull Soc Path Exot* 1913; 6: 118-20.

Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky EM & Dias ES. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2011 Jan-Fev; 44(1): 76-8.

Mikaeili F, Fakhar M, Sarkari B, Motazedian MH & Hatam G. Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFAT) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. Iran J Immunol 2007 Jun; 4(2): 116-21.

Mittal V, Bhatia R, Sehgal S. Serodiagnosis of Indian kala-azar: evaluation of IFA, ELISA and CIEP tests. J Commun Dis 1991 Jun; 23(2): 131-34.

Moral L, Rubio EM, Moya MA. A leishmanin skin test survey in the human population of Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002 Mar-Apr; 96(2): 129-32.

Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 2010 Mar; 4(2): 114-7.

Muazzam N, Rahman KM, Miah RA, Asna SMZH. Indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. Bangladesh Med Res Counc 1992 Dez; 18(2): 77-81.

Mullis KB & Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. Meth Enzymol 1987; 155(1): 335-50.

Mutasim M, Mansour D, Abass EM, Hassan WM & El Harith A. Evaluation of a glycerol-preserved antigen in the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis at rural level in eastern Sudan. J Med Microbiol 2006 Oct; 55(10): 1343-47.

Neto VA. Visceral leishmaniasis with an incubation period of at least 4 years. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1978 Set-Out; 20(5): 312-4.

Oliveira ALL de, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, et al. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006 Set-Out; 39(5): 446-50.

Oliveira E, Pedras MJ, De Assis IE, Rabello A. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009 Dez; 103(12): 1279-81.

Oliveira E, Saliba SW, Andrade CF, Rabello A. Direct agglutination test (DAT): Improvement of biosafety for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011 Jul; 105(7): 414-16.

Orsini M, Canela JR, Disch J, Maciel F, Greco D, Toledo Junior A, et al. High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. Infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, In press 2012.

Oskam L, Nieuwenhuijs JL & Hailu A. Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 Mai-Jun; 93(3): 275-77.

Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997 Oct; 35(10): 2454-57.

Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MMS. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr* 2002; 78(2): 120-27.

Pedras MJ, Viana LG, Oliveira EJ de, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008 Fev; 102(2): 172-78.

Peeling RW, Smith PG, Bossuyt PM. A guide for diagnostic evaluations. *Nat Rev Microbiol* 2006 Dez; 4: S2-6.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-Médico* 1934; 48: 949-950.

Pedrosa CM & Rocha EM da. Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004 Jul-Ago; 37(4): 300-4.

Piarroux R, Gamberelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for the diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994 Mar; 32(3): 745-49.

Piscoppo TV & Mallia Azzopardi C. Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 2007 Fev; 83(976): 649-57.

Rabello A, Orsini M, Disch Y. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 2003 Out; 97(1): 17-28.

Reithinger R & Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007 Jan; 45(1): 21-25.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Com* 1990; 65(3): 111-15.

Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngetich S, O'Keeffe C, Davidson RN. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2006 Jan; 74(1): 76-80.

Ritmeijer K, Davidson RN. Field research in humanitarian medical programmes. Médecins Sans Frontières interventions against kala-azar in the Sudan, 1989–2003. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene joint meeting with Médecins Sans Frontières at Manson House, London, 20 March 2003. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 609-613.

Rodrigues, MAS. Árvores de classificação. Monografia apresentada ao Departamento de Matemática da Universidade de Açores. 2004.

Rogers L. Preliminary note on the development of trypanosoma in cultures of the Cunningham-Leishman-Donovan bodies of cachexial fever and kala-azar. Lancet 1904 Jul; 2(4221): 215-6.

Romero GAS & Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – A systematic review. Plos Neglected Tropical Diseases 2010 Jan; 4(1): 1-16.

Saghrouni F, Gaied-Meksi S, Fathallah A, Amri F, Ach H, Guizani I, et al. Immunochromatographic rK39 strip test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Tunisia. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008 Dez; 103 (13): 1273-78.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230: 1350-1354.

Santos, AM. Redes neurais e árvores de classificação aplicadas ao diagnóstico da tuberculose pulmonar paucibacilar. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffman MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998 Jul; 12(3): 315-17.

Santos M, Braga JU, Gomes RV, Werneck GL. Predictive Factors for Pneumonia Onset After Cardiac Surgery in Rio de Janeiro, Brazil. Infect Control Hosp Epidemiol 2007 Abr; 28(4): 382-88.

Salotra P, Sreenivas G, Pogue GP, Lee N, Nakhasi HL, Ramesh V, et al. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. J Clin Microbiol 2001 Mar; 39(3): 849-54.

Sarkari B, Hatam GR, Mikaeili F, Sadeghi H, Ebrahimi S. A comparative study of antigen and antibody detection in visceral leishmaniasis using serum and urine-based ELISA. Trop Biomed 2008 Ago; 25(2): 96–99.

Sarker CB, Momen A, Jamal MF, Siddiqui NI, Siddiqui FM, Chowdhury KS, et al. Immunochromatographic (rK39) strip test in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Mymensingh Med J* 2003 Jul; 12(2): 93-7.

Sarnoff R, Desai J, Desjeux P, Mittal A, Topno R, Siddiqui N, et al. The economic impact of visceral leishmaniasis on rural households in one endemic district of Bihar, India. *Trop Med Intern Health* 2010 Jul; 15(2): 42-9.

Schallig HDFH & Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Intern Health* 2002a Ago; 7(8): 641-51.

Schallig HDFH, Canto-Cavalheiro M, Silva ES da. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002b Out; 97(7): 1015-18b.

