

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

Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana

por

Mariana Lourenço Freire

Belo Horizonte

2017

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR

M.L. FREIRE

2017

Mariana Lourenço Freire

Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Ana Lúcia Teles Rabello

Coorientação: Dra. Tália Machado de Assis

Belo Horizonte

2017

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

F866a
2017

Freire, Mariana Lourenço.

Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana / Mariana Lourenço Freire. – Belo Horizonte, 2017.

xv, 86 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 86 - 101

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre 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. *Leishmania donovani* /parasitologia 3. Kit de Reagentes para Diagnóstico/utilização
I. Título. II. Rabello, Ana Lúcia Teles (Orientação). III. Assis, Tália Machado de (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Mariana Lourenço Freire

Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Ana Lúcia Teles Rabello (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Luciana Almeida Silva Teixeira (UFTM) Titular

Prof. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 21/02/2017.

*“Renova-te.
Renasce em ti mesmo.
Multiplica os teus olhos, para verem mais.
Multiplica-se os teus braços para semeares tudo.
Destrói os olhos que tiverem visto.
Cria outros, para as visões novas.
Destrói os braços que tiverem semeado,
Para se esquecerem de colher.
Sê sempre o mesmo.
Sempre outro. Mas sempre alto.
Sempre longe.
E dentro de tudo.”*

Cecília Meireles

*Dedico este trabalho aos meus pais, meus maiores incentivadores e
a todos que contribuíram para sua realização.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Eliane, meu grande exemplo, pelo apoio incondicional e força transmitida. Muito obrigada por todos ensinamentos de vida, por estar sempre por perto, mesmo com a distância e me mostrar a todo instante, que só existe o presente, aqui e agora!

Ao meu pai José Carlos, pela confiança para iniciar esta nova etapa, por todos os conselhos, incentivo e carinho de sempre.

À minha orientadora, Dra. Ana Rabello, pela oportunidade concedida em uma “seleção feita pela alma”. Muito obrigada pelo apoio, ricos ensinamentos e auxílio nos momentos mais decisivos para realização deste trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Tália Machado de Assis, pelo apoio, confiança e por acreditar sempre no meu melhor. Por todos ensinamentos, que foram essenciais para este trabalho e para minha formação. De coração, muito obrigada por tudo!!!

Ao Dr. Edward de Oliveira e Dr. Daniel Avelar, por todo conhecimento transmitido, ajuda nos experimentos e paciência diária diante de todos meus questionamentos. Vocês foram essenciais para a concretização deste trabalho!

À Verônica Faria, Nayara Castelano, Lindicy Alves, Carolina Senra, Diana Oliveira, Eduardo Ribeiro e Dian Pinheiro, pelo apoio e convivência diária, tanto nos momentos de descontração como nos momentos mais difíceis. Vocês fizeram esta jornada ser mais fácil, divertida e muito mais especial!

Ao Dr. Marcelo Pascoal, Dra. Gláucia Cota e Dr. Roberto Sena, pelas conversas e todo aprendizado transmitido.

A todos amigos do CPqRR, em especial ao Felipe Dutra, por estar sempre disposto a ajudar, com seus conhecimentos, experiências e principalmente nas conversas diárias, com valiosos conselhos e apoio emocional. Obrigada por tudo!

A todos do grupo Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelo convívio diário e ensinamentos. Em especial a Lara Saraiva, Jussara Martins e a Érika.

À melhor turma de pós-graduação, em especial a Kathy, Karine, Jordana e Natália. Obrigada por todos os momentos vividos nestes dois anos, pelo companheirismo, nos sufocos e nas horas de descontração!

Ao meu irmão Flávio e minha prima-irmã Livia, pelo incentivo e apoio de sempre.

À Dra. Elaine Soares Coimbra, minha orientadora na graduação, por me iniciar na carreira científica e me apoiar na busca por novas experiências.

Ao Ronaldo Barbosa, da Fundação Ezequiel Dias, pelo treinamento realizado e todas as informações do serviço que detalhadamente foram fornecidas.

Às empresas Virion Diagnostica Ltda e Alka[®] Tecnologia distribuidora, que doaram os kits avaliados neste estudo e em especial às assessoras científicas Alessandra Taveira e Carolina Rodrigues, que acompanharam os experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e o Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante a realização deste trabalho.

A todos que, de alguma forma contribuíram para concretização desta realização profissional.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) humana é uma doença potencialmente fatal se não diagnosticada e tratada precocemente. Assim, a disponibilização de testes diagnósticos com elevado desempenho, simplicidade de uso e baixo custo, são de extrema importância para o controle da LV. Uma das dificuldades para o diagnóstico da LV no Brasil é a atual comercialização de testes diagnósticos não validados no país. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho e estimar os custos diretos dos kits diagnósticos para LV humana registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária e comercialmente disponíveis no Brasil. Para avaliação de desempenho dos testes, foram incluídos no estudo amostras de soro de 237 pacientes residentes em área endêmica para LV, que apresentavam clínica sugestiva da doença e exame parasitológico de aspirado de medula óssea realizado, sendo 160 pacientes não portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e 77 portadores de HIV. Os custos diretos foram estimados através da técnica de microcusteio sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde. Os seguintes testes foram incluídos nas análises: IFI Leishmaniose Humana (Fundação Oswaldo Cruz); IT LEISH[®] (BIO-RAD Laboratories, Inc.); Kalazar Detect[™] (Inbios International, Inc.); *Leishmania* ELISA IgG +IgM (Vircell S. L.); Ridascreen *Leishmania* Ab (R-Biopharm AG); *Leishmania* IFA IgG (Vircell S. L.) e DAT-LPC protótipo. Na análise global dos testes, apenas o teste não comercial DAT-LPC e o IT LEISH[®] apresentaram acurácia diagnóstica acima de 90%, sendo 93,7% e 91,1%, respectivamente. Para os pacientes não portadores de HIV, os testes com melhor desempenho foram IT LEISH[®], DAT-LPC e Kalazar Detect[™], apresentando sensibilidade e especificidade de 96,3% e 96,3%; 93,8% e 97,5%; 92,5 e 95,0%, respectivamente. Já para os pacientes portadores de HIV, o DAT-LPC foi o único teste que apresentou desempenho satisfatório, com sensibilidade de 89,5% e especificidade de 89,7%. Os testes *Leishmania* ELISA IgG +IgM, Ridascreen *Leishmania* Ab e *Leishmania* IFA IgG, apresentaram acurácia inferior a 88%, tanto na análise global como nas estratificada. Em termos de custo, o DAT-LPC foi o teste que apresentou menor custo direto, estimado em R\$ 15,47, seguido do Kalazar Detect[™] e do IT LEISH[®] realizado em sangue capilar digital, estimado em R\$ 22,34 e R\$ 26,82, respectivamente. Para os testes *Leishmania* IFA IgG, *Leishmania* ELISA IgG+IgM e Ridascreen[®] *Leishmania* Ab, o elevado custo não foi compensado pelo desempenho obtido no presente estudo. Os dados alcançados permitem recomendar o estabelecimento de critérios rigorosos para registro de testes para o diagnóstico da LV no país. O erro diagnóstico é agravado pela toxicidade dos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da doença, em caso de resultados falso-positivos e pelo atraso do início do tratamento e manutenção da elevada letalidade, em caso de resultados falso-negativos.

Palavras-chaves: Leishmaniose Visceral. *Leishmania*. Diagnóstico.

ABSTRACT

Human visceral leishmaniasis (VL) is potentially fatal disease if not diagnosed and treated early. In this context, the availability of diagnostic tests with high performance, simplicity of use and low cost are extremely important for the control of the VL. One of the difficulties for the diagnosis of VL in Brazil is the current commercialization of diagnostic tests not validated in the country. Thus, the aim of this study was to evaluate the performance and estimate the direct costs of the diagnostic kits for VL registered in the National Health Surveillance Agency and commercially available in the Brazil. To evaluate the performance of the tests, were included in the study, serum samples from 237 patients of the endemic area, with a suggestive clinical examination of VL and submitted to the examination of bone marrow aspirate, of these 160 are non-HIV-infected individuals and 77 are HIV-infected individuals. The direct costs were estimated through the micro-costing technique from the perspective of the Unified Health System. The following tests were included in the analyzes: IFI Human Leishmaniasis (Fiocruz); IT LEISH[®] (BIO-RAD Laboratories, Inc.); Kalazar Detect[™] (Inbios International, Inc.); *Leishmania* ELISA IgG + IgM (Vircell S.L.); Ridascreen *Leishmania* Ab (R-Biopharm AG); *Leishmania* IFA IgG (Vircell S.L.) and DAT-LPC. In the global analysis of the tests, only DAT-LPC and IT LEISH[®] presented diagnostic accuracy above 90%, being 93,7% and 91,1%, respectively. For non-HIV-infected individuals, the best-performing tests were IT LEISH[®], DAT-LPC and Kalazar Detect[™], presenting sensitivity and specificity of 96,3% and 96,3%; 93,8% and 97,5%; 92,5 and 95,0%, respectively. For HIV-infected individuals, DAT-LPC was the only test that presented satisfactory performance, with 89,5% of sensitivity and 89,7% of specificity. The *Leishmania* ELISA IgG + IgM, Ridascreen *Leishmania* Ab and *Leishmania* IFA IgG tests showed an accuracy of less than 88%, in the global and in the stratified analysis. About the cost, DAT-LPC was also the lowest direct cost test, estimated at US\$ 4,91, followed by Kalazar Detect[™] and IT LEISH[®] in digital capillary blood estimated at US\$ 7,09 and US\$ 8,51, respectively. For the *Leishmania* IFA IgG, *Leishmania* ELISA IgG + IgM and Ridascreen *Leishmania* Ab tests, the high cost was not compensated by the performance obtained in the present study. The data obtained allow us to recommend the establishment of strict criteria for the registration of tests for the diagnosis of VL in the country. The diagnostic error is aggravated by the toxicity of the drugs currently available for the treatment of the disease, in the case of false-positive results, and by delayed initiation of treatment and maintenance of high lethality in case of false-negative results.

Key words: Visceral Leishmaniasis. *Leishmania*. Diagnosis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Registros de kits diagnósticos para leishmaniose visceral humana na Agência Nacional de Vigilância Sanitária em dezembro de 2016.....	47
Quadro 2 Kits diagnósticos para leishmaniose visceral humana com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária comercialmente disponíveis no Brasil, em dezembro de 2016.	48
Quadro 3 Kits diagnósticos para leishmaniose visceral humana incluídos no estudo e suas características.....	51
Quadro 4 Detalhamento dos itens incluídos nas estimativas de custo direto dos kits diagnósticos avaliados.	58
Quadro 5 Interpretação de índice <i>Kappa</i> de acordo com Shrout (1998).....	59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica de kits diagnósticos disponíveis comercialmente para leishmaniose visceral humana no Brasil. 61
- Tabela 2** Sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica de kits diagnósticos disponíveis comercialmente para leishmaniose visceral humana no Brasil, estratificada para pacientes não portadores e portadores de infecção pelo HIV. 63
- Tabela 3** Análise de concordância dos kits diagnósticos disponíveis comercialmente para leishmaniose visceral humana no Brasil..... 65
- Tabela 4** Itens incluídos nas estimativas de custos diretos dos testes diagnósticos. 67
- Tabela 5** Custo direto e tempo para realização dos testes em centro de referência para leishmanioses..... 69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitros
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CNPJ	Cadastro Nacional de Pessoas Jurídicas
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
CRL	Centro de Referência em Leishmanioses
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DAT	Teste de aglutinação direta (do inglês “ <i>Direct Agglutination Test</i> ”)
DAT-ITM	DAT produzido por <i>Prince Leopold Institute of Tropical Medicine</i>
DAT-KIT	DAT produzido por <i>The Royal Tropical Institute</i>
DAT-LPC	DAT produzido no Laboratório de Pesquisas Clínicas
DO	Densidade ótica
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês “ <i>Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay</i> ”)
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
kDNA	DNA do cinetoplasto
LACENS	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LPC	Laboratório de Pesquisas Clínicas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMC	Método de cultura em microcapilar
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
PAHO	Pan American Health Organization
PBS	Tampão fosfato salino
PCPP	Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias
PCR	Reação em cadeia polimerase (do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”)
PDIV	Produtos de diagnóstico de uso <i>in vitro</i>
PVCLV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
qPCR	PCR em tempo real (do inglês “ <i>real-time PCR</i> ”)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rK39	Antígeno recombinante K39
SQBA	Serviço de Gestão da Qualidade, Biossegurança e Ambiente
SUS	Sistema Único de Saúde
TDR	<i>Programme for Research and Training in Tropical Diseases</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 As leishmanioses	18
3.2 A leishmaniose visceral	20
3.2.1 Diagnóstico	23
3.2.1.1 Diagnóstico clínico	23
3.2.1.2 Diagnóstico parasitológico	24
3.2.1.3 Diagnóstico imunológico	25
3.2.1.3.1 Reação de imunofluorescência indireta	26
3.2.1.3.2 Ensaio imunoenzimático	28
3.2.1.3.3 Teste de aglutinação direta	31
3.2.1.3.4 Testes imunocromatográficos	34
3.2.1.4 Diagnóstico molecular	39
3.3 Registro de produtos para diagnóstico de doenças	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Cálculo amostral	45
4.2 Critérios de inclusão e exclusão de amostras biológicas	45
4.3 Grupos de estudo	45
4.4 Identificação dos produtos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária	46
4.5 Identificação dos testes diagnósticos comercialmente disponíveis no Brasil	48
4.6 Parcerias estabelecidas e kits incluídos no estudo	49
4.7 Procedimentos para realização dos kits avaliados	52
4.7.1 Reação de imunofluorescência indireta	52
4.7.1.1 IFI Leishmaniose Humana (Bio-Manguinhos)	52
4.7.1.2 <i>Leishmania</i> IFA IgG (Vircell S. L.)	52
4.7.2 Ensaio Imunoenzimático	53
4.7.2.1 <i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM (Vircell S. L.)	53
4.7.2.2 Ridascreen® <i>Leishmania</i> Ab (R-Biopharm)	54
4.7.3 Teste de Aglutinação Direta	55
4.7.4 Testes imunocromatográficos	55
4.7.4.1 Kalazar Detect™ (Inbios)	55
4.7.4.2 IT LEISH® (BIO-RAD)	55
4.8 Estimativas dos custos diretos dos kits diagnósticos avaliados	56
4.9 Análise de dados	59
4.10 Aspectos éticos	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Desempenho dos testes diagnósticos avaliados	60
5.2 Concordância entre os testes diagnósticos avaliados	64
5.3 Custo dos testes diagnósticos	65
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) humana é uma doença parasitária grave e fatal se não diagnosticada e tratada precocemente. Para reduzir a letalidade e aumentar a eficiência da atenção aos portadores da doença, a disponibilidade de testes diagnósticos de simples realização e interpretação, alto desempenho e baixo custo, que possam ser utilizados em locais remotos, é essencial. Apesar da necessidade de testes diagnósticos com estas características, o arsenal disponível é limitado. Além disso, existem testes em uso no Brasil, que ainda não foram validados nos países, mas são utilizados por laboratórios públicos e privados em todo o território nacional.

A necessidade de validação dos kits registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e comercialmente disponíveis para o diagnóstico da LV é o eixo central da presente dissertação. Em 2014, os pesquisadores do grupo de pesquisa “Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias” (PCPP) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) identificaram a insuficiência de estudos de validação de kits registrados na ANVISA para LV, viram a urgente necessidade de avaliação do desempenho dos mesmos e se propuseram a executar o trabalho.

O projeto intitulado “Avaliação de desempenho e custo-efetividade de métodos diagnósticos para a leishmaniose visceral humana” foi submetido ao edital Universal 01/2015 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), tendo recebido resposta positiva de financiamento de pesquisa por esta agência de fomento em dezembro de 2015. Como o recurso ainda não foi liberado, a condução de parte do estudo original submetido à FAPEMIG foi possível pela parceria firmada entre pesquisadores do PCPP e as empresas que fabricam e/ou distribuem os testes diagnósticos registrados no Brasil.

A atual dissertação de mestrado está compreendida neste projeto maior e apresenta dados inéditos relacionados à avaliação de desempenho e estimativa dos custos diretos de kits registrados na ANVISA para LV e disponíveis comercialmente no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho e os custos diretos de kits diagnósticos para LV humana comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica de kits para LV humana comercialmente disponíveis no Brasil;
- Estimar os custos diretos de kits de diagnóstico para LV humana comercialmente disponíveis no Brasil;
- Comparar os desempenhos e custo direto dos testes comercialmente disponíveis no Brasil com o teste protótipo DAT-LPC.

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* Ross, 1903. Este gênero apresenta grande diversidade, com 53 espécies descritas, destas, 20 são consideradas patogênicas aos seres humanos, sendo agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Lainson et al., 1987; Akhoundi et al., 2016).

A *Leishmania* possui ciclo de vida heteroxênico, que se caracteriza pela alternância entre hospedeiros vertebrados (humanos, cães e animais silvestres) e hospedeiros invertebrados, insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. A transmissão da *Leishmania* aos vertebrados ocorre através da picada destes insetos, genericamente denominados flebotomíneos (Rangel e Lainson, 2003).

Em seu ciclo evolutivo a *Leishmania* assume duas formas morfológicas principais: amastigota e promastigota. As amastigotas são intracelulares obrigatórias, encontradas nas células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, possuem formato arredondado, sem flagelo livre e medem cerca de 3 a 5µm de comprimento. Já as promastigotas são extracelulares, encontradas no trato digestivo dos flebotomíneos, são formas alongadas, móveis, apresentam flagelo livre e medem cerca de 15 a 20µm de comprimento (Lainson et al., 1986; Domínguez et al., 2003).

A infecção se inicia quando a fêmea do flebotomíneo, ao exercer o repasto sanguíneo, inocula promastigotas infectantes na pele do hospedeiro. Estas são rapidamente fagocitadas por diversas células, incluindo macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Mcconville e Naderer, 2011). Após a fagocitose, os parasitos se diferenciam em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo, onde se replicam, até o rompimento da célula, com liberação de novas amastigotas capazes de infectar outras células (Beattie e Kaye, 2011; Franco et al., 2012). O ciclo se completa quando a fêmea do flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado ingere macrófagos contendo amastigotas (Van Assche et al., 2011).

A grande diversidade de espécies de *Leishmania* patogênicas aos seres humanos, associada à composição genética, imunológica e à saúde geral do hospedeiro, são responsáveis pelas diferentes manifestações clínicas das leishmanioses, sendo estas divididas clinicamente em leishmaniose tegumentar (LT) e LV (Alexander et al., 1999; Gurung e Kanneganti, 2015).

A LT inclui duas formas clínicas: cutânea e mucosa (Brasil, 2013). A forma cutânea é a mais comum, manifesta-se através de lesão cutânea em localização única ou múltipla. Já na forma mucosa ocorrem lesões localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores, possivelmente devido à disseminação hematogênica do parasito da pele (Brasil, 2013). A LV é uma doença sistêmica cujos principais órgãos acometidos são: baço, fígado, linfonodos e medula óssea. É a forma mais grave das leishmanioses, sendo fatal em quase todos os casos não tratados (World Health Organization – WHO, 2015).

As leishmanioses estão presente nos cinco continentes, sendo endêmicas em 98 países, com aproximadamente 350 milhões de pessoas expostas à infecção. Estima-se que a prevalência global da doença seja de 12 milhões de casos e que ocorram cerca de 1 milhão de novos casos de LT e 300 mil novos casos de LV anualmente (WHO, 2016a; Alvar et al., 2012).

Nas duas últimas décadas, vêm ocorrendo processos de expansão e urbanização das leishmanioses devido a diversos fatores, tais como deslocamento populacional, alterações climáticas, ambientais e más condições socioeconômicas (Desjeux, 2001; Harhay et al., 2011; WHO, 2015). O crescimento rápido das grandes cidades, com elevada densidade populacional e população suscetível, contribuiu para a rápida expansão das leishmanioses no ambiente urbano. O aquecimento global e o processo de degradação dos solos alteraram a ecologia dos vetores e reservatórios, permitindo a transmissão do parasito em áreas anteriormente não endêmicas para a doença (Desjeux, 2001 e 2004).

Essa mudança no perfil epidemiológico, associada à propagação da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) para as zonas rurais, favoreceu o estabelecimento das leishmanioses como importante doença associada ao HIV (Alvar et al., 1997, 2008; Lindoso et al., 2014). A coinfeção *Leishmania*/HIV desempenha papel importante na expansão das leishmanioses, estando presente em 35 países, sendo a LV a terceira infecção mais associada ao HIV em várias partes do mundo (Sakkas et al., 2016; WHO, 2016b).

A pobreza também está diretamente relacionada ao aumento do risco à infecção pela *Leishmania* e agravamento do quadro clínico do paciente. Condições precárias de habitação e saneamento básico, estão relacionadas ao aumento da reprodução dos flebotomíneos, enquanto a desnutrição e a anemia, estão diretamente associadas à evolução para as formas clínicas mais severas da doença (Alvar et al., 2006; WHO, 2010). A relação entre as leishmanioses e pobreza é ainda mais complexa, pois a doença também leva ao empobrecimento das famílias afetadas. Em vários países, principalmente os com menor cobertura social, além dos gastos com custos médicos diretos, por exemplo com diagnóstico e

medicamentos, as famílias também arcam com custos indiretos, por exemplo com transporte ou perda de dias de trabalho (Chappuis et al., 2007; WHO, 2010). Adhikari (2009), avaliando as consequências econômicas da LV em famílias nepalesas acometidas pela doença, relataram que estas gastaram, em média, 17% do seu rendimento anual com despesas relacionadas a LV. Em decorrência disto, 20% das famílias estudadas, que não eram consideradas pobres, passaram a ser.

Sabe-se que aproximadamente 80% dos pacientes acometidos pela LV vivem com menos de 2 dólares por dia, não possuindo recursos para arcar com custo do diagnóstico e tratamento da doença (Thornton et al., 2010). Neste contexto, o diagnóstico precoce e o tratamento imediato dos pacientes são essenciais para reduzir transmissão, morbidade, mortalidade e custos acarretados pela doença (Alvar et al., 2006). Em relação à disponibilização de testes diagnósticos e medicamentos para as leishmanioses, o Brasil se destaca, visto que, estas tecnologias estão disponíveis aos pacientes via Sistema Único de Saúde (SUS).

Para superar o impacto das leishmanioses, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda diagnóstico precoce e tratamento eficaz, controle dos vetores e hospedeiros reservatórios, bem como, educação em saúde (WHO, 2010). Estas estratégias são utilizadas de formas variadas, em função dos diferentes padrões epidemiológicos, observados para as leishmanioses nas diferentes áreas endêmicas (Mondal et al., 2009; Romero e Boelaert, 2010).

3.2 A leishmaniose visceral

A LV, também conhecida como calazar, é causada por espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo donovani, sendo a *Leishmania (Leishmania) donovani* Ross, 1903 presente no leste da África e sul da Ásia e a *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908, a espécie que ocorre no norte da África e nas Américas (Chappuis et al., 2007). Durante muitos anos, diferenciou-se a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 como responsável pela forma visceral das leishmanioses nas Américas, porém, estudos mostraram que esta espécie é geneticamente indistinguível da *L. infantum* (Maurício et al., 1999; Dantas-Torres, 2006).

No Brasil, a *L. infantum* é transmitida naturalmente pela picada das espécies *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia cruzi* Mangabeira, 1938 (Deane e Deane, 1954; Brasil, 2014a). Outras formas de transmissão identificadas são: transfusional (Singh et al., 1996; Luz et al., 1997; Otero et al., 2000; Dey e Singh, 2006; Mestra et al., 2011), por transplantes de órgãos (Basset et al., 2005; Antinori et al., 2008; Zinchuk e

Nadruga, 2013; Clemente et al., 2014), congênita (Low e Cooke, 1926; Meinecke et al., 1999; Haque *et al.*, 2010) e sexual (Symmers, 1960; Oliveira et al., 2015).

Além de infectar o homem, a *L. infantum* já foi identificada em outros mamíferos, como raposas, marsupiais, roedores e cães, sendo este último o principal reservatório da LV no país (Brasil, 2014a). Por ser altamente suscetível à infecção e apresentar elevado parasitismo cutâneo, a infecção do vetor por meio do hospedeiro canino é facilitada e tem precedido a ocorrência de casos humanos (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006).

No Brasil, o tratamento dos cães era proibido, sendo recomendada a eutanásia de todos os animais sororeagentes e/ou com diagnóstico parasitológico positivo (Brasil, 2014a). No entanto, por meio da Nota Técnica Conjunta n° 001/2016, recentemente assinada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Ministério da Saúde (MS), o registro do produto Milteforan® (Virbac Saúde Animal) indicado para o tratamento de cães foi autorizado. Segundo esta Nota Técnica, o tratamento de cães com LV não se configura como uma medida de saúde pública para controle da doença, trata-se única e exclusivamente de uma escolha do proprietário do animal, de caráter individual (Brasil, 2016a).

A incidência global da LV humana varia entre 0,2 a 0,4 milhões de novos casos por ano, com taxas de letalidade entre 10 a 20%, ou seja, 20 a 40.000 mortes por ano. A doença está presente em 65 países, com 90% dos casos concentrados no Brasil, Somália, Índia, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul (Alvar et al., 2012; WHO, 2016a). Entre 2001 e 2014, 48.720 casos de LV foram notificados nas Américas, sendo 96,4% concentrados no Brasil (Pan American Health Organization - PAHO, 2016).

Foram notificados no Brasil, entre 2007 e 2015, 33.488 casos de LV com 2.130 (6,4%) óbitos por LV neste período. O exame de HIV foi realizado em 24.273 pacientes e a coinfeção LV/HIV estava presente em 9,2% (2.231/24.273) dos pacientes (Brasil, 2017)

A interação da *Leishmania* com o HIV dificulta o controle da doença, pois ambas infecções exercem efeito prejudicial sinérgico na resposta imune celular do paciente, direcionando para uma resposta celular do tipo II. Desta forma, a infecção por HIV, reduz a resposta terapêutica (Cota et al., 2013), aumenta a probabilidade de recidiva (Casado et al., 2001; Cota et al., 2011) e dificulta o diagnóstico da LV (Cota et al., 2012).

O primeiro caso de coinfeção *Leishmania*/HIV foi notificado em 1985, na França, sendo o HIV responsável pelo ressurgimento da LV no sul da Europa. No início do século XXI, quase 2.000 casos já haviam sido notificados na Espanha, Itália, França e Portugal (Desjeux e Alvar, 2003). No entanto, este número tem diminuído na Europa, principalmente

devido à terapia anti-retroviral. Já na África Oriental, onde o acesso a este tratamento é limitado, a prevalência tem aumentado progressivamente. No norte da Etiópia, a taxa de infecção pelo HIV entre pacientes com LV subiu de 19% entre 1998 e 1999 para 34% entre 2006 e 2007 (WHO, 2010).

No Brasil, o primeiro estudo avaliando a casuística da coinfeção *Leishmania*/HIV foi realizado em 2003, sendo descritos 91 pacientes, dos quais 37% apresentavam a forma visceral (Rabello et al., 2003). Em 2001, 0,7% dos pacientes com LV notificados ao MS, eram coinfectados, já em 2012 este percentual aumentou para 8,5%, provavelmente devido à sobreposição das áreas endêmicas destas infecções (Lindoso et al., 2014).

De acordo com Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do MS as ações para redução da transmissão e da morbimortalidade por LV no Brasil estão baseadas na redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios caninos, diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos e atividades de educação em saúde (Brasil, 2014a).

Apesar dos esforços empreendidos pelo MS e pela comunidade científica, as ações direcionadas para redução da transmissão não têm apresentado o efeito desejado. A LV é uma das doenças que vem apresentado maior fracasso em termos de controle da transmissão no país (Barreto et al., 2011; Werneck, 2016). De acordo com Zuben e Donalísio (2016), além da insuficiência de insumos, recursos humanos e financeiros, que contribuem para a descontinuidade das ações de controle, há uma crescente resistência social às equipes do PVCLV principalmente em relação à eutanásia canina, que até então era amplamente realizada. Outras dificuldades, como a baixa prioridade dada à LV frente a outras doenças, como a dengue; baixo desempenho dos testes diagnósticos e os problemas crônicos de saneamento básico demonstram a incapacidade do programa em atingir seus objetivos.

Devido à baixa efetividade das medidas de controle, que priorizam a redução da incidência, o PVCLV vem dando ênfase à redução da letalidade, por ser mais viável (Werneck, 2016). A efetividade desta medida de controle depende da capacidade do sistema de saúde de acolher e detectar precocemente a doença em cerca de 60 mil casos suspeitos, anualmente (Romero, 2016).

Atualmente, o MS recomenda que casos suspeitos de LV sejam confirmados utilizando diagnóstico parasitológico direto, cultura de aspirado de medula óssea, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste imunocromatográfico e ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês “*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*”) ou ainda, por método molecular, sendo o mais comum, a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês

“*Polymerase Chain Reaction*”). No entanto, o diagnóstico disponibilizado para os pacientes pelo SUS se restringe ao diagnóstico parasitológico, RIFI e teste imunocromatográfico (Brasil, 2014a).

3.2.1 Diagnóstico

3.2.1.1 Diagnóstico clínico

A LV apresenta amplo espectro clínico, que inclui febre, fraqueza, perda de peso, palidez, hepatomegalia e esplenomegalia. Devido à inespecificidade dos sinais e sintomas, o diagnóstico pode ser confundido com o de outras doenças, como malária, tuberculose, esquistossomose, entre outras (Sundar e Rai, 2002).

Do ponto de vista clínico, a doença pode ser dividida em forma assintomática, oligossintomática e sintomática. A infecção assintomática, ocorre em indivíduos saudáveis provenientes de área endêmica, que apresentam resultado positivo em exames imunológicos. Neste caso, o tratamento da LV não é recomendado (Brasil, 2014a). No Brasil, estima-se que o número de pacientes assintomáticos seja cerca de 8 a 18 vezes maior que o número de sintomáticos (Badaro et al., 1986; Evans et al., 1992). No entanto, ainda não está clara a importância destes indivíduos na infecção do flebotômico, ou mesmo se eles adquirem imunidade persistente ou podem desenvolver LV posteriormente (Ostyn et al., 2011; Singh et al., 2014).

Após período de incubação que varia em média de dois a seis meses, os pacientes que desenvolvem a forma sintomática da doença apresentam quadro clínico discreto, com febre baixa, palidez cutâneo-mucosa leve, diarreia, tosse e pequena hepatoesplenomegalia. Através de exames laboratoriais é possível verificar quadro de anemia discreta e hipergamaglobulinemia. Estes pacientes podem evoluir para cura, característica da forma oligossintomática, ou desenvolver manifestações clínicas mais severas (Brasil, 2014a).

A evolução do quadro clínico é caracterizada por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Os exames complementares evidenciam anemia, trombocitopenia, leucopenia e inversão da relação albumina/globulina, assim como elevação dos níveis de bilirrubinas, ureia e creatinina. Caso o diagnóstico e tratamento não sejam realizados, há comprometimento mais intenso do estado geral, podendo levar o paciente a óbito (Chappuis et al., 2007; Brasil, 2014a).

Em geral, pacientes coinfectados com HIV apresentam sinais e sintomas típicos de LV, mas manifestações atípicas podem ocorrer, principalmente em pacientes altamente

imunossuprimidos. Neste grupo, casos com infecção por *L. infantum* em locais atípicos, como trato digestivo (Laguna et al., 1994; Alonso et al., 1997), trato respiratório (Rosenthal et al., 1991), cavidade bucal (Grasa et al., 2000; Diro et al., 2015) e pele (Ara et al., 1998; Bosch et al., 2002; Orsini et al., 2002) já foram relatados.

A suspeita de LV deve sempre ser levantada quando o paciente apresentar febre e esplenomegalia, associada ou não à hepatomegalia. A confirmação laboratorial da presença de anemia, leucopenia, trombocitopenia ou hipergamaglobulinemia reforça ainda mais a suspeita clínica, mas não é confirmatória (Brasil, 2014a). O diagnóstico específico de LV é necessário e consiste basicamente em três grupos de exames: parasitológicos, imunológicos e moleculares.

3.2.1.2 Diagnóstico parasitológico

Os exames parasitológicos são considerados padrão de referência no diagnóstico da LV e baseiam-se na demonstração direta do parasito em tecidos ou seu isolamento em cultura (WHO, 2010). Estas técnicas são realizadas a partir de aspirados do baço, medula óssea e linfonodos ou ainda biópsia de fígado e em geral, apresentam elevada especificidade, no entanto, a sensibilidade varia de acordo com o tecido analisado (Sundar e Rai, 2002).

No Brasil recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea para a realização do exame direto e isolamento da *Leishmania* em cultivo, embora a técnica seja invasiva e necessite de profissionais especializados e infraestrutura para sua realização (Brasil, 2014a).

No exame parasitológico direto, as formas amastigotas do parasito são visualizadas após a fixação do tecido na lâmina e coloração com Giemsa ou Leishman (Sundar e Rai, 2002). A demonstração direta do parasito no aspirado esplênico apresenta elevada sensibilidade, variando de 93 a 99%, no entanto, está associada a hemorragias fatais, em cerca de 0,1% dos pacientes. Em termos de segurança, o aspirado de medula óssea ou linfonodos é o mais indicado, mas apresenta menor sensibilidade, variando de 53 a 86% e 53 a 65%, respectivamente (WHO, 2010; Sakkas et al., 2016). Além do tipo de tecido utilizado, a intensidade da infecção e a experiência do microscopista também influenciam diretamente a sensibilidade do diagnóstico (Siddig et al., 1988; Reis et al., 2006).

A técnica de isolamento em cultura aumenta a sensibilidade do diagnóstico que pode atingir até 80%, a partir de aspirados esplênicos ou de medula óssea. No entanto, sua utilização é restrita devido ao período de uma a quatro semanas necessário para confirmação do resultado (Sundar e Rai, 2002; Sakkas et al., 2016).

Avanços nos métodos de cultura, permitiram aumentar a sensibilidade da técnica. O método de cultura em microcapilar (MMC), por exemplo, apresentou sensibilidade de 100% utilizando aspirado de medula óssea e de 77,8 a 100% utilizando sangue periférico (variação em função da densidade parasitária na amostra) (Allahverdiyev et al., 2005). No MMC, resultados estão disponíveis em menor período de tempo (2 a 7 dias), quando comparado ao método tradicional (Srividya et al., 2012). Técnicas que utilizam diluição seriada de frações do sangue periférico, além de serem menos invasivas, também têm apresentado bom desempenho. Sensibilidade variando de 84 a 85,3% foram obtidas a partir da diluição de creme leucocitário (células mononucleares e plaquetas) e de 91,5%, para células mononucleares (Hide *et al.*, 2007; Maurya et al., 2010)

Em pacientes coinfectados com HIV, a demonstração da *Leishmania* em aspirado de medula óssea ou outras amostras biológicas através de exame direto ou cultura, é a técnica de diagnóstico mais confiável, devido à grande quantidade de parasitos circulantes (Cota et al., 2012). A sensibilidade do aspirado de medula óssea, através do exame parasitológico direto em coinfectados varia de 67 a 94% (Montalban et al., 1990; Altés et al., 1991; Dereure et al., 1995; Pintado et al., 2001) e da cultura, varia de 50 a 100% (Alvar et al., 1997; Pintado e López-Vélez, 2001).

O custo direto de um aspirado de medula óssea realizado no ambulatório do Centro de Referência em Leishmanioses (CRL) do CPqRR/Fiocruz foi estimado em US\$ 27,10 (R\$ 68,02). Já o valor do procedimento realizado em hospital é de US\$ 159,40 (R\$ 400,09) (ano base 2014). No Brasil, a maioria dos aspirados de medula óssea realizados pelo SUS são feitos em hospitais (Machado de Assis et al., 2016a).

3.2.1.3 Diagnóstico imunológico

Devido à expressiva resposta imune humoral que caracteriza a LV, métodos imunológicos, empregando diferentes antígenos são atualmente pesquisados e utilizados para o diagnóstico. No Brasil, todos os testes registrados na ANVISA são aplicados ao diagnóstico sorológico da doença (Brasil, 2016b). Carvalho et al. (2015), avaliando o desenvolvimento tecnológico no campo das leishmanioses, através da análise de patentes publicadas entre 2008 e 2012, identificaram que, dentre os 28 documentos resgatados que protegiam soluções técnicas para o diagnóstico das leishmanioses, a grande maioria (valor numérico não apresentado) estava relacionada a antígenos ou proteínas de *Leishmania* para serem utilizadas em imunoenaios.

As principais técnicas utilizadas para o diagnóstico imunológico da LV são a RIFI, o teste de aglutinação direta (DAT, do inglês “*direct agglutination test*”), o teste imunocromatográfico rápido e o ELISA. Em geral, estas técnicas apresentam elevada sensibilidade, mas a especificidade varia de acordo com o tipo de antígeno utilizado. Por serem técnicas de detecção de anticorpo, apresentam limitação comum, que é a não distinção entre infecção ativa ou passada. Essa limitação dificulta o diagnóstico da doença, pois, em áreas endêmicas para LV, indivíduos saudáveis portadores de infecção assintomática ou mesmo aqueles já tratados para a doença, podem apresentar níveis detectáveis de anticorpos.

Ao contrário da exacerbada resposta humoral observada em pacientes imunocompetentes, em indivíduos coinfectados com HIV ocorre baixa produção de anticorpos, devido à ação imunossupressora do vírus. Desta forma, nestes pacientes, a pesquisa de anticorpos não deve ser utilizada como critério isolado para exclusão da LV. Em casos suspeitos que apresentem resultados negativos, técnicas adicionais, baseadas em métodos moleculares ou parasitológicos, devem ser utilizadas (Cota et al., 2012; Savoia, 2015; Sakkas et al., 2016).

3.2.1.3.1 Reação de imunofluorescência indireta

A RIFI tem sido utilizada no diagnóstico da LV desde 1964 (Duxbury e Sadun, 1964). No Brasil, ainda é a principal técnica de diagnóstico imunológico utilizada no SUS. Entre 2007 e 2015, 86% dos casos de LV no país foram confirmados por critérios laboratoriais, destes, 49% receberam o diagnóstico pela RIFI (Brasil, 2017).

Esta técnica consiste na fixação do extrato bruto de promastigotas de *Leishmania* em lâmina e posterior diluição do soro do paciente. Na presença de anticorpos anti-*Leishmania*, no soro do indivíduo infectado, ocorrerá a formação do imunocomplexo, que será evidenciado por anti-anticorpos marcados com fluoresceína. Para visualização da reação é utilizado o microscópio de fluorescência, sendo os resultados expressos pela última diluição do soro na qual foram vistos parasitos fluorescentes. Reações que apresentam padrão de fluorescência verde na periferia da promastigota são consideradas positivas, já na presença de padrão de fluorescência vermelho, a reação é negativa.

Em estudos de revisão sistemática com metanálise, a RIFI apresentou sensibilidade de 88% e especificidade de 90% em pacientes não portadores de HIV (Maia et al., 2012) e de 51% e 93%, respectivamente, em pacientes portadores de HIV (Cota et al., 2012).

No Brasil, o kit de RIFI disponibilizado para o SUS é o IFI Leishmaniose Humana – Bio-Manguinhos, produzido pela Fiocruz. O manual de instrução do kit considera reagente,

amostra que a partir da diluição 1:40 apresentam fluorescência. No entanto, de acordo com instruções do manual do MS (Brasil, 2014a), são consideradas positivas reações com fluorescência igual ou superior a 1:80 e reações com fluorescência na diluição 1:40 são consideradas indeterminadas, sendo recomendada a repetição da reação após 30 dias. Além da falta de concordância entre as informações oficiais, o arbitrário tempo de espera para novo diagnóstico, expõe o paciente ao risco de desenvolvimento de doença grave no período de 30 dias (PCPP CPqRR/Fiocruz, 2016).

Foram encontrados quatro estudos realizados no Brasil de avaliação de desempenho da IFI Leishmaniose Humana, em pacientes não portadores de HIV: Machado de Assis et al. (2008, 2012); Pedras et al. (2008); Peruhype-Magalhães et al. (2012). Nestes trabalhos, este teste apresentou sensibilidade e especificidade variando de 88 a 92% e 80 a 83,8%, respectivamente. Para pacientes infectados pelo HIV, foi encontrado apenas um estudo, em que este teste apresentou sensibilidade de 61% e especificidade de 87,1% (Cota et al., 2013). Importante destacar que, diferente dos outros testes comercialmente disponíveis no Brasil, o manual de instrução deste kit não apresenta seus valores de desempenho.