Srivastava L. Comparative evaluation of serological tests in diagnosis of calazar. *Indian J Med Res* 1989; 89: 265-270.

Srivastava L, Chakravarty AK, Kumar A, Kumar P. Comparison of ELISA & indirect immunofluorescence in sero-epidemiology of Kalazar. *Indian J Med Res* 1984 Jun; 79: 744-8.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011 Jan; 105(1): 1-6.

Shaefer KU, Kurtzhals JA, Gachihi GS, Muller AS, Kager PA. A prospective sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995 Set-Out; 89(5): 471-5.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 577-579.

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.

Silva ES, Choone GJ, Gontijo CMF, Brazil RP, Pacheco RS, Schallig HDFH. Application of Direct Agglutination Teste (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Kinetoplastid Biol Dis* 2005 Jun; 4(4): 1-5.

Singh DP, Goyal RK, Singh RK, Sundar S & Mohapatra TM. In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of Kala-azar. *J Health Popul Nutr* 2010 Jun; 28(3): 281-85.

Singla N, Singh GS, Sundar S, Vinayak VK. Evaluation of the direct agglutination test as an immunodiagnostic tool for kala-azar in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993 Mai-Jun; 87(3): 276-78.

Sinha R & Sehgal S. Comparative evaluation of serological tests in Indian Kala-azar. *J Trop Med Hyg* 1994 Dez; 97(6): 333-40.

Sinha PK, Bimal S, Singh SK, Pandey K, Gangopadhyay DN, Bhattacharya SK. Pre- & post-treatment evaluation of immunological features in Indian visceral leishmaniasis (VL) patients with HIV co-infection. *Indian J Med Res* 2006 Mar; 123(3):197-202.

Sundar S, Sahu M, Mehta H, Gupta A, Kohli U, Rai M, et al. Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. *Clin Infect Dis* 2002 Set; 35(5): 581-86.

Sundar S & Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immunol* 2002 Set; 9(5): 951-58.

Sundar S, Reed SG, Singh R, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998 Fev; 351(9102): 563-65.

Sundar S, Singh RK, Bimal SK, Gidwani K, Mishra A, Singh SK, et al. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in india: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop Med Int Health* 2007 Fev; 12(2): 284-89.

Sundar S, Singh RK, Maurya R, Kumar B, Chhabra A, Singh V, et al. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2006 Jun; 100(6): 533-37.

Tabela de procedimentos, medicamentos do SUS. <http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada>. Acesso em 05/05/2012.

Takagi H, Islam MZ, Itoh M, Islam A, Ekram ARMS, Hussaim SM, et al. Production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2007 Mai; 76(5): 902–5.

Terán-Ángel G, Rodriguez V, Silva R, Zerpa O, Schallig H, Ulrich M, et al. Herramientas no invasivas em Venezuela: comparación entre las pruebas inmunoserológicas DAT, rK26 Y rK39 em el diagnóstico de leishmaniasis visceral. *Biomédica* 2010 Mar; 30(1): 39-45.

Terán-Ángel G, Schallig H, Zerpa O, Rodriguez V, Ulrich M. The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Biomédica* 2007 Set; 27(3): 447-53.

Urias EVR, Carvalho SFV, Iliveira CR, Carvalho MR, Teles LF, Rodrigues MC, et al. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 31(5): 348-54.

Vaish M, Bhatia A, Reed SG, Chakravarty J, Sundar S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. *Clin Microbiol Infect* 2012 Jan; 18(1): 81-5.

Veeken H, Ritmeijer K, Searman J & Davidson R. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudão. *Trop Med Int Health* 2003; 8(2): 164-67.

Viana LG de. Avaliação de métodos sorológicos na abordagem diagnóstica da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Viana LG de, Machado de Assis TS, Orsini M, Silva AR da, Souza GF de, Caligiorne R, et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008 Jun; 102(6): 548-55.

Werneck G, Carvalho DM, Barroso DE, Cook EF, Walker AM. Classification trees and logistic regression applied to prognostic studies: A comparison using meningococcal disease as an exemple. *J Trop Pediatrics* 1999 Ago; 45(4): 248-51.

Werneck G, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The Urban Spread of Visceral Leishmaniasis: Clues from Spatial Analysis. *Epidemiology* 2002 Mai; 13(3): 364-67.

World Health Organization. *Leishmania/HIV Co-infection in South-Western Europe 1990–1998: Retrospective Analysis of 965 Patients*. Geneva: World Health Organization, WHO/LEISH/2000.42, 2000.

World Health Organization Technical Report Series. *Control of the Leishmaniasis*, 2010a.

World Health Organization. <http://www.who.int/leishmaniasis>, acessado em 08/11/2010b.

World Health Organization. *The use of visceral leishmaniasis rapid diagnostic tests*, 2010c.

World Health Organization. *Rapid tests for visceral leishmaniasis*, 2011.

Wu Z, Bao Y, Yu M, Lu L, Zhang Y. An experimental study on application of PCR in detection of Kala-azar. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997 Mar; 28(1): 167-72.

Zinchuk A & Nadruga A. Congenital visceral leishmaniasis in Ukraine: case report. *Ann Trop Paediatr* 2010; 30(2): 161-64.

Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 Fev; 6(2): 108-13.

Zijlstra EE, Siddig Ali M, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kalazar: a comparative study of parasitological and methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 Set-Out; 86(5): 505-7.

Zijlstra EE, Siddig M, El-Hassan PA, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Direct agglutination test for diagnosis and sero-epidemiological Surrey of kala-azar in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991 Jul-Ago; 85(4): 474–76.

Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG, et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998 Set; 5(5): 717-20.