Outro kit comercial de RIFI é o *Leishmania* IFA IgG, produzido pela empresa espanhola Vircell S. L. Informações referentes à sua validação, não foram encontradas na literatura científica, no entanto, dados de desempenho estão presentes no manual de instrução do teste. De acordo com o fabricante, 141 amostras de soro/plasma (sem especificação de quantos casos e controles) foram testadas pelo kit *Leishmania* IFA IgG e comparadas com outro kit de RIFI de outra empresa. Nesta avaliação, este kit apresentou sensibilidade e especificidade de 100%. É também informado que três amostras positivas para *Toxoplasma gondii* foram avaliadas e o teste não apresentou reação cruzada.

De acordo com Machado de Assis et al. (2016a) o custo direto da RIFI produzida por Bio-Manguinhos, e realizada no CPqRR/Fiocruz, é estimado em US\$ 11,39 (R\$ 28,59) (ano base: 2014). No geral, o que se observa é que o custo da RIFI não é compensado pelo desempenho do teste.

Embora os reagentes utilizados na RIFI sejam acessíveis, esta técnica requer técnicos treinados e infraestrutura laboratorial, como microscópio de fluorescência, pipetas e estufa, condições que limitam o acesso e retardam o diagnóstico dos pacientes. Outro fator que restringe o uso da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com diversas doenças, principalmente com *Trypanosoma cruzi*, devido à proximidade filogenética existente entre os dois parasitos (Elmahallawy et al., 2014; Sakkas et al., 2016).

3.2.1.3.2 Ensaio imunoenzimático

O ELISA tem sido uma das mais importantes ferramentas utilizadas no diagnóstico de doenças infecciosas, sendo empregado para o diagnóstico da LV desde 1983 (HO et al., 1983). A ampla utilização desta técnica ocorre principalmente por possibilitar o emprego de diferentes tipos de antígeno e apresentar elevado rendimento, podendo diagnosticar até 94 pacientes em apenas uma placa. Entretanto, a técnica requer infraestrutura laboratorial, como espectrofotômetro, pipetas e estufas (Elmahallawy et al., 2014).

Esta técnica é realizada principalmente pela forma indireta, que utiliza antígenos previamente aderidos ao suporte sólido de poliestireno (placa de ELISA), para detecção do anticorpo presente no soro do paciente infectado. O conjugado, anticorpo anti-IgG humana ligado à peroxidase, é adicionado à reação e se liga ao imunocomplexo já formado. A reação é evidenciada pela adição do substrato, peróxido de hidrogênio e substância cromôgena, que, na presença da enzima, altera a cor da reação. O critério de positividade depende do ponto de corte, que é determinado para cada teste.

Um dos antígenos mais empregados no ELISA para o diagnóstico da LV, é o antígeno solúvel bruto. Sua produção é realizada através de cultura das formas promastigotas de *Leishmania*, rompidas por ultrassom ou ciclos de congelamento e descongelamento, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno. Diversos trabalhos utilizando antígeno solúvel bruto de *L. infantum* em ELISA estão presentes na literatura científica, apresentando sensibilidade variando de 80 a 100% e especificidade de 71 a 98,3% (Garcez et al., 1996; Braz et al., 2002; Carvalho et al., 2003; Mikaeili et al., 2007; Machado de Assis et al., 2008; Kiliç et al., 2008; Mohapatra et al., 2009; Pedras et al., 2008; Fukutani et al., 2014).

A baixa especificidade, causada por reatividade cruzada é comum aos métodos que utilizam antígenos não-purificados, como o antígeno solúvel bruto de *Leishmania*. De forma alternativa a este problema, proteínas recombinantes têm sido identificadas e avaliadas como potenciais antígenos a serem empregados no ELISA para detecção de anticorpos (Maalej et al., 2003). Dentre estes, o antígeno recombinante K39 (rK39), descrito pela primeira vez em 1993, tem sido o mais amplamente avaliado. Trata-se de uma sequência de 39 aminoácidos isolada de *L. infantum*, clonada e expressa em *Escherichia coli* (Burns et al., 1993).

Em um primeiro estudo avaliando o desempenho desse antígeno em ELISA, sensibilidade de 98% no Brasil e 100% no Sudão foram observadas (Burns et al., 1993). Diante destes resultados promissores, diversos autores têm avaliado o desempenho da detecção de anticorpos anti-rK39 por ELISA, com sensibilidade variando de 93,3 a 100% e especificidade de 82,5 a 100% (Badaró et al., 1996; Braz et al., 2002; Maalej et al., 2003;

Kurkjian et al., 2005; Machado de Assis et al., 2008, 2012; Pedras et al., 2008; Mohapatra et al., 2009; Vaish et al., 2012a; Abass et al., 2013, 2015).

Assim como rK39, outras proteínas recombinantes, tais como: rK9, rK26, rK28, rKLO8, entre outras, têm sido avaliadas por ELISA. A sensibilidade e especificidade do ELISA utilizando estes antígenos varia de 78 a 90,3% e 82,9 a 84% para rK9; de 38 a 90,3% e 80 a 97,2% para rK26; de 96,8 a 99,6% e 94,2 a 100% para rK28; de 96,2 a 100% e 96,1 e 100% para rKLO8, respectivamente (Mohapatra et al., 2009; Patabhi *et al.*, 2010; Vaish et al., 2012a; Abbas et al., 2013, 2015).

Uma revisão sistemática avaliando o ELISA utilizando antígeno solúvel bruto e o ELISA rK39 estimou a sensibilidade e especificidade dos ensaios em 87% e 77%; 92% e 81%, respectivamente (Maia et al., 2012). Em outra revisão sistemática, avaliando o desempenho do ELISA em pacientes coinfectados pelo HIV, sem distinção entre os tipos de antígenos utilizados, foram estimadas sensibilidade de 66% e especificidade de 90% (Cota et al., 2012).

A pesquisa de anticorpos por ELISA é principalmente realizada a partir de amostras de soro dos pacientes, no entanto, a utilização de outras amostras biológicas, tais como urina e saliva também vem sendo avaliada. O ELISA em urina, para detecção de anticorpos, apresentou sensibilidade e especificidade de 93,5% e 89,3%, utilizando antígeno solúvel bruto (Islam et al., 2002); 94% e 99,6% utilizando proteína recombinante rKRP42 (Islam et al., 2008) e 60% e 91,2% utilizando ELISA de captura para IgG, respectivamente (Sarkari *et al.*, 2008). O desempenho da técnica utilizando rK39 para detecção de anticorpo em saliva foi avaliado por Vaish et al. (2012b) apresentando sensibilidade de 83,3% e especificidade variando de 88,6 a 100% (em pacientes de áreas endêmicas, não endêmicas e com outras doenças). Estes resultados sugerem que a utilização de amostras de fácil obtenção, tal como saliva e urina, pode ser uma alternativa prática e eficiente para aumentar o acesso ao diagnóstico da LV.

No Brasil, existem três kits de ELISA registrados na ANVISA e disponíveis comercialmente: *Leishmania* ELISA IgG+IgM (Viracell S. L.); Ridascreen[®] *Leishmania* Ab (R-Biopharm AG) e NovaLisa[™] *Leishmania infantum* IgG (Novatec Immunodiagnostica GMBH) (Brasil, 2016b).

Para o *Leishmania* ELISA IgG+IgM, foram encontrados dois estudos de avaliação de desempenho na literatura científica. Kiliç et al. (2008), em estudo realizado na Turquia, utilizando como padrão de referência o exame parasitológico direto e cultura, incluíram 59 pacientes (24 casos e 35 controles) com suspeita clínica de LV, e observaram 95,8% (23/24)

de sensibilidade e 82,9% (29/35) de especificidade para este kit. Mandal et al. (2008) em estudo prospectivo com 94 pacientes que apresentavam suspeita clínica de LV na Índia, identificaram 16 pacientes positivos com base no exame parasitológico de medula óssea ou DAT, teste rápido e ELISA positivos e 40 controles. Neste trabalho, o *Leishmania* ELISA IgG+IgM apresentou 100% de sensibilidade e 87% de especificidade.

No manual de instrução, o fabricante do *Leishmania* ELISA IgG+IgM, descreve estudo utilizando amostras de soro/plasma de 138 pacientes (sem especificação de quantos casos e controles foram testadas) e compara com um kit de imunofluorescência, obtendo sensibilidade e especificidade de 97% e 99%, respectivamente. Foi avaliada também a ocorrência de reação cruzada com três amostras positivas para *Toxoplasma gondii*, sendo obtidos resultados negativos.

Para o Ridascreen[®] *Leishmania* Ab, foram encontrados dois estudos que apresentam valores de desempenho. Harizanov et al. (2013), na Bulgária utilizaram o Ridascreen[®] *Leishmania* Ab para avaliar 32 pacientes com confirmação de LV através do exame parasitológico direto, observaram sensibilidade de 87,5% (28/32). Cakan et al. (2010), investigaram 59 pacientes com suspeita de LV na Turquia. Em comparação com a PCR, o Ridascreen[®] *Leishmania* Ab foi positivo em 7/11 (63,7%) e negativo em 43/48 (89,6%).

No manual de instrução, o fabricante do Ridascreen[®] *Leishmania* Ab descreve que este teste apresenta 87,5% de sensibilidade e 88,7% de especificidade, quando comparado a outros dois ELISAs comerciais. Outras informações adicionais não foram apresentadas.

Em relação ao NovaLisa[™] *Leishmania infantum* IgG, não foi encontrado qualquer estudo de avaliação de desempenho na literatura científica. A única informação de desempenho deste teste está presente no manual de instrução, em que o fabricante informa apenas o valor de sensibilidade e especificidade, sendo de 91% e 85%, respectivamente. Nenhuma informação de como estes resultados foram obtidos são fornecidas, nem mesmo o teste utilizado como padrão de referência ou o número total de pacientes incluídos na análise.

Recentemente, a empresa norte americana InBios International passou a comercializar o Kalazar Detect[™] ELISA, tendo como diferencial a utilização da proteína rK39 como antígeno. Este kit ainda não possui registro na ANVISA e não é comercializado no Brasil (Brasil, 2016b). De acordo com o fabricante, este teste deve ser utilizado apenas em pesquisa e não para o diagnóstico clínico (InBios, 2016). Informações referentes à validação deste kit não foram encontradas na literatura científica. No entanto, de acordo com o manual de instrução, amostras de soro de 314 pacientes, 25 casos (13 sudaneses e 12 brasileiros) e 289

controles de região não endêmica, foram testadas e comparadas com exame parasitológico direto, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 99%.

3.2.1.3.3 Teste de aglutinação direta

O DAT é um teste simples, que foi primeiramente descrito para o diagnóstico das leishmanioses por Allain e Kagan em 1975. Neste estudo, diferentes espécies de *Leishmania* foram avaliadas como antígeno, observando-se sensibilidade variando entre 61% a 96% (Allain & Kagan 1975). Posteriormente, El Harith et al. (1986), adicionou o corante azul brilhante de Coomassie na preparação do antígeno, a fim de facilitar a visualização da aglutinação. Um dos inconvenientes da técnica descrita até então era a instabilidade do antígeno líquido, desta forma, em 1995 Meredith et al. desenvolveram um processo de liofilização, que permitiu a manutenção do antígeno a 56°C por até 18 meses, obtendo 92% de sensibilidade e 99,7% de especificidade.

Para a execução do DAT, prepara-se uma sequência de diluição crescente do material biológico do paciente em micropalcos de fundo V, sendo posteriormente adicionado o antígeno. Após o período de incubação, que varia de 4 a 18 horas dependendo do kit, a presença ou não da aglutinação é visível a olho nu. Na ausência de anticorpos anti-*Leishmania*, o antígeno se acumula de modo a formar uma mancha azul escura no fundo da placa e, na presença de anticorpos específicos, ocorre à aglutinação. O título será determinado como sendo a última diluição onde houve aglutinação dos parasitos.

A OMS incentiva o uso do DAT em programas de vigilância e controle da LV e recomenda sua disponibilização para hospitais e laboratórios de referências (WHO, 2010). Esta técnica tem sido validada em diversas áreas endêmicas, sendo atualmente utilizada como diagnóstico de primeira linha em centros de referência no Sudão (Chappuis et al., 2003; Abdallah et al., 2004). No entanto, no Brasil não existe nenhum kit de DAT registrado na ANVISA e disponível comercialmente (Brasil, 2016b).

O DAT produzido com promastigotas de *L. donovani* vem sendo comercializado por duas instituições europeias, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine (Antuérpia, Bélgica), que produz o DAT-ITM e The Royal Tropical Institute (Amsterdã, Holanda), que produz o DAT-KIT. O custo por reação quantitativa, estimado para o DAT-ITM, foi de R\$ 16,00 (Diane Jacquet, informação pessoal, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, 2017) e do DAT-KIT, foi estimado em R\$ 11,40 (The Royal Tropical Institute, 2015).

Estudo de validação do DAT-ITM, realizado por Boelaert et al. (1999a), apresentou sensibilidade de 95,9% e especificidade de 99,4%. Posteriormente, em estudo multicêntrico

realizado em três regiões endêmicas para LV (Sudão, Nepal e Quênia), o DAT-ITM apresentou baixa reprodutibilidade, principalmente devido à instabilidade do antígeno líquido, ocasionada pela agitação durante o transporte e variação de temperatura entre as regiões (Boelaert et al., 1999b). Jacquet et al. (2006), realizaram avaliação comparativa do DAT-ITM utilizando antígeno líquido e antígeno liofilizado, e demonstraram que este último se manteve ativo mesmo depois de armazenado a 45°C por até 24 meses. O desempenho do DAT-ITM com antígeno liofilizado foi posteriormente avaliado em amostras de soro e sangue em papel de filtro, sendo obtidas sensibilidade e especificidade de 100% para soro e 96% e 100%, respectivamente para papel de filtro (Hasnain et al., 2014).

O DAT-KIT foi avaliado em laboratórios de seis países endêmicos para LV (Sudão, Quênia, Brasil, Índia, Nepal e Bangladesh). Apesar dos testes terem sido realizados nas mesmas condições (mesmos soros, lotes dos kits, placa de fundo V e protocolo) nos diferentes laboratórios, a concordância entre os títulos foi de apenas 50%, apresentando sensibilidade de 76% e especificidade de 96%. Diante deste resultado, foram realizados treinamentos com todos os técnicos que executaram o procedimento, a fim de aumentar a concordância entre os laboratórios. Nesta segunda avaliação, a sensibilidade e especificidade do DAT-KIT foi estimada em 97% e 100%, respectivamente, obtendo 84% de concordância entre os laboratórios. Os autores destacam que a realização de treinamentos é capaz de reduzir a disparidade nos resultados e promover leituras mais padronizadas, melhorando a sensibilidade do método (Adams et al., 2012).

No Brasil, um protótipo de kit para diagnóstico da LV foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC), do CPqRR/Fiocruz, sendo nomeado DAT-LPC (Oliveira et al., 2009). O aperfeiçoamento do método foi realizado por Oliveira et al. (2011, 2013), com redução do tempo de leitura de 18 horas para 4 horas e substituição do diluente de amostra tóxico anteriormente utilizado. No estudo de validação, o desempenho do protótipo DAT-LPC foi comparado com o DAT-KIT, utilizando como método confirmatório o exame parasitológico direto. O DAT-LPC e o DAT-KIT apresentaram sensibilidade e especificidade de 99% e 98,2%; 99% e 100%, respectivamente. De acordo com os autores, o DAT é uma ferramenta importante para aumentar o acesso ao diagnóstico da LV no Brasil, o protótipo DAT-LPC mostrou alta precisão e estabilidade térmica e está pronto para uso, podendo ser transferido para a produção industrial (Oliveira et al., 2013).

O desenvolvimento do produto DAT-LPC relatado acima mostra que é possível a produção nacional de um teste de elevada acurácia, robusto e de simples operacionalidade, com a imensa vantagem de autonomia nacional de produção (Oliveira et al., 2013). Machado

de Assis et al. (2016b), avaliaram a aceitação do DAT-LPC utilizando questionários aplicados a profissionais de saúde do Laboratório Municipal da cidade de Ribeirão das Neves, Minas Gerais, Brasil. Nesta avaliação, todos os técnicos de laboratório entrevistados consideraram o teste confiável, de fácil realização e interpretação.

Em estudo de revisão sistemática com metanálise, o DAT apresentou sensibilidade de 94,2% e especificidade de 89,9%, para pacientes não portadores de HIV (Maia et al., 2012). Cota et al. (2012), também em estudo de revisão sistemática com metanálise, avaliaram o desempenho de diferentes técnicas diagnósticas em pacientes coinfectados com HIV. Foram estimadas sensibilidade e especificidade para o DAT em 81% e 90%, para o ELISA, sem distinção do antígeno utilizado, em 66% e 90% e para a RIFI em 51% e 93%, respectivamente. Estes resultados sugerem que o DAT é uma das técnicas sorológicas que apresentam melhor desempenho para diagnóstico de pacientes com HIV.

Boelaert et al. (1999c) avaliaram o custo-efetividade de quatro estratégias diagnóstico-terapêuticas para LV no Sudão: tratamento de todos os suspeitos clínicos (estratégia A); realização de exame parasitológico e tratamento de todos os pacientes com esfregaço positivo (estratégia B); realização do DAT e tratamento de todos os suspeitos com altos títulos e em suspeitos com resultado duvidoso, realização do exame parasitológico seguido do tratamento, caso necessário (estratégia C) e realização do DAT e tratamento de casos com altos títulos (estratégia D). O custo-efetividade das estratégias A, B, C e D foram respectivamente US\$ 1110, US\$ 448, US\$ 465 e US\$ 464 por morte evitada. Os autores ressaltam que em áreas endêmicas a estratégia D seria mais efetiva, por ser exclusivamente baseada em sorologia.

Recentemente, uma análise de custo-efetividade de seis opções diagnósticas disponíveis para LV, incluindo o DAT-LPC, RIFI, testes imunocromatográficos (Kalazar DetectTM e IT LEISH[®]), PCR e exame parasitológico direto, foi realizada no Brasil sob a perspectiva do SUS. Em um cenário hipotético favorável, assumindo a disponibilidade de acesso sem restrições aos seis testes diagnósticos incluídos na análise, o DAT-LPC apresentou o menor custo, estimado em US\$ 4,92 (R\$ 12,6) e maior eficácia (99%), mostrando-se dominante/custo-efetivo sobre os demais testes avaliados, inclusive a RIFI (Machado de Assis et al., 2016a).

A fácil realização e interpretação do DAT permite sua utilização em locais com infraestrutura laboratorial simples, necessitando basicamente de pipetas e placa de microtitulação. Esta técnica também pode ser realizada de forma qualitativa, o que aumenta o rendimento da reação, podendo diagnosticar até 46 testes em uma única placa (Oliveira et al.,

2013). Levando-se em consideração as vantagens operacionais, de desempenho e custo-efetividade relatadas na literatura, diversos autores recomendam a substituição do DAT em relação à RIFI como técnica sorológica de rotina para o diagnóstico da LV no Brasil (Pedras et al., 2008; Cota et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Machado de Assis et al., 2016a). Desta forma, a inclusão do DAT-LPC em estudos de avaliação de desempenho de testes diagnósticos para LV, é recomendada no Brasil.

3.2.1.3.4 Testes imunocromatográficos

O teste imunocromatográfico, também conhecido como teste rápido, representa uma tecnologia inovadora, que devido à simplicidade para realização, pode ser utilizado em todos os níveis dos serviços de saúde, fornecendo resultados em até 30 minutos (WHO, 2008). Nesta técnica, a reação antígeno-anticorpo é realizada em uma fase sólida, para isso um material de suporte é impregnado com reagentes secos, que são ativados pela aplicação da amostra biológica e da solução tampão.

Diferentes plataformas podem ser utilizadas, tais como imunocromatografia de fluxo lateral e a imunocromatografia de duplo percurso. Na imunocromatografia de fluxo lateral, o material biológico e o conjugado de detecção de anticorpo migram na mesma membrana de nitrocelulose e chegam juntos à área da linha de teste. Já na imunocromatografia de duplo percurso, o material biológico e o conjugado são adicionados em duas membranas de nitrocelulose distintas, que se encontram na região teste, como um "T" dentro de um cassete de plástico. De acordo com a empresa Chembio Diagnostic Systems (Medford, NY), que desenvolveu a tecnologia de duplo percurso, esta plataforma melhora a eficácia da ligação do imunocomplexo, resultando em maior sensibilidade para o teste e também possibilita diagnosticar mais de uma doença em um mesmo cassete (Chembio, 2016).

A disponibilização de testes imunocromatográficos, representou um dos poucos avanços no diagnóstico da LV nas últimas décadas. Por ser uma técnica de simples realização e interpretação, que não necessita de infraestrutura laboratorial e profissional qualificado, é capaz de reduzir o tempo entre o diagnóstico e o tratamento dos pacientes (Cunningham et al., 2012; Machado de Assis et al., 2016a).

Atualmente, diversas empresas produzem em escala comercial testes rápidos para LV humana, utilizando como antígeno diferentes proteínas recombinantes. O rK39 é utilizado pela Bio-Rad Laboratories, que produz o IT LEISH[®]; pela InBios International, que produz o Kalazar Detect[™] e a pela CTK Biotech, que produz o Onsite *Leishmania* Ab Rapid[®]. Já a proteína recombinante rKE16, é utilizada como antígeno de dois testes rápidos comerciais:

Crystal[®] KA e Signal[®] KA, ambos produzidos pela Span Diagnostic (Sivakumar et al., 2006; WHO, 2011).

O IT LEISH[®] e o Kalazar Detect[™] são os testes imunocromatográficos que utilizam antígeno rK39 mais utilizados para o diagnóstico da LV. No Brasil, estudos demonstram que o IT LEISH[®] apresenta sensibilidade variando de 92 a 100% e especificidade variando de 80 a 100% (Machado de Assis et al., 2008, 2011, 2012; Amato et al., 2009; Cunningham et al., 2012; Peruhype-Magalhães et al., 2012). Na literatura científica mundial, este teste apresenta sensibilidade variando de 88 a 100% e especificidade variando de 89,8 a 99,2% (Marty et al., 2007; Abass et al., 2011, 2015; Canavate et al., 2011; Cunningham et al., 2012; Kumar et al., 2013; Mbui et al., 2013; Bezuneh et al., 2014).

Estudos de avaliação de desempenho do IT LEISH[®] em pacientes portadores de HIV ainda são escassos. No Brasil foi encontrado apenas o estudo de Barbosa Junior et al. (2015) que avaliou o IT LEISH[®] em sete pacientes com HIV e LV confirmada por exame parasitológico direto de aspirado de medula óssea ou PCR. Nestes pacientes o IT LEISH[®] foi positivo em 57,1% (4/7). Na Etiópia, o IT LEISH[®] apresentou 77,3% de sensibilidade, quando avaliado em 44 pacientes coinfectados LV/HIV, que foram confirmados por exame parasitológico direto (Horst et al., 2009) e de 92,3% quando avaliado em 13 pacientes coinfectados, com mesmo critério de diagnóstico confirmatório (Bezuneh et al., 2014). Já na França, o desempenho do IT LEISH[®] em pacientes coinfectados LV/HIV, variou de 54% a 81,8% (Marty et al., 2007; Abass et al., 2015).

No manual de instrução do IT LEISH[®], é informado que o teste apresenta 99% de sensibilidade e 100% de especificidade. De acordo com o fabricante, este estudo foi realizado no nordeste da Índia, com 206 casos comprovados de LV e 269 indivíduos saudáveis ou com outras doenças.

Já em relação ao Kalazar Detect[™], estudos de avaliação de desempenho realizados no Brasil, demonstram que este teste apresenta sensibilidade variando de 72,4 a 88,1% e especificidade variando de 90,6 a 99,6% (Cunningham et al., 2012; Peruhype-Magalhães et al., 2012; Moura et al., 2013). Diversos estudos avaliaram o Kalazar Detect[™] na literatura científica mundial, apresentando sensibilidade variando de 69,2 a 100% e especificidade variando de 70 a 100% (Diro et al., 2007; Goswami et al., 2007, 2012; Takagi et al., 2007; Al-Nahhas et al., 2008; Boelaert et al., 2008; Mandal et al., 2008; Welch et al., 2008; Ozerdem et al., 2009; Saghrouni et al., 2009; Patabhi et al., 2010; Singh et al., 2010, 2013; Teran-Angel et al., 2010; Canavate et al., 2011; Chakravarty et al., 2011; Cunningham et al., 2012; El-

Moamly et al., 2012; Vaish et al., 2012c; Kumar et al., 2013; Moura et al., 2013; Bezuneh et al., 2014; Ghosh et al., 2015).

Assim como para o IT LEISH[®], poucos estudos avaliaram o desempenho do Kalazar Detect[™] em pacientes coinfectados. No Brasil, Cota et al. (2013), avaliando 113 pacientes, obteve sensibilidade de 46,6% e especificidade de 97,1%, para este grupo de pacientes. Também no Brasil, dados coletados em unidades de atendimento de emergência, por Moura et al. (2013), demonstraram sensibilidade de 60% e especificidade de 100% para o Kalazar Detect[™], em um grupo de 93 pacientes coinfectados. Já na Etiópia, este teste imunocromatográfico, apresentou sensibilidade de 84,6%, quando avaliado em 13 pacientes coinfectados (Bezuneh et al., 2014).

No manual de instrução do Kalazar Detect[™], o fabricante descreve estudo realizado no Brasil, com 128 casos de LV confirmados por diagnóstico parasitológico e 59 controles, apresentando sensibilidade de 89,9% e especificidade de 100%.

Boelaerte et al. (2014), em estudo de revisão sistemática com metanálise, avaliaram o desempenho dos testes imunocromatográficos utilizando rK39 em pacientes não portadores de HIV. A sensibilidade global foi de 91,9% e a especificidade de 92,4%. Assim como em diversos estudos, observou-se que a sensibilidade foi significativamente menor na África Oriental (84,3%), em comparação com a Índia (97%). Já em relação à especificidade, não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas regiões, apresentando 90,2% e 91,1%, respectivamente.

Devido ao desempenho inferior dos testes rápidos que utilizam o rK39 na África Oriental, outros antígenos têm sido avaliados e utilizados nesta região, como K28 e rKE16. O gen sintético K28 foi gerado a partir da fusão de polipeptídeos antigênicos isolados de *L. donovani*, contendo sequências parciais de DNA dos antígenos K26 e K39 e a sequência completa do K9. O desempenho do K28 em teste imunocromatográfico utilizando soro, foi avaliado em pacientes do Sudão através de duas plataformas diferentes, por fluxo lateral e por dupla migração, apresentando sensibilidade de 92,3% e 95,9%, respectivamente e especificidade de 100% para ambas plataformas (Pattabhi et al., 2010). Posteriormente, o desempenho do K28 em imunocromatografia por fluxo lateral, utilizando sangue periférico, apresentou sensibilidade de 92,5% e especificidade de 100%, demonstrando que o teste rápido utilizando rK28 pode ser uma valiosa ferramenta para o diagnóstico da LV na região (Mukhtar et al., 2015). A proteína recombinante rKE16 codificada pelo gene cinesina de cepas indianas de *L. donovani*, também vem sendo utilizada em testes rápidos. Vaish et al. (2012c), comparou dois formatos de teste rápido utilizando rKE16 (imunocromatografia de

fluxo lateral e imunocorrelação), apresentando sensibilidade variando de 95,5 a 99% e especificidade de 90,3 a 100%.

Diante da diversidade de produtos disponíveis no mercado, um estudo conduzido pelo TDR (*Programme for Research and Training in Tropical Diseases*) avaliou cinco testes rápidos (IT LEISH[®], Kalazar Detect[™], Onsite *Leishmania* Ab, Crystal[®]KA e Signal[®]-KA) disponíveis comercialmente, em três regiões endêmicas: oeste da África (Sudão e Kênia), América do Sul (Brasil) e subcontinente indiano (Índia, Nepal e Bangladesh). No Brasil, os testes apresentaram elevada especificidade (>95%), mas sensibilidade variável (61,5 a 92%). Os testes que utilizam como antígeno a proteína recombinante rK39 (IT LEISH[®], Kalazar Detect[™] e Onsite *Leishmania* Ab) apresentaram melhor desempenho do que os testes que utilizam proteína recombinante rKE16, sendo o IT LEISH[®] o teste com maior sensibilidade no país (92%). Foi observada diferença significativa de desempenho entre os testes nas diferentes regiões, que pode ser atribuída às diferenças nas concentrações de anticorpos, devido aos diferentes padrões de idade, estado imunológico e/ou nutricional de pacientes e/ou a diversidade parasitária. De acordo com os autores, este estudo mostra a necessidade de realizar a validação regional, antes da incorporação de qualquer teste para o diagnóstico de uma região (WHO, 2011).

O primeiro teste rápido avaliado no Brasil foi o Kalazar Detect[™], por Carvalho et al. (2003). O estudo analisou 128 casos de LV confirmados por exame parasitológico e 60 controles (10 indivíduos saudáveis e 50 portadores de outras infecções). O teste rápido avaliado apresentou 90% de sensibilidade e 100% de especificidade. No entanto, os autores apontam como limitação do estudo o pequeno número de controles avaliados.

Em 2008, o teste rápido IT LEISH[®] foi validado em um estudo multicêntrico em quatro regiões do Brasil: Minas Gerais, Bahia, Piauí e Maranhão, sendo seu desempenho comparado ao da RIFI e ELISA utilizando antígeno bruto de *L. infantum* e rK39. A sensibilidade do IT LEISH[®] foi de 93% e a especificidade foi de 97%. A sensibilidade da RIFI, do ELISA *L. infantum* e do ELISA rK39 foram 88%, 92% e 97%, enquanto as especificidades foram 81%, 77% e 84%, respectivamente. Os resultados permitiram recomendar o IT LEISH[®] para diagnóstico rápido de LV no Brasil, com o devido acompanhamento da sua implantação nos serviços de saúde (Machado de Assis et al., 2008).

No entanto, em 2009, o MS adquiriu o teste rápido Kalazar Detect[™] e o disponibilizou a partir de 2010, para os Laboratórios Centrais de Saúde (LACENS) e hospitais de referência. As evidências disponíveis da validação do Kalazar Detect[™] no Brasil, antes da sua incorporação pelo SUS, não equivaliam a um estudo de validação de fase III, como o

desenvolvido para o teste IT LEISH[®]. Além disso, o IT LEISH[®] pode ser utilizado em soro ou sangue capilar digital, enquanto o Kalazar Detect[™] é padronizado para uso em soro, o que limita seu uso.

Após a compra do Kalazar Detect[™], o MS solicitou ao CRL do CPqRR a avaliação do teste ainda não validado, nas mesmas amostras utilizadas para o estudo de validação do IT LEISH[®] (Machado de Assis et al., 2008). Nesta avaliação, o Kalazar Detect[™] e o IT LEISH[®] apresentaram sensibilidades de 88,1% e 93,3% e especificidades de 90,6% e 96,5%, respectivamente, os autores ainda ressaltaram que testes que utilizam sangue total obtido por punção digital, como o IT LEISH[®] são mais apropriados do que os testes que exigem o uso de soro, como o Kalazar Detect[™] (Perhuype-Magalhães et al., 2012).

Em 2013, Moura et al., avaliaram o desempenho do Kalazar Detect[™] em 11 unidades de emergência de Belo Horizonte. Neste cenário, o teste apresentou sensibilidade de 72,4% e especificidade de 99,6%. De acordo com os autores, o resultado deste teste não é suficiente para excluir LV, sendo necessárias outras técnicas para confirmar casos suspeitos com resultados negativos.

Em Nota Informativa, nº 29 de 2014, o MS comunicou que a partir de 2015 o teste imunocromatográfico Kalazar Detect[™] foi substituído pelo teste IT LEISH[®]. O principal objetivo foi permitir maior descentralização do diagnóstico da LV, permitindo um resultado mais rápido, pois o IT LEISH[®] é padronizado para uso em soro e em sangue capilar digital, podendo ser utilizado a “beira de leito” do paciente. Inicialmente foi recomendada a descentralização do teste para as unidades de saúde que já utilizavam o Kalazar Detect[™] e posteriormente sua expansão para outras regiões (Brasil, 2014b). No entanto, até o momento, o IT LEISH[®] disponibilizado pelo MS está restrito aos LACENs e serviços de referência, onde é realizado em soro.

A aceitação do IT LEISH[®] pelos pacientes e profissionais de saúde foi avaliada no Brasil por Machado de Assis et al. (2016b). O estudo foi realizado em Ribeirão das Neves, Minas Gerais, sendo aplicados questionários a 92 pacientes e 47 profissionais de saúde do município. De acordo com a opinião dos pacientes, 96% consideravam a punção digital uma característica positiva do teste e 98% manifestaram confiança em seu resultado. Em relação à opinião dos profissionais de saúde o teste foi considerado confiável (88%), de fácil realização (86%) e interpretação (91%).

Machado de Assis et al. (2016a) avaliaram a razão de custo-efetividade incremental de seis opções diagnósticas disponíveis para a doença no país: DAT-LPC, RIFI, testes rápidos (Kalazar Detect[™] e IT LEISH[®]), PCR e exame parasitológico direto, na perspectiva do

sistema de saúde pública do Brasil. Na comparação entre testes rápidos, o IT LEISH[®] mostrou-se custo-efetivo e dominante, custo de US\$ 6,57 (R\$ 16,5) e eficácia de 96%, sobre o Kalazar Detect[™], custo de US\$ 7,45 (R\$ 18,7) e eficácia de 86%. Os resultados mostraram que a decisão do MS de substituir o Kalazar Detect[™] pelo IT LEISH[®] foi economicamente acertada.

Vale ressaltar que, além da utilização dos testes rápidos em amostras de soro e sangue de polpa digital, tem sido realizada a avaliação desta técnica em outras amostras biológicas, como urina, saliva e escarro. O Kalazar Detect[™], utilizando urina apresentou sensibilidade e especificidade variando 95 a 100% e 81,8 a 100% (Khan et al., 2010; Chakravarty et al., 2011; Goswami et al., 2012; Singh et al., 2013; Mohapatra et al., 2016), em amostras de saliva variando de 82,5 a 83,6% e 84 a 91,6% (Vaish et al., 2012b; Mohapatra et al., 2016) e em escarro de 99,2% e 100% (Singh et al., 2009), respectivamente. Os resultados sugerem que a utilização destas amostras biológicas pode ser uma alternativa prática e eficiente para o diagnóstico de pacientes com LV, principalmente onde os recursos são limitados.

De acordo com a OMS, em serviços de atenção primária à saúde localizados em regiões endêmicas, o teste rápido deveria ser utilizado. Pacientes apresentando suspeita clínica, com um teste rápido positivo e sem história prévia de LV deveriam ser tratados. Em áreas onde a sensibilidade do teste rápido se mostrou abaixo de 90%, outro método diagnóstico deveria ser utilizado, tais como o DAT ou o parasitológico. Já em centros de referência, além do teste rápido, do DAT e do parasitológico, outros métodos também podem ser utilizados, tais como: RIFI, ELISA e PCR (WHO, 2010).

Nestas recomendações da OMS, fica clara a importância de técnicas que apresentam alto desempenho, sejam de fácil execução e interpretação, para o diagnóstico da LV. No entanto, é questionável a viabilidade de realização do diagnóstico parasitológico em serviços de atenção primária à saúde, visto que se trata de uma técnica invasiva, que necessita de profissionais especializados e infraestrutura para sua realização. A utilização da RIFI e do ELISA (descrito de forma genérica) em centros de referência também é contestável, tendo em vista que são técnicas que apresentam sensibilidade variável não devendo ser utilizadas como diagnóstico confirmatório. Desta forma, ressalta-se a importância do DAT e dos testes imunocromatográficos para o diagnóstico da LV.

3.2.1.4 Diagnóstico molecular

Métodos moleculares têm sido utilizados para o diagnóstico das leishmanioses desde a década de 80 (Lopes e Wirth, 1986). Atualmente, os ensaios baseados na PCR, como PCR

convencional e PCR em tempo real (qPCR, do inglês “*real-time PCR*”), constituem as principais abordagens moleculares utilizadas em laboratórios e centros de pesquisas.

A técnica de PCR consiste na síntese *in vitro* de uma sequência de DNA alvo específica. Para ocorrência da reação, são utilizados iniciadores, complementares à sequência a ser amplificada no DNA alvo, enzima DNA polimerase e desoxinucleotídeos trifosfatados, que são adicionados pela polimerase na área delimitada pelos iniciadores. O aumento exponencial da sequência específica ocorre com o processo de desnaturação da fita molde, ligação dos iniciadores e extensão, promovidos pela variação da temperatura em ciclos alternados (Saiki et al., 1985; Mullis e Faloona, 1987).

Atualmente, diversos protocolos de testes moleculares foram padronizados para LV, incluindo como alvos diversas sequências gênicas, como: DNA do cinetoplasto - kDNA (Cortes et al., 2004; Mohammadiha et al., 2013; Sudarshan & Sundar, 2014), RNA ribossomal (Van Eys et al., 1992), mini-éxon derivado do RNA (Kuhls et al., 2007), beta-tubulina (Akman et al., 2000), glicoproteína 63 (Guerbouj et al., 2001) e espaçador interno transcrito - ITS (El Tai et al., 2000; Schönian et al., 2003).

De acordo com estudo de revisão sistemática, a sensibilidade e a especificidade da PCR utilizando sangue periférico são estimadas em 93,1% e 95,6%, já utilizando o aspirado de medula óssea, são estimadas em 95,3% e 92,6%, respectivamente. Neste estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras biológicas avaliadas, demonstrando não ser necessária a realização de aspirado de medula óssea para se obter bom desempenho através da PCR (De Ruiter et al., 2014). Outro estudo de revisão sistemática avaliou o desempenho da PCR em pacientes coinfetados com HIV, estimando sensibilidade de 92% e especificidade de 96% utilizando sangue periférico e sensibilidade de 98% em aspirado de medula (Cota et al., 2012).

Embora existam kits comerciais de PCR convencional, como o *Leishmania* sp. PCR Detection Kit – CinnaGen e de PCR tempo real, como BM Laboratuvar Sistemleri® e Stat-Nat® *Leishmania* spp., no Brasil não há kits comerciais registrados na ANVISA para o diagnóstico molecular da LV (Brasil, 2016b). Atualmente, há um consenso sobre a necessidade de padronização dos ensaios de PCR, pois não há uniformidade entre os protocolos utilizados nos diferentes centros, dificultando a comparação dos resultados (WHO, 2010; De Ruiter et al., 2014).

O desenvolvimento de técnicas de amplificação isotérmica de DNA, que não requerem termociclador para sua realização, trouxe novas perspectivas para o diagnóstico molecular das doenças infecciosas, incluindo a possibilidade de implantação da técnica em serviços com

estrutura laboratorial simples, devido à necessidade de menor infraestrutura especializada. Entre essas técnicas, destaca-se a LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), que tem limite de detecção igual ou superior ao da PCR convencional, dispensa o uso de termociclador e possibilita a interpretação a “olho nu” pela visualização dos produtos de DNA.

Até o presente momento, apenas dois protocolos de LAMP para leishmanioses estão disponíveis na literatura, sendo um destinado à amplificação do DNA de *L. donovani* (Takagi et al., 2009) e o outro genérico, que amplifica região conservada entre as espécies de *Leishmania* (Adams et al., 2010). As avaliações de acurácia diagnóstica mostraram sensibilidade variando de 80 a 96,8% e especificidade de 98 a 100% (Takagi et al., 2009; Adams et al., 2010; Khan et al., 2012; Verma et al., 2013). Não há kits comerciais de LAMP disponíveis para o diagnóstico de LV.

De acordo com estudo realizado no Brasil, o custo para realização da PCR convencional em um centro de referência para leishmanioses é de US\$ 32,72 (R\$ 82,1), sendo estratégia mais custo-efetiva que o aspirado de medula óssea realizado em hospital (Machado de Assis et al., 2016a).

3.3 Registro de produtos para diagnóstico de doenças

No Brasil, de acordo com a lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, *nenhum produto relacionado à saúde, nacional ou importado, poderá ser vendido antes de registrado no MS, com exceção dos indicados no § 1º do Art. 25: aparelhos, instrumentos e acessórios usados em medicina, odontologia e atividades afins, bem como nas de educação física, embelezamento ou correção estética, que embora dispensados de registro, estão sujeitos a regime de Vigilância Sanitária* (Brasil, 2016c).

O registro de produto para saúde é ato privativo da ANVISA, após avaliação e despacho concessivo de seu dirigente, destinado a comprovar o direito de fabricação e de importação de produto, com a indicação do nome do produto, do fabricante, da finalidade e de outros elementos que o caracterizam (Brasil, 1999, 2016c).

Os produtos de diagnóstico de uso *in vitro* (PDIV) estão inseridos na categoria de produtos para saúde e compreendem *todos os reagentes, calibradores, padrões, controles, coletores de amostras, materiais e instrumentos usados individualmente ou em combinação, com intenção de uso determinada pelo fabricante, para análise in vitro de amostras derivadas do corpo humano, a fim de fornecer diagnóstico, monitoramento, triagem ou para determinar a compatibilidade com potenciais receptores de sangue, tecidos e órgãos* (Brasil, 2016c).

O registro de PDIV é regido pela ANVISA através da Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015, que *dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de PDIV, seus instrumentos e dá outras providências* (Brasil, 2015a).

Para fins de regularização junto à ANVISA os PDIVs são enquadrados em classes de risco I a IV, que levam em consideração os seguintes critérios: *a indicação de uso declarada pelo fabricante; o conhecimento técnico, científico ou médico do usuário; a importância da informação fornecida ao diagnóstico; a relevância e o impacto do resultado para o indivíduo e para a saúde pública e a relevância epidemiológica*. Os dispositivos destinados ao diagnóstico da LV, por ser doença de notificação compulsória prevista na portaria nº 1.271, são classificados como classe de risco III (Brasil, 2015a, 2015b).

Para o registro de PDIV classificados com classe de risco II, III e IV, o documento de maior detalhamento exigido ao fabricante é o dossiê técnico. *Este documento descreve os elementos que compõem o produto, indicando as características, a finalidade, o modo de uso, o conteúdo, os cuidados especiais, os potenciais riscos, o processo produtivo e as informações adicionais* (Brasil, 2015a).

Um das informações que devem ser incluídas no dossiê técnico, de acordo com a referida resolução é o estudo de desempenho do PDIV a ser registrado. Este estudo deve conter: *caracterização e validação de amostras clínicas utilizadas e suas condições de armazenamento e estabilidade; determinação da rastreabilidade metrológica de valores de calibradores e controles; exatidão de medição; precisão de medição, incluindo: repetibilidade e reprodutibilidade; sensibilidade analítica ou limite de detecção; especificidade analítica; efeito pró-zona de alta dose; intervalo de medição (limites) ou linearidade; definição de valor de cut-off; relatório da validação do procedimento de ensaio; relatório da validação do procedimento de limpeza e desinfecção para instrumentos que requeiram contato direto com o paciente ou usuário leigo; relatório de usabilidade para os produtos destinados aos usuários leigos; estabilidade do produto (exceto instrumentos)* (Brasil, 2015a).

A RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015, também regulamenta os requisitos necessários às instruções de uso dos PDIVs, que *correspondem ao manual do produto, prospectos ou outros documentos, contendo informações e orientações ao usuário, suficientes e adequadas para sua correta utilização com segurança e eficácia. Estes documentos devem ser redigidos em língua portuguesa e ser de fácil entendimento, com linguagem adequada ao público ao qual se destina* (Brasil, 2016c).

De acordo com o Art. 35 da respectiva RDC, as instruções de uso devem conter informações essenciais, tais como: *I - nome técnico ou nome comercial do produto; II - razão social e endereço do fabricante legal, junto com um número de telefone ou fax ou endereço de sítio eletrônico onde seja possível obter assistência técnica (Serviço de Atendimento ao Consumidor); III - finalidade e modo de uso do produto, incluindo indicação de que é para "uso em diagnóstico in vitro"; IV - usuário pretendido, quando aplicável; V - indicações de condições de armazenamento ou de manuseio aplicáveis; VI - princípio de funcionamento do teste ou do instrumento; VII - tipos de amostras ou matrizes a utilizar, quando aplicável; VIII - condições para coleta, manuseio, preparo e preservação de amostras; IX - descrição do produto, incluindo os acessórios e quaisquer limitações para seu uso, como utilização de instrumento dedicado, e se aplicável, versão do software; X - estabilidade em uso do produto, exceto para instrumentos, incluindo condições de armazenamento após abertura de embalagens primárias, bem como condições de armazenamento e estabilidade de soluções de trabalho, quando relevante; XI - detalhes de qualquer tratamento ou manuseio dos produtos antes de estarem prontos para uso, como instalação, reconstituição, calibração, entre outros; XII - quando aplicável, recomendações para procedimentos de controle de qualidade; XIII - procedimento de ensaio, incluindo cálculos e interpretação de resultados; XIV - informação sobre substâncias interferentes ou limitações que podem afetar o desempenho do ensaio; XV - características de desempenho, tais como sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão, exceto para instrumentos; XVI - riscos residuais identificados; XVII - intervalos de referência, quando aplicável; XVIII - quando relevante, requisitos de instalações especiais (como sala limpa) ou treinamento especial (como em segurança contra radiação) ou qualificações específicas do usuário do produto; XIX - se o produto é fornecido estéril, instruções de como agir se a embalagem estiver danificada antes do uso; XX - informação de outros produtos, materiais ou instrumentos necessários para a realização do ensaio ou reação; XXI - alertas ou precauções a serem tomadas com relação ao descarte do produto, de seus acessórios e dos consumíveis usados, incluindo riscos de infecção ou microbiológicos, ambientais e físicos; XXII - para produtos destinados a usuários leigos, as circunstâncias nas quais o usuário deve consultar um profissional de saúde; XXIII - data de emissão ou última revisão das instruções de uso e, quando apropriado, uma identificação numérica; e XXIV - indicação dos termos e condições de garantia da qualidade do produto (Brasil, 2015a).*

Vale ressaltar que de acordo com a RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015, *fica estabelecido o prazo de 365 (trezentos e sessenta e cinco) dias, contados a partir da data de*

publicação desta Resolução, para as adequações em rótulos, instruções de uso dos produtos e para a manutenção do dossiê técnico (Brasil, 2015a). Assim, todos os manuais de instrução de testes diagnósticos em uso deveriam ter sido atualizados até agosto de 2016.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliação de desempenho de testes comerciais registrados na ANVISA para o diagnóstico da LV humana foram utilizadas amostras de soros de pacientes incluídos em dois projetos desenvolvidos previamente pelo Grupo PCPP do CPqRR/Fiocruz: “Validação de teste rápido para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana” e “Intensidade de infecção, persistência parasitária e perfil imune como preditores de evolução clínica de leishmaniose visceral entre pacientes infectados ou não pelo HIV”.

4.1 Cálculo amostral

Para o cálculo amostral, utilizou-se o software Stata[®]/SE versão 11.0, US, considerando a sensibilidade mínima desejada de 95% para um teste diagnóstico para LV (Boelaert et al., 2007). Estimou-se em 155 o menor número de soros necessários para a análise do desempenho dos testes, aceitando uma variação inferior máxima de 5% no desempenho, nível de significância de 0,05 e poder de 0,80.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão de amostras biológicas

No presente estudo foram incluídos soros de pacientes residentes em área endêmica para LV, que apresentavam exame parasitológico de aspirado de medula óssea e síndrome clínica sugestiva da doença, caracterizada por febre, associada a pelo menos uma das seguintes alterações: esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, leucopenia e/ou plaquetopenia. Foram excluídas amostras de pacientes com história prévia de LV.

4.3 Grupos de estudo

No total, foram incluídas 237 amostras de soros de pacientes que apresentavam média de idade de 25 anos, variando de 1 mês a 76 anos, sendo 66% (157/237) do sexo masculino. Destes pacientes, 160 eram não portadores de infecção pelo HIV e apresentavam média de idade de 18 anos (variação: 1 mês a 76 anos), sendo 63% (101/160) do sexo masculino e 77 eram portadores de infecção pelo HIV (contagem média de linfócitos T CD4+ \leq 200 células/mm³), apresentavam média de idade de 40 anos (variação: 20 a 65 anos), sendo 73% (56/77) do sexo masculino. As amostras foram estratificadas em quatro grupos:

- **Grupo 1:** 80 soros de pacientes não portadores de infecção pelo HIV, que apresentavam clínica sugestiva de LV e exame parasitológico de aspirado de medula óssea positivo;

- **Grupo 2:** 80 soros de pacientes não portadores de infecção pelo HIV, que apresentavam clínica sugestiva de LV, exame parasitológico de aspirado de medula óssea negativo e confirmação de doença de outra etiologia;
- **Grupo 3:** 38 soros de pacientes portadores de infecção pelo HIV, que apresentavam clínica sugestiva de LV e exame parasitológico de aspirado de medula óssea positivo;
- **Grupo 4:** 39 soros de pacientes portadores de infecção pelo HIV, que apresentavam clínica sugestiva de LV, exame parasitológico de aspirado de medula óssea negativo e confirmação de doença de outra etiologia.

4.4 Identificação dos produtos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A busca dos produtos diagnósticos para LV foi realizada por acesso virtual ao banco de dados da ANVISA, através do endereço eletrônico <http://portal.anvisa.gov.br>, seguindo os passos: 1º) Consulta a produtos; 2º) Produtos para a saúde e 3º) Acessar.

Os registros de produtos de saúde podem ser localizados por meio do número do processo, nome do produto, nome técnico, número do registro ou número do Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica (CNPJ) da empresa responsável. Neste trabalho, a busca de produtos diagnósticos foi realizada utilizando-se as seguintes palavras-chave que poderiam constar nos nomes dos produtos: Leish, *Leishmania*, Leishmaniose, Calazar, Kalazar e LV.

A busca foi realizada no período de julho a setembro de 2015 e atualizada em dezembro de 2016. Após a localização dos registros, o banco de dados da ANVISA disponibiliza as seguintes variáveis: nome da empresa, CNPJ, produto, modelo produto médico, nome técnico, registro, processo, autorização, origem do produto, classificação de risco e vencimento do registro.

Na busca realizada em 2015, foram encontrados 66 registros de produtos para saúde. Após análise detalhada, foram excluídos 46 registros não relacionados ao diagnóstico da LV e registros repetidos, permanecendo 20 registros de testes diagnósticos para LV. Em dezembro de 2016 foram identificados mais dois novos registros de kits para LV humana na ANVISA: *Leishmania* Virclia IgG+IgM Monotest (Vircell S. L.) e *Leishmania* IFA IgG (Vircell S. L.). Importante destacar que este último kit tinha registro vencido na busca realizada em 2015. O **Quadro 1** apresenta os 22 registros de kits diagnósticos para LV encontrados na ANVISA que permaneceram ao final das buscas, sendo nove registros vigentes e treze vencidos.

Quadro 1 Registros de kits diagnósticos para leishmaniose visceral humana na Agência Nacional de Vigilância Sanitária em dezembro de 2016.

Nome comercial	Distribuidor	Fabricante – País	Vencimento do registro
Produtos com registro vigente			
<i>Leishmania</i> Virclia IgG+IgM Monotest	Virion Diagnostica Ltda	Vircell S.L. – Espanha	19/09/2021
<i>Leishmania</i> IFA IgG	Virion Diagnostica Ltda	Vircell S.L. – Espanha	29/08/2021
<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	Virion Diagnostica Ltda	Vircell S.L. – Espanha	21/09/2020
Ridascreen® <i>Leishmania</i> Ab	Resserv Comércio de Produtos Diagnósticos Ltda	R-Biopharm AG – Alemanha	13/07/2020
IT LEISH®	DiaMed Latino América S.A.	BIO-RAD Laboratories, Inc.– França	05/04/2020
IFI Leishmaniose Humana - Bio-Manguinhos	Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)	Fiocruz – Brasil	23/03/2020
NovaLisa™ <i>Leishmania infantum</i> IgG – ELISA	Argoslab Distribuidora de Produtos para Laboratórios Ltda	Novatec Immundiagnostica GMBH – Alemanha	19/05/2019
OL Leishmaniose Visceral Humana	Orangelife Comércio e Indústria Ltda	Orangelife Comércio e Indústria Ltda – Brasil	04/02/2018
Leishmaniose Visceral Rápido	Vida Biotecnologia Ltda	Vida Biotecnologia Ltda – Brasil	24/12/2017
Produtos com registro vencido			
<i>Leishmania</i> IFA IgG	Virion Diagnostica Ltda	Vircell S.L. –Espanha	07/12/2015
Orange DPP LVH	Orangelife Comércio e Indústria Ltda	Orangelife Comércio e Indústria Ltda – Brasil	16/08/2015
Signal Ka – flow through anti-leishmanial spot / immunodot test kit	RZ de Oliveira Diagnóstica EPP	Span Diagnostics Ltda – Índia	24/11/2013
<i>Leishmania</i> IFA IgG	Resserv Comércio de Produtos Diagnosticos Ltda	Vircell S.L. –Espanha	14/04/2013
<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	Resserv Comércio de Produtos Diagnosticos Ltda	Vircell S.L. –Espanha	02/07/2012
Leishmania Visceral IgG CELISA	RCS Comércio de Produtos em Diagnóstico Ltda	Cellabs PTY Ltd – Austrália	18/06/2012
Leishmania CEL	RCS Comércio de Produtos em Diagnóstico Ltda	Cellabs PTY Ltd – Austrália	02/10/2011
<i>Leishmania</i>	Medivax Indústria e Comércio Ltda	IVD Research Inc. – Estados Unidos	01/03/2011
Kalazar Detect™ Rapid Test	Fundação de Apoio ao Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes	Inbios International, Inc.– Estados Unidos	07/01/2010
Teste de Elisa para Determinação de Anticorpos IgG para <i>Leishmania Infantum</i> LIG153	B.T.I Biotecnologia Industrial Ltda	B.T.I Biotecnologia Industrial Ltda – Brasil	24/08/2006
Kit Qualicode Chagas / <i>Leishmania</i>	D-MED Material Médico Laboratorial Ltda	Immunitics Inc – Estados Unidos	13/07/2003
Melotest <i>Leishmania</i> Ab	Laboratorio Pas Comercial Ltda	MELOTEC S.A – Espanha	28/04/2003
<i>Leishmania</i> Donovanii Liofilizado	Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos LTDA (CECON)	CECON – Brasil	07/12/1999

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 01 de dezembro de 2016.

4.5 Identificação dos testes diagnósticos comercialmente disponíveis no Brasil

A fim de identificar quais produtos registrados na ANVISA estavam comercialmente disponíveis, foram realizados contatos através de páginas da *web*, e-mail e telefone, com os quinze distribuidores de kits para LV que possuíam registros, vigentes ou vencidos, nas buscas realizadas em 2015 e 2016. Importante destacar que algumas empresas eram responsáveis pela distribuição de mais de um kit diagnóstico. Por exemplo, a empresa Virion Diagnostica Ltda é distribuidora de três kits com registro ativo e um com registro vencido. Os contatos ocorreram de julho de 2015 a dezembro de 2016. Foram obtidas respostas de 12/15 empresas contatadas. Com exceção dos distribuidores RCS Comércio de Produtos em Diagnóstico Ltda; B.T.I Biotecnologia Industrial Ltda e Laboratório Pas Comercial Ltda, que não possuem contato ativo ou não responderam após sucessivas tentativas de contato, todos os demais distribuidores responderam, conforme detalhamento abaixo.

Os kits de diagnóstico OL Leishmaniose Visceral Humana (Orangelife), Orange DPP LVH (Orangelife), Leishmaniose Visceral Rápido (Vida Biotecnologia), Leishmania Donovanii Liofilizado (CECON); Leishmania (IVD Research) e Kit Qualicode Chagas/Leishmania (Immunitics Inc) não são mais produzidos. O kit Leishmania Virclia IgG+IgM Monotest (Vircell S. L.), que possui registro recente, ainda não é comercializado no país e os kits Signal Ka (Span Diagnostics Ltda) e Kalazar Detect[™] (Inbios) não são mais comercializados no Brasil.

Dos testes diagnósticos para LV registrados na ANVISA, seis kits estão disponíveis no mercado brasileiro, sendo três kits de ELISAs, dois kits de RIFIs, e um teste imunocromatográfico (**Quadro 2**).

Quadro 2 Kits diagnósticos para leishmaniose visceral humana com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária comercialmente disponíveis no Brasil, em dezembro de 2016.

Nome comercial	Fabricante	Metodologia
<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	Vircell S. L.	ELISA
Ridascreen [®] <i>Leishmania</i> Ab	R-Biopharm AG	ELISA
NovaLisa [™] <i>Leishmania infantum</i> IgG	Novatec Immundiagnostica GMBH	ELISA
<i>Leishmania</i> IFA IgG	Vircell S. L.	RIFI
IFI Leishmaniose Humana - Bio-Manguinhos	Fundação Oswaldo Cruz	RIFI
IT LEISH [®]	BIO-RAD Laboratories, Inc.	Teste imunocromatográfico

Legenda: ELISA (ensaio imunoenzimático); RIFI (reação de imunofluorescência indireta).

4.6 Parcerias estabelecidas e kits incluídos no estudo

Uma vez identificados os kits comercialmente disponíveis no mercado brasileiro para o diagnóstico da LV, entre agosto a dezembro 2015, a equipe de pesquisadores do PCPP CPqRR/Fiocruz, enviou carta convite às empresas: Virion Diagnostica Ltda; Argoslab Distribuidora de Produtos para Laboratórios Ltda e Alka[®] Tecnologia, propondo parceria na realização do presente projeto de pesquisa.

O contato com a empresa DiaMed Latino Americana, produtora do IT LEISH[®] (BIO-RAD Laboratories, Inc.) não foi necessário, pois, esta já havia doado seus kits ao presente grupo de pesquisa anteriormente para realização do projeto “Validação de teste rápido para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana”. O contato com Bio-Manguinhos, produtora do IFI Leishmaniose Humana também não foi necessário, pois este teste foi realizado em todos os soros dos pacientes incluídos no estudo, por ser teste disponibilizado pelo programa de controle da LV no país.

A Virion Diagnostica Ltda, distribuidora do *Leishmania* ELISA IgG+IgM e *Leishmania* IFA IgG e a Alka[®] Tecnologia distribuidora do Ridascreen[®] *Leishmania* Ab aceitaram a proposta de parceria, realizando a doação de todos os kits necessários ao estudo. Ambas as empresas também disponibilizaram um profissional para acompanhamento dos ensaios realizados no PCPP. Já a Novatec Immundiagnostica GMBH – Alemanha, por meio de resposta dada pela sua distribuidora no Brasil Argoslab Distribuidora de Produtos para Laboratórios Ltda, foi a única empresa que não aceitou a parceria proposta, desta forma, o ELISA NovaLisa[™] *Leishmania infantum* IgG – ELISA (Novatec Immundiagnostica) foi o único teste com registro na ANVISA e disponível comercialmente para o diagnóstico da LV humana no país, não incluído no presente estudo.

Optou-se também por incluir neste estudo o teste imunocromatográfico Kalazar Detect[™] (Inbios International, Inc) e o DAT-LPC, teste diagnóstico desenvolvido pelo PCPP CPqRR/Fiocruz. O Kalazar Detect[™], ainda que atualmente apresente registro vencido na ANVISA, foi incluído por se tratar do primeiro teste rápido disponibilizado pelo MS no Brasil, estando em uso até 2014, quando foi substituído pelo teste rápido IT LEISH[®]. O contato com a Inbios International Inc também não foi necessário, pois, o MS já havia doado o teste ao PCPP anteriormente. A inclusão do DAT-LPC levou em consideração resultados de um estudo recente que apontou o DAT-LPC como o teste mais custo-efetivo disponível para o diagnóstico da LV no país. Na ocasião, os autores sugeriram a substituição da RIFI pelo DAT-LPC nos serviços públicos do país (Machado de Assis et al., 2016a).

Considerando todas as informações apresentadas acima, os testes incluídos no presente estudo e suas características estão demonstrados no **Quadro 3**.

Quadro 3 Kits diagnósticos para leishmaniose visceral humana incluídos no estudo e suas características.

Kits diagnósticos	Fabricante	Método	Temperatura de armazenamento	Validade (meses)	Antígeno utilizado	Amostra	Volume de amostra para uma reação
IFI Leishmaniose Humana	Fundação Oswaldo Cruz	RIFI	2 a 8°C	6 a 12	Promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.*	Soro	10µL
IT LEISH®	BIO-RAD Laboratories, Inc.	Teste imunocromatográfico	2 a 30°C	16	rK39	Sangue, soro, plasma	8-12µL
Kalazar Detect™	Inbios International, Inc.	Teste imunocromatográfico	20 a 30°C	24	rK39	Soro	20µL
<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	Vircell S. L.	ELISA	2 a 8°C	Não informado no kit	<i>Leishmania infantum</i>	Soro	5µL
Ridascreen® <i>Leishmania</i> Ab	R-Biopharm AG	ELISA	2 a 8°C	36	<i>Leishmania infantum</i>	Soro	5µL
<i>Leishmania</i> IFA IgG	Vircell S. L.	RIFI	2 a 8°C	Não informado no kit	Promastigotas de <i>L. infantum</i>	Soro	10µL
DAT-LPC	Laboratório de Pesquisas Clínicas	DAT	2 a 8°C	24	Promastigotas de <i>L. infantum</i>	Soro	2µL

Legenda: ELISA (ensaio imunoenzimático); RIFI (reação de imunofluorescência indireta); DAT (teste de aglutinação direta); *espécie não informada nas instruções de uso.

4.7 Procedimentos para realização dos kits avaliados

Antes da realização dos testes diagnósticos, todas as 237 amostras de soro que compõem os grupos de estudo foram codificadas por um pesquisador independente e essa codificação foi mantida em sigilo até o momento da análise dos resultados. Todos os testes diagnósticos foram realizados seguindo rigorosamente instruções dos fabricantes.

4.7.1 Reação de imunofluorescência indireta

4.7.1.1 IFI Leishmaniose Humana (Bio-Manguinhos)

O kit contém a maior parte dos reagentes necessários à execução do procedimento, com exceção dos controles positivo e negativo e o tampão fosfato salina (PBS). A titulação do conjugado foi realizada a cada novo kit.

Antes do início do procedimento, foi realizada a sensibilização das lâminas com 10 microlitros (μL) de solução antigênica e estas foram incubadas à temperatura ambiente por 12 horas. No momento da realização do procedimento, as amostras de soro foram submetidas à diluição seriada na proporção de 1:40 até 1:640 e 10 μL de cada diluição foram dispensados nas lâminas e incubadas a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida. Após este período, as lâminas foram lavadas por três minutos em PBS; rapidamente em água reagente tipo I e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 15 μL da solução de anti-imunoglobulina humana ligada à fluoresceína diluída em PBS com Azul de Evans (0,1%). As etapas de incubação e lavagem anteriormente descritas foram repetidas, e então 3 a 4 gotas de glicerina foram dispensadas sobre cada lâmina, e esta coberta com lamínula.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência a 400 \times , sendo considerada positiva a reação que apresenta fluorescência na membrana do parasito a partir da diluição de 1:80 e considerada negativa na ausência de fluorescência.

4.7.1.2 *Leishmania* IFA IgG (Vircell S. L.)

Todos os reagentes vêm prontos para uso, à exceção do PBS que necessita ser diluído antes do procedimento. As lâminas que acompanham os kits são fornecidas já sensibilizadas com formas promastigotas de *L. infantum*, inativadas com formaldeído e fixadas com acetona.

Inicialmente, 5 μL das amostras de soro foram diluídos em 195 μL de PBS (diluição 1:40) e 50 μL desta primeira diluição em 50 μL de PBS (diluição 1:80). Foram adicionados às lâminas 20 μL de cada diluição e 20 μL dos controles negativo e positivo, que não necessitam de diluição prévia. As lâminas foram incubadas a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida e a seguir lavadas por 10 minutos em PBS, rapidamente em água tipo I e secas ao ar. Em

seguida, foram adicionados 20 µL da solução de anti-imunoglobulina humana ligada à fluoresceína e as etapas de incubação e lavagem foram repetidas. Uma gota de glicerina foi adicionada em cada poço da lâmina e esta coberta com lamínula.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência a 400×, sendo considerada positiva a reação que apresenta fluorescência periférica, citoplasmática e flagelar, a partir da diluição de 1:80, e considerada negativa quando se observa padrão celular vermelho ou diferente do especificado como positivo. As amostras positivas, foram então diluídas até 1:640, a fim de determinar sua titulação.

4.7.2 Ensaio Imunoenzimático

4.7.2.1 *Leishmania* ELISA IgG+IgM (Vircell S. L.)

O kit contém todos os reagentes necessários para execução do procedimento, fornecendo uma placa com 96 poços sensibilizados com antígenos de *L. infantum*, além de controles positivos, negativos e limite. Todos os reagentes já vêm prontos para uso, à exceção da solução de lavagem que vem concentrada (20x) e foi diluída em água tipo I antes do início do procedimento.

Inicialmente, 5 µL das amostras, controle positivo, controle negativo e controle limite, este último em duplicata, foram diluídos em 100 µL de solução diluente (1:20). As diluições foram realizadas diretamente na placa, e esta foi agitada por 2 minutos em agitador, sendo posteriormente incubada a 37°C por 45 minutos em estufa. Em seguida, foi realizada a lavagem da placa, utilizando 300 µL de solução de lavagem por cinco vezes e adicionados 100 µL do conjugado. Novamente a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após incubação, o processo de lavagem foi repetido e foram adicionados 100 µL de solução de substrato, sendo a placa incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, no escuro. A reação foi finalizada pela adição de 50 µL de solução de paragem e a leitura realizada em espectrofotômetro a 450/620 nanômetros (nm).

As reações válidas apresentaram densidades óticas (DO) dos controles dentro do intervalo pré-determinado pelo fabricante, sendo para o controle positivo $DO > 0,9$; controle negativo $DO < 0,5$ e controle limite $1,5 > DO > 0,55$.

Para interpretação do teste, foi calculado o índice de anticorpos:

$$\text{Índice de anticorpos} = \frac{DO \text{ da amostra}}{\text{média da DO do controle limite}} \times 10$$

Amostras com índice de anticorpo menor que 9 foram consideradas negativas, maiores que 11 foram consideradas positivas e entre 9 e 11 foram consideradas duvidosas e testadas

novamente. No presente estudo, sete amostras (seis de pacientes não portadores de infecção pelo HIV e 1 portador de infecção pelo HIV) foram classificadas como duvidosas nas duas avaliações e desta forma, foram excluídas das análises de desempenho.

4.7.2.2 Ridascreen[®] *Leishmania* Ab (R-Biopharm)

Todos os reagentes necessários para execução do procedimento, assim como controles positivos e negativos são fornecidos no kit. A placa de 96 poços necessária para execução do procedimento já vem sensibilizada com antígenos de *L. infantum*. Com exceção da solução de lavagem, que vem concentrada (10x) e foi diluída em água tipo I antes do início do procedimento, todos os outros reagentes já vêm prontos para uso.

Inicialmente, 5 µL das amostras foram diluídos em 245 µL de solução diluente (1:50) e 100 µL desta diluição foram transferidos para a placa do kit, sendo também acrescentados 100 µL do controle negativo (em duplicata) e 100 µL do controle positivo, que não necessitam de prévia diluição. A placa foi incubada em temperatura ambiente (20 a 25°C) por 15 minutos e posteriormente lavada com 300 µL de solução de lavagem por cinco vezes. Em seguida, foram adicionados 100 µL do conjugado, a placa foi novamente incubada em temperatura ambiente por 15 minutos e a seguir foi realizado o mesmo processo de lavagem. Foram adicionados 100 µL do substrato e a placa foi novamente incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 50 µL de reagente bloqueador e a leitura realizada em espectrofotômetro a 450/620 nm.

São consideradas reações válidas aquelas que os controles apresentam DOs dentro do intervalo pré-determinado pelo fabricante, sendo para o controle negativo média de $DO < 0,3$ e DOs individuais com desvio menor que 25% em relação ao valor médio, já para o controle positivo $DO > 0,8$.

Para interpretação do teste, foi calculado o *cut-off* e o índice de amostras, conforme detalhamento abaixo:

$$\text{cut - off} = \text{média da DO do controle negativo} + 0,150$$

$$\text{índice das amostras} = \frac{\text{DO da amostra}}{\text{cut - off}}$$

Amostras com índice de anticorpo menor que 0,9 foram consideradas negativas, maiores que 1,1 foram consideradas positivas e entre 0,9 e 1,1 foram consideradas duvidosas e testadas novamente. No presente estudo, três amostras de pacientes não portadores de

infecção por HIV foram classificadas como duvidosas nas duas avaliações e desta forma foram excluídas das análises de desempenho.

4.7.3 Teste de Aglutinação Direta

O kit protótipo do DAT-LPC vêm com todos os reagentes necessários para realização do procedimento. A solução de reidratação e a solução diluente vêm concentradas (10x) e foram diluídas em água tipo I antes do início do procedimento.

Inicialmente, 5 mL de solução de reidratação diluída foi utilizada para ressuspender o antígeno liofilizado. Foi realizada a diluição em série das amostras em solução diluente partindo de 1:100 até a diluição de 1:800 e em seguida foram adicionados 50 µL do antígeno em todos os poços. A microplaca foi homogeneizada em agitador de placas por 5 minutos e incubada ao abrigo da luz por quatro horas. A leitura foi realizada visualmente contra uma superfície plana, sendo consideradas negativas as amostras que se visualizava o parasito não aglutinado e positivas na presença de aglutinação na diluição acima de 1:100. Amostras positivas até a diluição de 1:800 foram posteriormente diluídas até 1:102.400 a fim de determinar sua titulação. O título foi determinado como sendo a última diluição onde houve aglutinação.

4.7.4 Testes imunocromatográficos

4.7.4.1 Kalazar Detect™ (Inbios)

O kit contém todo o material necessário para execução do procedimento. Inicialmente, 20 µL de soro foram dispensados na área indicada por uma seta na tira teste. Em seguida, a tira teste foi transferida para um tubo de ensaio contendo três gotas da solução tampão. A leitura do resultado foi realizada quando o fundo da tira teste já estava claro, em até 10 minutos após o término da reação. O teste foi considerado positivo quando foi possível visualizar as duas linhas (teste e controle) e negativo, quando somente a linha controle foi visualizada na membrana de nitrocelulose.

4.7.4.2 IT LEISH® (BIO-RAD)

O kit contém todo o material necessário para execução do procedimento. Inicialmente uma gota de solução tampão foi dispensada no primeiro poço da bandeja e quatro gotas de solução tampão no segundo poço. Após 1 minuto, 10 µL de sangue foram adicionados no primeiro poço e homogeneizados por 1 minuto. Em seguida, a tira-teste foi colocada verticalmente no primeiro poço, por 10 minutos e posteriormente colocada no segundo poço

também por 10 minutos. A tira teste foi então recolocada no suporte e os poços fechados e descartados. A leitura visual foi realizada após o término da reação. O teste foi considerado positivo quando foram visualizadas duas linhas (controle e teste) e negativo, quando somente a linha controle foi visualizada na membrana de nitrocelulose.

4.8 Estimativas dos custos diretos dos kits diagnósticos avaliados

Nesta análise, foram considerados unicamente os custos médicos diretos, pressupondo que não existe necessidade de investimento em infraestrutura e equipamentos quando os kits são realizados em centros de referência para a doença. A perspectiva adotada na análise foi a do SUS.

Custos diretos foram estimados pela técnica de microcusteio, que consiste na coleta e descrição detalhada dos recursos materiais e humanos relacionados a cada intervenção. Os seguintes itens foram incluídos nas estimativas realizadas: remuneração do profissional que realiza o teste, proporcional ao tempo gasto para coleta do material biológico e realização do ensaio; materiais de segurança (luvas e máscaras); materiais para coleta de sangue (álcool, algodão, agulha, seringa e tubo de sangue); materiais de consumo (ponteiras e lâmpadas de microscópio); manutenção de equipamentos (centrífuga, estufa, geladeira e microscópio de fluorescência) e calibração (pipetas). O **Quadro 4** apresenta de forma detalhada os itens cujos custos foram estimados para cada kit diagnóstico avaliado.

Como o custo de uma reação de ELISA ou RIFI pode variar em função do número de soros testados por placa/lâminas, para a estimativa de custo de uma reação levou-se em consideração a média de amostras avaliadas por dia na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) (sete amostras examinadas por dia, sendo uma positiva/dia) no ano de 2015 (Ronaldo Barbosa, informação pessoal, FUNED, 2016). Para o IT LEISH[®] foram realizadas duas estimativas de custo, considerando que o teste pode ser realizado em sangue capilar digital ou soro.

As fontes para estimativas dos custos foram: as empresas distribuidoras dos testes diagnósticos avaliados, para obtenção do preço unitário dos testes; a Lei nº 10.898 de 30 de dezembro de 2015, para obtenção do salário-base dos técnicos de laboratório da Prefeitura de Belo Horizonte (R\$ 1.767,07); o banco de preços em saúde do MS, para obtenção dos custos com materiais para coleta de sangue e materiais de segurança; o Serviço de Gestão da Qualidade, Biossegurança e Ambiente (SQBA) do CPqRR, para obtenção dos custos com calibração e manutenção de equipamentos e o Serviço de Contratos do CPqRR, para obtenção dos custos com materiais de consumo.

Para as estimativas de tempo de realização dos testes diagnósticos foram considerados o tempo gasto desde a coleta do material biológico até a liberação do resultado, assumindo que o teste foi a atividade exclusiva realizada pelo profissional de saúde durante aquele período. Assumiu-se também que o teste seria realizado no mesmo local de coleta do material biológico. Desta forma, nas estimativas realizadas não foram incluídos os custos relacionados a transporte de amostras biológicas, do local de coleta para os laboratórios que realizaram o teste.

Quadro 4 Detalhamento dos itens incluídos nas estimativas de custo direto dos kits diagnósticos avaliados.

Kits de diagnóstico	Itens incluídos
IFI Leishmaniose Humana	Preço unitário de um teste; remuneração do profissional de nível técnico referente ao tempo de coleta do material biológico e realização do teste; materiais para coleta de sangue (álcool, algodão e agulha, seringa, tubo de sangue, álcool); materiais de segurança (luvas e máscaras); materiais de consumo (ponteiras e lâmpada do microscópio); manutenção de equipamentos (centrífuga, geladeira, estufa e microscópio de fluorescência) e calibração (pipetas).
IT LEISH [®] em sangue capilar digital	Preço unitário de um teste; remuneração do profissional de nível técnico referente ao tempo de realização do teste e materiais de segurança (luva e máscara).
IT LEISH [®] em soro	Preço unitário de um teste; remuneração do profissional de nível técnico referente ao tempo de coleta do material biológico e realização do teste; materiais para coleta de sangue (álcool, algodão e agulha, seringa, tubo de sangue, álcool); materiais de segurança (luvas e máscaras); materiais de consumo (ponteiras) e manutenção de equipamento (centrífuga) e calibração (pipetas).
Kalazar Detect [™]	Preço unitário de um teste; remuneração do profissional de nível técnico referente ao tempo de coleta do material biológico e realização do teste; materiais para coleta de sangue (álcool, algodão e agulha, seringa, tubo de sangue, álcool); materiais de segurança (luvas e máscaras) e manutenção de equipamento (centrífuga) e calibração (pipetas).
<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	Preço unitário de um teste; remuneração do profissional de nível técnico referente ao tempo de coleta do material biológico e realização do teste; materiais para coleta de sangue (álcool, algodão, agulha, seringa e tubo de sangue); materiais de segurança (luvas e máscaras); materiais de consumo (ponteiras); manutenção de equipamentos (centrífuga, geladeira e estufa) e calibração (pipetas).
Ridascreen [®] <i>Leishmania</i> Ab	Preço unitário de um teste; remuneração do profissional de nível técnico referente ao tempo de coleta do material biológico e realização do teste; materiais para coleta de sangue (álcool, algodão, agulha, seringa e tubo de sangue); materiais de segurança (luvas e máscaras); materiais de consumo (ponteiras); manutenção de equipamentos (centrífuga e geladeira) e calibração (pipetas).
<i>Leishmania</i> IFA IgG	Preço unitário de um teste; remuneração do profissional de nível técnico referente ao tempo de coleta do material biológico e realização do teste; materiais para coleta de sangue (álcool, algodão, agulha, seringa e tubo de sangue); materiais de segurança (luvas e máscaras); materiais de consumo (ponteiras e lâmpada do microscópio), manutenção de equipamentos (centrífuga, geladeira, estufa e microscópio de fluorescência) e calibração (pipetas).
DAT-LPC	Preço unitário de um teste; remuneração do profissional de nível técnico referente ao tempo de coleta do material biológico e realização do teste; materiais para coleta de sangue (álcool, algodão e agulha, seringa, tubo de sangue, álcool); materiais de segurança (luvas e máscaras); materiais de consumo (ponteiras e microplaca de fundo V); manutenção de equipamentos (centrífuga e geladeira) e calibração (pipetas).

4.9 Análise de dados

Os resultados relacionados ao desempenho dos testes diagnósticos foram digitados em bancos de dados construídos no Microsoft Office Excel[®]. A avaliação de desempenho dos testes foi realizada com o auxílio do programa estatístico Epi-Info versão 6.04 (CDC, Atlanta, GA, USA), através do qual foram calculadas as taxas de sensibilidade, especificidade e seus respectivos intervalos de 95% de confiança, para cada um dos testes sorológicos. Já para o cálculo de acurácia diagnóstica e de seu intervalo de 95% de confiança, foi utilizado o programa OpenEpi versão 3.01.

O teste qui-quadrado foi utilizado para comparação das taxas de sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica, entre os testes diagnósticos avaliados, considerando nível de significância de 5%. Diferenças estatisticamente significativa não foram adicionadas aos resultados da avaliação de desempenho em pacientes portadores de infecção pelo HIV, devido ao menor tamanho amostral utilizado neste grupo, que acarretou uma redução do poder da análise.

A concordância dos testes sorológicos foi calculada através do Índice *Kappa* também utilizando o Epi-Info versão 6.04. A interpretação de acordo com a escala de Shrout (1998), está demonstrada no **Quadro 5**.

Quadro 5 Interpretação de índice *Kappa* de acordo com Shrout (1998).

Índice <i>Kappa</i>	Concordância
<0,1	Ausente
0,10- 0,40	Fraca
0,41-0,60	Discreta
0,61-0,80	Moderada
0,81-1,0	Substancial

4.10 Aspectos éticos

O presente projeto, seguiu todas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, para salvaguardar os direitos e o bem-estar das pessoas estudadas, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqRR/Fiocruz, através do CAEE 44549915.2.0000.5091 (parecer 1.808.889).

As amostras de soros de pacientes, utilizadas neste estudo são provenientes de dois projetos que haviam sido previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqRR/Fiocruz. O projeto “Validação de teste rápido para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana” através do parecer nº13/2003 e o projeto “Intensidade de infecção, persistência parasitária e perfil imune como preditores de evolução clínica de leishmaniose visceral entre pacientes infectados ou não pelo HIV”, através do CAEE 0021.0.438.438-10.

5 RESULTADOS

5.1 Desempenho dos testes diagnósticos avaliados

Na análise global dos testes avaliados, a sensibilidade variou de 72,9% (IC95%: 63,8 – 80,5%) a 92,4% (IC95%: 85,6 – 96,2%), sendo o *Leishmania* IFA IgG e o DAT-LPC, os testes que apresentaram menor e maior sensibilidade, respectivamente. O *Leishmania* ELISA IgG+IgM, apresentou sensibilidade de 75%, Kalazar Detect™ e IFI Leishmaniose Humana de 78%, IT LEISH® de 85,6% e o Ridascreen® *Leishmania* Ab 90,5%. Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi observada entre a sensibilidade dos seguintes testes: DAT-LPC × IFI Leishmaniose Humana, Kalazar Detect™, *Leishmania* ELISA IgG+IgM e *Leishmania* IFA IgG; IT LEISH® × *Leishmania* ELISA IgG+IgM e *Leishmania* IFA IgG; Ridascreen® *Leishmania* Ab × IFI Leishmaniose Humana; Kalazar Detect™, *Leishmania* ELISA IgG+IgM e *Leishmania* IFA IgG (**Tabela 1**).

Com relação à especificidade global, o IT LEISH® foi o teste mais específico, com 96,6% (IC95%: 91,1 – 98,9%) e o Ridascreen® *Leishmania* Ab o menos específico, com 80,5% (IC95%: 72,0 – 87,0%). O Kalazar Detect™, apresentou 95,8% de especificidade, o DAT-LPC e o *Leishmania* IFA IgG 95%, o *Leishmania* ELISA IgG+IgM 94,9% e o IFI Leishmaniose Humana 84,9%. Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi observada entre a IFI Leishmaniose Humana × todos os testes avaliados, com exceção do Ridascreen® *Leishmania* Ab e Ridascreen® *Leishmania* Ab × todos os testes, com exceção da IFI Leishmaniose Humana (**Tabela 1**).

Os testes que apresentaram melhor acurácia diagnóstica, na análise global dos pacientes foram o DAT-LPC (93,7%) e o IT LEISH® (91,1%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi observada entre a acurácia dos seguintes testes: IT LEISH® × IFI Leishmaniose Humana, *Leishmania* ELISA IgG+IgM e *Leishmania* IFA IgG; DAT-LPC × IFI Leishmaniose Humana, Kalazar Detect™, *Leishmania* ELISA IgG+IgM, Ridascreen® *Leishmania* Ab e *Leishmania* IFA IgG (**Tabela 1**).

Tabela 1 Sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica de kits diagnósticos disponíveis comercialmente para leishmaniose visceral humana no Brasil.

Testes diagnósticos	Sensibilidade ^a (%) IC 95% (n=118)	Especificidade ^b (%) IC 95% (n=119)	Acurácia ^c (%) IC 95% (n=237)
IFI Leishmaniose Humana	78,0 (69,2 – 84,9)	84,9 (76,9 – 90,5)	81,4 (76,9 – 85,9)
IT LEISH	85,6 (77,7 – 91,1)	96,6 (91,1 – 98,9)	91,1 (86,8 – 94,1)
Kalazar Detect™	78,0 (69,2 – 84,9)	95,8 (90,0 – 98,4)	86,9 (82,0 – 90,6)
<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	75,0 (65,8 – 82,5)	94,9 (88,8 – 97,9)	85,2 (80,1 – 89,2)
Ridascreen® <i>Leishmania</i> Ab	90,5 (83,3 – 94,9)	80,5 (72,0 – 87,0)	85,5 (80,4 – 89,4)
<i>Leishmania</i> IFA IgG	72,9 (63,8 – 80,5)	95,0 (88,9 – 97,9)	84,0 (78,8 – 88,1)
DAT – LPC*	92,4 (85,6 – 96,2)	95,0 (88,9 – 97,9)	93,7 (89,8 – 96,1)

Legenda: *Ainda não disponível comercialmente no Brasil – protótipo.

^a diferença estatisticamente significativa entre as sensibilidades: IT LEISH® × *Leishmania* ELISA IgG+IgM (p=0,043), *Leishmania* IFA IgG (p=0,016); Ridascreen® *Leishmania* Ab × IFI Leishmaniose Humana (p=0,009), Kalazar Detect™ (p=0,009), *Leishmania* ELISA IgG+IgM (p=0,002), *Leishmania* IFA IgG (p<0,001); DAT-LPC × IFI Leishmaniose Humana (p=0,002), Kalazar Detect™ (p= 0,002), *Leishmania* ELISA IgG+IgM (p<0,001), *Leishmania* IFA IgG (p<0,001).

^b diferença estatisticamente entre as especificidades: IFI Leishmaniose Humana × IT LEISH® (p=0,002), Kalazar Detect™ (p=0,004), *Leishmania* ELISA IgG+IgM (p=0,010), *Leishmania* IFA IgG (p=0,010), DAT-LPC (p=0,010); Ridascreen® *Leishmania* Ab × IT LEISH® (p<0,001), Kalazar Detect™ (p<0,001), *Leishmania* ELISA IgG+IgM (p<0,001), *Leishmania* IFA IgG (p<0,001), DAT-LPC (p<0,001).

^c diferença estatisticamente significativa entre as acurácias: IT LEISH® × IFI Leishmaniose Humana (p=0,002), *Leishmania* ELISA IgG+IgM (p=0,047), *Leishmania* IFA IgG (p=0,018); DAT-LPC × IFI Leishmaniose Humana (p<0,001), Kalazar Detect™ (p=0,013), *Leishmania* ELISA IgG+IgM (p=0,003), Ridascreen® *Leishmania* Ab (p=0,004), *Leishmania* IFA IgG (p<0,001).

Para os pacientes não portadores de infecção pelo HIV, a sensibilidade dos testes variou de 78,8% (IC95%: 67,9 - 86,8%) a 96,3% (IC95%: 88,7 – 99,0%), sendo o *Leishmania* IFA IgG e o IT LEISH® aqueles que apresentaram menor e maior sensibilidade, respectivamente. Os testes Ridascreen® *Leishmania* Ab, DAT-LPC, Kalazar Detect™, IFI Leishmaniose Humana e o *Leishmania* ELISA IgG+IgM apresentaram valores de sensibilidades de 96,2%, 93,8%, 92,5%, 86,3% e 80%, respectivamente. Diferença estatisticamente significativa (p≤0,05) foi observada entre a sensibilidade dos seguintes testes: IFI Leishmaniose Humana × IT LEISH® e Ridascreen® *Leishmania* Ab; *Leishmania* ELISA IgG+IgM × IT LEISH®, Kalazar Detect™, DAT-LPC e Ridascreen® *Leishmania* Ab; *Leishmania* IFA IgG × IT LEISH®, Kalazar Detect™ e DAT-LPC (**Tabela 2**).

Com relação à especificidade dos kits nos pacientes não portadores de infecção pelo HIV, o DAT-LPC foi o teste mais específico, com 97,5% (IC95%: 90,4 - 99,6%) e o Ridascreen® *Leishmania* Ab o menos específico, com 75,9% (IC95%: 64,8 - 84,6%). O IT LEISH® e o *Leishmania* IFA IgG, apresentaram 96,3% de especificidade, o Kalazar Detect™ 95% e o *Leishmania* ELISA IgG+IgM 93,7%. Já a especificidade da IFI Leishmaniose

Humana foi de 82,5%. Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi observada entre a especificidade dos seguintes testes: IFI Leishmaniose Humana \times todos os testes avaliados, com exceção do Ridascreen[®] *Leishmania* Ab e Ridascreen[®] *Leishmania* Ab \times todos os testes, com exceção da IFI Leishmaniose Humana, conforme mencionado anteriormente (**Tabela 2**).

O teste que apresentou melhor acurácia diagnóstica para pacientes não portadores de HIV foi o IT LEISH[®] (96,3%), seguido pelo DAT-LPC (95,6%) e pelo Kalazar Detect[™] (93,8%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi observada entre a acurácia dos seguintes testes: IT LEISH[®] \times IFI Leishmaniose Humana, *Leishmania* ELISA IgG+IgM, Ridascreen[®] *Leishmania* Ab e *Leishmania* IFA IgG; DAT-LPC \times IFI Leishmaniose Humana, *Leishmania* ELISA IgG+IgM, Ridascreen[®] *Leishmania* Ab e *Leishmania* IFA IgG; Kalazar Detect[™] \times IFI Leishmaniose Humana, *Leishmania* ELISA IgG+IgM e Ridascreen[®] *Leishmania* Ab (**Tabela 2**).

Para os pacientes portadores de infecção pelo HIV a sensibilidade dos testes variou de 47,4% (IC95%: 31,3 – 64,0%) a 89,5% (IC95%: 74,3 – 96,6%), sendo o Kalazar Detect[™] e o DAT-LPC os testes que apresentaram menor e maior sensibilidade, respectivamente. O Ridascreen[®] *Leishmania* Ab, apresentou sensibilidade de 78,9%, o *Leishmania* ELISA IgG+IgM, de 64,9% e o IT LEISH[®] de 63,2%, já a IFI Leishmaniose Humana e *Leishmania* IFA IgG de 60,5% (**Tabela 2**).

Com relação à especificidade dos kits em portadores da infecção pelo HIV, o IT LEISH[®], Kalazar Detect[™] e *Leishmania* ELISA IgG+IgM, foram os mais específicos, com 97,4% (IC95%: 84,9 - 99,9%). Já o teste *Leishmania* IFA IgG apresentou especificidade de 92,3% (IC95%: 78,0 - 98,0%) e os testes, IFI Leishmaniose Humana, Ridascreen[®] *Leishmania* Ab e DAT-LPC, 89,7% (IC95%: 74,8 - 96,7%) (**Tabela 2**).

A melhor acurácia diagnóstica, em portadores da infecção pelo HIV, foi apresentada pelo DAT-LPC (89,6%), seguida pelo Ridascreen[®] *Leishmania* Ab (84,4%), *Leishmania* ELISA IgG+IgM (81,6%) e IT LEISH[®] (80,5%) (**Tabela 2**).

Importante ressaltar que, na análise de desempenho dos testes *Leishmania* ELISA IgG+IgM e Ridascreen[®] *Leishmania* Ab, foram excluídos sete e três pacientes, respectivamente, que apresentaram resultado classificado como duvidoso. Dos sete pacientes excluídos na análise do *Leishmania* ELISA IgG+IgM, um era portador da infecção pelo HIV, já para o Ridascreen[®] *Leishmania* Ab, os três pacientes excluídos eram não portadores da infecção pelo HIV.

Tabela 2 Sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica de kits diagnósticos disponíveis comercialmente para leishmaniose visceral humana no Brasil, estratificada para pacientes não portadores e portadores de infecção pelo HIV.

Testes diagnósticos	Não portadores de infecção pelo HIV			Portadores de infecção pelo HIV		
	Sensibilidade ^a (%) IC 95% (n=80)	Especificidade ^b (%) IC 95% (n=80)	Acurácia ^c (%) IC 95% (n=160)	Sensibilidade(%) IC 95% (n=38)	Especificidade (%) IC 95% (n=39)	Acurácia (%) IC 95% (n=77)
IFI Leishmaniose Humana	86,3 (76,3 - 92,6)	82,5 (72,0 - 89,8)	84,4 (78,0 - 89,2)	60,5 (43,4 - 75,5)	89,7 (74,8 - 96,7)	75,3 (64,7 - 83,7)
IT LEISH[®]	96,3 (88,7 - 99,0)	96,3 (88,7 - 99,0)	96,3 (92,1 - 98,3)	63,2 (46,0 - 77,7)	97,4 (84,9 - 99,9)	80,5 (70,3 - 87,8)
Kalazar Detect[™]	92,5 (83,8 - 96,9)	95,0 (87,0 - 98,4)	93,8 (88,9 - 96,6)	47,4 (31,3 - 64,0)	97,4 (84,9 - 99,9)	72,7 (61,9 - 81,4)
Leishmania ELISA IgG+IgM	80,0 (68,9 - 88,0)	93,7 (85,2 - 97,6)	87,0 (80,8 - 91,4)	64,9 (47,4 - 79,3)	97,4 (84,9 - 99,9)	81,6 (71,4 - 88,7)
Ridascreen[®] Leishmania Ab	96,2 (88,4 - 99,0)	75,9 (64,8 - 84,6)	86,0 (79,7 - 90,6)	78,9 (62,2 - 89,9)	89,7 (74,8 - 96,7)	84,4 (74,7 - 90,9)
Leishmania IFA IgG	78,8 (67,9 - 86,8)	96,3 (88,7 - 99,0)	87,5 (81,5 - 91,8)	60,5 (43,4 - 75,5)	92,3 (78,0 - 98,0)	76,6 (66,1 - 84,7)
DAT – LPC*	93,8 (85,4 - 97,7)	97,5 (90,4 - 99,6)	95,6 (91,3 - 97,9)	89,5 (74,3 - 96,6)	89,7 (74,8 - 96,7)	89,6 (80,8 - 94,6)

Legenda: Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV); *Ainda não disponível comercialmente no Brasil – protótipo.

^a diferença estatisticamente significativa para os pacientes não portadores de infecção pelo HIV, entre as sensibilidades: IFI Leishmaniose Humana × IT LEISH[®] (p=0,025), Ridascreen[®] Leishmania Ab (p=0,029); IT LEISH[®] × Leishmania ELISA IgG+IgM (p=0,002), Leishmania IFA IgG (p=0,001); Kalazar Detect[™] × Leishmania ELISA IgG+IgM (p= 0,023), Leishmania IFA IgG (p=0,013); Leishmania ELISA IgG+IgM × Ridascreen[®] Leishmania Ab (p=0,002), DAT-LPC (p=0,011); Ridascreen[®] Leishmania Ab × Leishmania IFA IgG (p=0,001); Leishmania IFA IgG × DAT-LPC (p=0,006).

^b diferença estatisticamente significativa para os pacientes não portadores de infecção pelo HIV, entre as especificidades: IFI Leishmaniose Humana × IT LEISH[®] (p= 0,005), Kalazar Detect[™] (p=0,012), Leishmania ELISA IgG+IgM (p=0,030), Leishmania IFA IgG (p=0,005), DAT-LPC (p=0,002); IT LEISH[®] × Ridascreen[®] Leishmania Ab (p<0,001); Kalazar Detect[™] × Ridascreen[®] Leishmania Ab (p=0,001); Leishmania ELISA IgG+IgM × Ridascreen[®] Leishmania Ab (p=0,002); Ridascreen[®] Leishmania Ab × Leishmania IFA IgG (p<0,001), DAT-LPC(p<0,001).

^c diferença estatisticamente significativa para os pacientes não portadores de infecção pelo HIV, entre as acurácias: IFI Leishmaniose Humana × IT LEISH[®] (p<0,001), Kalazar Detect[™] (p=0,007), DAT-LPC (p=0,001); Leishmania ELISA IgG+IgM × IT LEISH[®] (p= 0,003), Kalazar Detect[™] (p= 0,042), DAT-LPC(p=0,007); Ridascreen[®] Leishmania Ab × IT LEISH[®] (p=0,001), Kalazar Detect[™] (p=0,022), DAT-LPC (p=0,003); Leishmania IFA IgG × IT LEISH[®] (p=0,004), DAT-LPC (p=0,009).

5.2 Concordância entre os testes diagnósticos avaliados

Na análise global, a concordância entre os testes diagnósticos variou de 0,57 (IC95%: 0,51 - 0,64) a 0,84 (IC95%: 0,78 - 0,91). A menor concordância (0,57), classificada como discreta, foi obtida ao se comparar as duas RIFIs (IFI Leishmaniose Humana e *Leishmania* IFA IgG) e a maior concordância (0,84), classificada como substancial, foi observada entre os dois testes rápidos avaliados (IT LEISH[®] e Kalazar Detect[™]) (**Tabela 3**).

Em pacientes não portadores de infecção pelo HIV, a concordância dos testes diagnósticos variou de 0,54 (IC95%: 0,39 - 0,70) a 0,90 (IC95%: 0,74 – 1,06). Assim como observado na análise global, a menor concordância (0,54), classificada como discreta, foi obtida ao se comparar as duas RIFIs (IFI Leishmaniose Humana e *Leishmania* IFA IgG) e a maior concordância (0,90), classificada como substancial, também foi observada entre os dois testes rápidos (IT LEISH[®] e Kalazar Detect[™]) (**Tabela 3**).

Em relação aos pacientes portadores de HIV, a concordância entre os testes diagnósticos variou de 0,45 (IC95%: 0,25 - 0,65) a 0,79 (IC95%: 0,56 – 1,02). A comparação entre Kalazar Detect[™] e o DAT-LPC, foi a que apresentou a menor concordância (0,45), sendo esta classificada como discreta. Já a comparação entre *Leishmania* ELISA IgG+IgM com o *Leishmania* IFA IgG e entre DAT-LPC e o Ridascreen[®] *Leishmania* Ab, foi a que apresentou maior concordância (0,79), sendo classificada como moderada (**Tabela 3**).

Tabela 3 Análise de concordância dos kits diagnósticos disponíveis comercialmente para leishmaniose visceral humana no Brasil.

Testes diagnósticos		Análise global	Análise estratificada	
			Não portadores de HIV	Portadores de HIV
		Índice <i>Kappa</i> IC 95%	Índice <i>Kappa</i> IC 95%	Índice <i>Kappa</i> IC 95%
IFI Leishmaniose Humana	IT LEISH [®]	0,67 (0,60 - 0,73)	0,69 (0,53 - 0,85)	0,59 (0,37 - 0,82)
	Kalazar Detect [™]	0,63 (0,57 - 0,70)	0,64 (0,48 - 0,80)	0,57 (0,37 - 0,77)
	<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	0,61 (0,54 - 0,67)	0,56 (0,40 - 0,72)	0,71 (0,48 - 0,94)
	Ridascreen [®] <i>Leishmania</i> Ab	0,62 (0,55 - 0,68)	0,64 (0,48 - 0,80)	0,54 (0,32 - 0,77)
	<i>Leishmania</i> IFA IgG	0,57 (0,51 - 0,64)	0,54 (0,39 - 0,70)	0,63 (0,40 - 0,85)
	DAT - LPC	0,60 (0,54 - 0,67)	0,62 (0,47 - 0,78)	0,56 (0,34 - 0,78)
IT LEISH [®]	Kalazar Detect [™]	0,84 (0,78 - 0,91)	0,90 (0,74 - 1,06)	0,68 (0,46 - 0,91)
	<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	0,73 (0,67 - 0,80)	0,74 (0,58 - 0,90)	0,70 (0,47 - 0,93)
	Ridascreen [®] <i>Leishmania</i> Ab	0,72 (0,66 - 0,78)	0,72 (0,56 - 0,88)	0,70 (0,48 - 0,92)
	<i>Leishmania</i> IFA IgG	0,73 (0,67 - 0,80)	0,75 (0,59 - 0,91)	0,70 (0,47 - 0,93)
	DAT - LPC	0,80 (0,73 - 0,86)	0,86 (0,70 - 1,02)	0,66 (0,45 - 0,88)
Kalazar Detect [™]	<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	0,73 (0,66 - 0,79)	0,77 (0,61 - 0,92)	0,62 (0,39 - 0,84)
	Ridascreen [®] <i>Leishmania</i> Ab	0,64 (0,58 - 0,70)	0,67 (0,82 - 0,83)	0,53 (0,32 - 0,74)
	<i>Leishmania</i> IFA IgG	0,71 (0,64 - 0,77)	0,75 (0,59 - 0,91)	0,60 (0,37 - 0,82)
	DAT - LPC	0,69 (0,63 - 0,76)	0,81 (0,62 - 0,97)	0,45 (0,25 - 0,65)
<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	Ridascreen [®] <i>Leishmania</i> Ab	0,68 (0,62 - 0,74)	0,63 (0,47 - 0,78)	0,78 (0,56 - 1,00)
	<i>Leishmania</i> IFA IgG	0,80 (0,73 - 0,86)	0,80 (0,64 - 0,96)	0,79 (0,56 - 1,02)
	DAT - LPC	0,73 (0,66 - 0,79)	0,75 (0,59 - 0,91)	0,68 (0,46 - 0,90)
Ridascreen [®] <i>Leishmania</i> Ab	<i>Leishmania</i> IFA IgG	0,66 (0,59 - 0,72)	0,62 (0,47 - 0,77)	0,73 (0,51 - 0,95)
	DAT - LPC	0,74 (0,67 - 0,80)	0,71 (0,56 - 0,86)	0,79 (0,57 - 1,02)
DAT - LPC	<i>Leishmania</i> IFA IgG	0,72 (0,66 - 0,78)	0,76 (0,60 - 0,92)	0,64 (0,42 - 0,85)

Legenda: Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

5.3 Custo dos testes diagnósticos

O custo direto dos testes avaliados variou de R\$ 15,47 (DAT-LPC) a R\$ 56,10 (*Leishmania* IFA IgG) (diferença de 72,4%). O menor custo, que foi apresentado pelo DAT-LPC está principalmente relacionado ao custo de uma reação, estimado em R\$ 2,09 (Tabela 4).

Em relação às RIFIs, o custo do diagnóstico por paciente, utilizando o *Leishmania* IFA IgG (Vircell S. L.) foi de R\$ 56,10 e utilizando a IFI Leishmaniose Humana (Bio-Manguinhos) foi de R\$ 34,11. A diferença observada entre os testes (R\$ 21,99) está relacionada principalmente ao custo de uma reação (diferença de 94,4%) do teste produzido pela Vircell S. L em relação ao teste produzido por Bio-Manguinhos (R\$ 27,00 × R\$ 1,51/uma reação) (Tabela 4). Importante destacar que o tempo gasto para realização do *Leishmania* IFA IgG é ligeiramente menor (141 minutos × 160 minutos) que o tempo necessário à realização da IFI Leishmaniose Humana, pois além das lâminas do *Leishmania*

IFA IgG já virem sensibilizadas, os reagentes necessários também já se encontram prontos para uso (**Tabela 5**).

Entre os testes imunocromatográficos, o custo do diagnóstico por paciente, utilizando o Kalazar Detect™ foi de R\$ 22,34, utilizando o IT LEISH® com sangue capilar digital foi de R\$ 26,82 e com soro foi de R\$ 32,27 (**Tabela 4**). A diferença observada (R\$ 9,93) entre o Kalazar Detect™ e o IT LEISH® com soro, está relacionada principalmente ao custo de uma reação (R\$ 11,82 × R\$ 20,83).

Comparando os ELISAs, o custo do diagnóstico por paciente, utilizando o *Leishmania* ELISA IgG+IgM (Vircell S. L.) foi de R\$ 54,47 e utilizando o Ridascreen® *Leishmania* Ab (R-Biopharm AG) foi de R\$ 41,57. A diferença de R\$ 12,90 entre o custo direto destes testes está relacionada principalmente ao custo com a remuneração do técnico de laboratório (diferença de 35,9%), que ocorre devido ao maior tempo (156 minutos × 100 minutos) necessário para realização do teste produzido pela Vircell S. L. em relação ao teste produzido pela R-Biopharm AG (**Tabela 5**).

Em relação ao tempo médio gasto para realização dos testes, o IT LEISH® quando realizado em sangue capilar digital, foi o teste capaz de fornecer resultado em menor tempo (30 minutos), seguindo do Kalazar Detect™ (46 minutos), do DAT-LPC (50 minutos) e do IT LEISH® em soro (51 minutos) (**Tabela 5**).

Tabela 4 Itens incluídos nas estimativas de custos diretos dos testes diagnósticos.

Teste diagnóstico	Itens incluídos na estimativa de custo	Valor (R\$)	Fonte da informação
IFI Leishmaniose Humana	Um teste	1,51	Ronaldo Barbosa, informação pessoal, Fundação Ezequiel Dias, 2017
	Coleta de material biológico	0,81	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Remuneração do técnico de laboratório	29,45	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, MG (lei nº 10.898 de 30/12/2015)
	Materiais de segurança	0,94	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Materiais de consumo	0,55	Serviço de Contratos CPqRR/Fiocuz
	Manutenção de equipamentos e calibração	0,85	Serviço de Qualidade, Biossegurança e Ambiente CPqRR/Fiocuz
	Total	34,11	
IT LEISH® em sangue capilar digital	Um teste	20,83	BIO-RAD Laboratories, Inc.
	Remuneração do técnico de laboratório	5,52	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, MG (lei nº 10.898 de 30/12/2015)
	Materiais de segurança	0,47	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Total	26,82	
IT LEISH® em soro	Um teste	20,83	BIO-RAD Laboratories, Inc.
	Coleta de material biológico	0,81	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Remuneração do técnico de laboratório	9,39	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, MG (lei nº 10.898 de 30/12/2015)
	Materiais de segurança	0,94	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Materiais de consumo	0,03	Serviço de Contratos CPqRR/Fiocuz
	Manutenção de equipamentos e calibração	0,27	Serviço de Qualidade, Biossegurança e Ambiente CPqRR/Fiocuz
	Total	32,27	
Kalazar Detect™	Um teste	11,82	Inbios International, Inc.
	Coleta de material biológico	0,81	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Remuneração do técnico de laboratório	8,47	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, MG (lei nº 10.898 de 30/12/2015))
	Materiais de segurança	0,94	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Materiais de consumo	0,03	Serviço de Contratos CPqRR/Fiocuz
	Manutenção de equipamentos e calibração	0,27	Serviço de Qualidade, Biossegurança e Ambiente CPqRR/Fiocuz
	Total	22,34	
Leishmania ELISA IgG+IgM	Um teste	22,38	Virion Diagnostica Ltda
	Coleta de material biológico	0,81	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Remuneração do técnico de laboratório	28,71	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, MG (lei nº 10.898 de 30/12/2015)
	Materiais de segurança	0,94	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Materiais de consumo	0,86	Serviço de Contratos CPqRR/Fiocuz
	Manutenção de equipamentos e calibração	0,77	Serviço de Qualidade, Biossegurança e Ambiente CPqRR/Fiocuz
Total	54,47		
Ridascreen® Leishmania Ab	Um teste	20,01	Alka® tecnologia

	Coleta de material biológico	0,81	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Remuneração do técnico de laboratório	18,41	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, MG (lei nº 10.898 de 30/12/2015)
	Materiais de segurança	0,94	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Materiais de consumo	0,86	Serviço de Contratos CPqRR/Fiocuz
	Manutenção de equipamentos e calibração	0,54	Serviço de Qualidade, Biossegurança e Ambiente CPqRR/Fiocuz
	Total	41,57	
<i>Leishmania</i> IFA IgG	Um teste	27,00	Virion Diagnostica Ltda
	Coleta de material biológico	0,81	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Remuneração do técnico de laboratório	25,95	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, MG (lei nº 10.898 de 30/12/2015)
	Materiais de segurança	0,94	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Materiais de consumo	0,55	Serviço de Contratos CPqRR/Fiocuz
	Manutenção de equipamentos e calibração	0,85	Serviço de Qualidade, Biossegurança e Ambiente CPqRR/Fiocuz
	Total	56,10	
DAT - LPC	Um teste	2,09	Edward Oliveira, informação pessoal, CPqRR/Fiocruz, 2017
	Coleta de material biológico	0,81	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Remuneração do técnico de laboratório	9,20	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, MG (lei nº 10.898 de 30/12/2015)
	Materiais de segurança	0,94	Banco de Preços em Saúde, Ministério da Saúde
	Materiais de consumo	1,89	Serviço de Contratos CPqRR/Fiocuz
	Manutenção de equipamentos e calibração	0,54	Serviço de Qualidade, Biossegurança e Ambiente CPqRR/Fiocuz
	Total	15,47	

Legenda: Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR); Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); Minas Gerais (MG).

Tabela 5 Custo direto e tempo para realização dos testes em centro de referência para leishmanioses.

Teste diagnóstico	Custo direto de um teste (R\$)	Tempo para coleta e processamento do material biológico, em minutos	Tempo total para realização do teste, em minutos*
IFI Leishmaniose Humana	34,11	30	160
IT LEISH® em sangue capilar digital	26,82	2	30
IT LEISH® em soro	32,27	30	51
Kalazar Detect™	22,34	30	46
<i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM	54,47	30	156
Ridascreen® <i>Leishmania</i> Ab	41,57	30	100
<i>Leishmania</i> IFA IgG	56,10	30	141
DAT – LPC	15,47	30	50

Legenda: *Tempo desde a coleta e processamento do material biológico até a conclusão do teste diagnóstico

6 DISCUSSÃO

Testes diagnósticos com elevado desempenho, simplicidade de uso e baixo custo, que possibilitem um amplo acesso e diagnóstico acertado, são de extrema importância para o tratamento precoce dos pacientes e consequente redução da letalidade da LV humana no Brasil. Entretanto, o arsenal diagnóstico disponível para esta doença é restrito, o que dificulta a assistência eficiente aos pacientes nos serviços de saúde, especialmente em áreas remotas.

O limitado investimento no desenvolvimento de novas alternativas diagnósticas, medicamentos e programas de controle para LV, provavelmente está relacionado à população frequentemente afetada por essa doença, em geral, populações pobres, de países com desenvolvimento social e econômico precário (Bern, Maguire e Alvar, 2008; WHO, 2010; Hotez et al., 2016). A LV, assim como outras doenças denominadas “doenças tropicais negligenciadas”, que afetam principalmente populações de baixa renda, não representam mercado atrativo para o investimento das indústrias, contribuindo para perpetuação do ciclo da pobreza (DNDi, 2014).

Carvalho et al. (2015), avaliaram a proteção patentária relacionada às leishmanioses no Brasil entre 2008 a 2012 e identificaram apenas 184 aplicações técnicas protegidas, sendo a maioria relacionada ao tratamento (31%) e apenas 8% (14/184) relacionadas exclusivamente ao diagnóstico. Os autores destacam a pequena atividade inventiva no período e a necessidade de que em médio prazo, as tecnologias identificadas tenham sofrido suficiente validação para tornarem-se inovações disponíveis aos pacientes acometidos por estas doenças.

O pequeno número de inovações tecnológicas mencionado por Carvalho et al. (2015) para o diagnóstico das leishmanioses, é reforçado e se comprova pelos poucos testes diagnósticos para as leishmanioses registrados na ANVISA até dezembro de 2016. Nesta data, nove testes apresentavam registro vigente, sendo apenas seis de fato, comercializados no Brasil.

Importante ressaltar que a busca de registro de produtos para a saúde na base de dados da ANVISA é limitada pelo uso de palavras-chave, o que pode acarretar viés de seleção, caso o nome do produto não contiver as palavras definidas na estratégia de busca. Este viés gerado poderia ser evitado caso o banco de dados permitisse a realização de buscas por doenças. Assim, é necessário o aperfeiçoamento do mecanismo de busca de produtos para saúde registrados no Brasil.

Além de poucos kits disponíveis comercialmente para as leishmanioses no Brasil, chamou a atenção que a maioria deles (quatro kits) não tinha seu desempenho avaliado no

país. Foram encontradas publicações científicas de avaliação de desempenho apenas para a IFI Leishmaniose Humana e para o teste rápido IT LEISH[®] (Machado de Assis et al., 2008, 2011, 2012; Pedras et al., 2008; Amato et al., 2009; Cunningham et al., 2012; Peruhype-Magalhães et al., 2012; Cota et al., 2013). Mesmo para estes testes diagnósticos, a maioria dos estudos avaliaram pacientes imunocompetentes, sendo ainda mais limitados estudos avaliando populações específicas, como pacientes portadores de HIV e crianças. Para fomentar pesquisas no campo do diagnóstico das leishmanioses em grupos específicos, seria apropriado o MS abrir editais de financiamento para realização destes estudos.

Os testes diagnósticos disponíveis comercialmente no Brasil, mesmo sem comprovação de desempenho no país, são utilizados principalmente por laboratórios privados de análises clínicas. O Ridascreen[®] *Leishmania* Ab, por exemplo, é um ensaio imunoenzimático utilizado pelo laboratório particular Hermes Pardini, Belo Horizonte, Minas Gerais (Carolina Rodrigues, informação pessoal, Alka Tecnologia[®], 2016), o *Leishmania* ELISA IgG+IgM e o *Leishmania* IFA IgG são utilizados pelo Diagnóstico das Américas S.A. (DASA), Barueri, São Paulo e pelo laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo (Alessandra Taveira, informação pessoal, Virion Diagnóstica Ltda, 2016). Mesmo não sendo disponibilizado pelo SUS, o *Leishmania* ELISA IgG+IgM, é também utilizado pela FUNED, Belo Horizonte, Minas Gerais, para o diagnóstico de pacientes com suspeita de LV (Ronaldo Barbosa, informação pessoal, FUNED, 2016).

É indispensável a existência de estudos de validação no Brasil, antes da incorporação de testes diagnósticos na rotina de laboratórios particulares e públicos, visto a importância do correto diagnóstico para o tratamento e redução da letalidade da LV e dada conhecida diferença de desempenho de testes entre regiões endêmicas. Uma explicação para a existência de testes diagnósticos para LV não avaliados ou insuficientemente avaliados, pode estar na RDC nº36, de 26 de agosto de 2015, que regulamenta o registro de PDIV no país. Apesar da legislação exigir estudo de desempenho tanto no dossiê técnico de registro do produto, como no manual de instrução, observa-se que os requisitos solicitados são superficiais e pouco específicos.

A fragilidade desta resolução é verificada, por exemplo, nos manuais de instrução dos kits *Leishmania* IFA IgG, *Leishmania* ELISA IgG+IgM e RIDASCREEN[®] *Leishmania* Ab, que apresentam informações de desempenho insuficientes. Em alguns casos, são também observados viés de amostragem e de mensuração. Já no manual de instrução do IFI Leishmaniose Humana é verificado o total descumprimento da referida resolução, visto que

não é informado nenhum estudo de avaliação de desempenho deste teste. Seria importante que a referida resolução fosse cumprida e exigisse estudo realizado no país, seguindo recomendações como QUADAS (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies) e STARD (Standards for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy).

O desempenho dos testes diagnósticos apresentado neste estudo deve ser interpretado com cautela, de acordo com a realidade de cada serviço de saúde. A análise global apresenta o desempenho do teste diagnóstico quando o clínico toma a decisão sem conhecimento da presença ou não de infecção pelo HIV. Esta análise é relevante, pois, no Brasil 59% dos casos de coinfeção LV/HIV desconheciam seu status imunológico, antes de ser diagnosticado com LV (Brasil, 2015c). No entanto, é importante destacar que neste estudo 32,8% dos pacientes avaliados eram portadores de infecção pelo HIV, sendo esta porcentagem superior aos 9,2% de coinfeção LV/HIV, relatados no país (Brasil, 2017). Desta forma, o desempenho dos testes na análise global pode estar subestimado.

Como mencionado anteriormente, estudos avaliando o desempenho dos testes diagnósticos, em geral, se restringem a pacientes não infectados por HIV, sendo poucos os estudos que avaliam pacientes infectados por HIV.

Horst et al. (2009), em estudo realizado na Etiópia, avaliaram o desempenho do IT LEISH[®] e do DAT-KIT em 153 pacientes com diagnóstico positivo para LV, confirmado através de aspirado esplênico. Destes pacientes, 128 foram submetidos ao teste de HIV e 34,4% (44/128) foram HIV positivo. A sensibilidade do IT LEISH[®] e do DAT-KIT, na análise global foi de 84,3% (129/153) e 94,1% (144/153); para os pacientes não portadores de infecção pelo HIV foi de 86,9% (73/84) e 95,2% (80/84) e para os pacientes infectados pelo HIV foi de 77,3% (34/44) e 88,6% (39/44), respectivamente. No presente estudo, o IT LEISH[®] e o DAT-LPC apresentaram semelhante sensibilidade na análise global (85,6% e 92,4%, respectivamente) e na análise estratificada para pacientes infectados pelo HIV (63,2% e 89,5%, respectivamente). Para pacientes não infectados pelo HIV, o DAT-LPC também apresentou sensibilidade semelhante ao DAT-KIT (93,8%), já o IT LEISH[®], apresentou maior sensibilidade no presente estudo (96,3%). Em relação à especificidade, no estudo de Horst et al. (2009) foram avaliados 130 pacientes clinicamente suspeitos de LV negativos pelo DAT-KIT. Nestes pacientes, o IT LEISH[®] apresentou especificidade de 91,5% (119/130), semelhante ao observado no presente estudo.

Com relação ao desempenho dos testes diagnósticos avaliados no presente estudo, na análise estratificada, a IFI Leishmaniose Humana apresentou sensibilidade de 86,3% e especificidade de 82,5%, para pacientes não infectados pelo HIV. Desempenho semelhante

foi observado em outro estudo brasileiro, em que este teste apresentou sensibilidade de 81% e especificidade de 83,8% (Pedras et al., 2008) Os resultados obtidos no presente estudo, também corroboram com estudo de revisão sistemática com metanálise, em que o desempenho sumarizado da técnica em pacientes não portadores de HIV, a partir de trabalhos de diferentes países, foi de 88% de sensibilidade e 90% de especificidade (Maia et al., 2012).

Para pacientes portadores de HIV, a IFI Leishmaniose Humana apresentou sensibilidade de 60,5% e especificidade de 89,7%. Estudo de revisão sistemática de trabalhos publicados internacionalmente avaliando a RIFI em pacientes portadores da infecção pelo HIV também apresentou semelhante sensibilidade e especificidade, sendo respectivamente 51% e 93% (Cota et al., 2012). Desta forma, se conclui que a RIFI, principal teste utilizado no país para o diagnóstico da LV, não apresenta desempenho satisfatório para pacientes portadores e não portadores de infecção pelo HIV.

Ainda assim, é importante destacar que a IFI Leishmaniose Humana é o único kit registrado na ANVISA que apresenta suficiência de produção nacional, sendo disponibilizado pelo MS para o diagnóstico de rotina no SUS. Apesar da autonomia nacional de produção do teste, a técnica necessita de infraestrutura, como microscópio de fluorescência, o que limita o número de laboratórios preparados para sua execução e reduz o acesso dos pacientes ao diagnóstico. Este fato é ainda mais preocupante quando se considera a letalidade da LV e a importância do diagnóstico para o início do tratamento. Neste contexto, a substituição da RIFI por um teste mais simples, que possibilite descentralização e apresente alto desempenho é essencial.

No presente estudo, o teste imunocromatográfico IT LEISH[®] apresentou sensibilidade e especificidade de 96,3% para pacientes não portadores de infecção pelo HIV. O desempenho observado se aproxima de resultados obtidos em outros trabalhos que avaliaram amostras de pacientes brasileiros, apresentando sensibilidade variando de 92 a 100% e 95,6 a 100% (Amato et al., 2009; Cunningham et al., 2012). Boelaert et al. (2014), em estudo de revisão sistemática, avaliando o desempenho dos testes rápidos utilizando rK39 também apresentaram desempenho semelhante ao encontrado no presente estudo, com sensibilidade de 91,9% e especificidade de 92,4%. Nesta revisão sistemática, apenas quatro trabalhos incluídos avaliaram especificamente o teste imunocromatográfico IT LEISH[®], apresentando de forma sumarizada sensibilidade de 86,4% e especificidade de 94,4%.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com estudos internacionais, em que o IT LEISH[®] apresentou sensibilidade variando de 88 a 100% e especificidade variando de 89,8 a 99,2% (Marty et al., 2007; Abass et al., 2011, 2015; Canavate et al., 2011;

Cunningham et al., 2012; Kumar et al., 2013; Mbui et al., 2013; Bezuneh et al., 2014). A variação observada no desempenho do teste pode estar relacionada às diferentes regiões em que os estudos foram realizados.

Cunningham et al. (2012) avaliou a diferença de desempenho de testes rápidos entre pacientes residentes em três regiões endêmicas. No oeste da África, o IT LEISH[®] apresentou sensibilidade e especificidade de 87,2% e 96,4%, no Brasil de 92% e 95,6% e no subcontinente indiano, de 98,8% e 97,6%, respectivamente. A menor sensibilidade observada na África foi também relatada por outros autores que avaliaram este teste (Abass et al., 2011, 2015; Canavate et al., 2011; Mbui et al., 2013; Bezuneh et al., 2014). Esta diferença de desempenho pode ser atribuída principalmente à diversidade das espécies de parasitos, podendo também estar relacionada à alta prevalência da coinfeção LV/HIV entre os pacientes nesta região (Mbui et al., 2013; Boelaert et al., 2014; Abass et al., 2015).

Para pacientes portadores de HIV, neste estudo o IT LEISH[®] apresentou sensibilidade de 63,2% e especificidade de 97,4%. Estudos avaliando o desempenho de testes diagnósticos neste grupo específico de pacientes são escassos. No entanto, os resultados do presente estudo são próximos aqueles apresentados por Horst et al. (2009), que na Etiópia observaram 77,3% de sensibilidade e por Marty et al. (2007), que na França, observaram sensibilidade de 54% para este teste. A maior sensibilidade do IT LEISH[®], relatada por Abass et al. (2015) em pacientes com HIV na França, 81,8%, pode estar relacionada ao pequeno tamanho amostral (11 pacientes), avaliado no estudo.

O manual de instrução do IT LEISH[®], informa que este teste apresenta 99% de sensibilidade e 100% de especificidade. De acordo com o fabricante, foram avaliados 206 pacientes com LV e 269 indivíduos saudáveis ou com outras doenças. No entanto, não é informado o teste utilizado como padrão de referência para confirmação de casos e se havia pacientes coinfectados no grupo avaliado.

Atualmente, o IT LEISH[®] é o teste rápido disponibilizado no Brasil pelo MS para o diagnóstico da LV na rede pública. Por ser uma técnica de simples realização, interpretação e que apresenta desempenho satisfatório para pacientes não portadores de HIV, sua utilização foi considerada um grande avanço na abordagem diagnóstica de pacientes suspeitos da LV no país. A disponibilização deste teste permite maior descentralização do diagnóstico da LV, visto que é padronizado para uso em soro e em sangue capilar digital. No entanto, ainda hoje este teste vem sendo utilizado nos LACENS e serviços de referência em soro, o que restringe sua utilização e retarda o diagnóstico do paciente, sem necessidade. Machado de Assis et al. (2015) demonstraram em Ribeirão das Neves, Minas Gerais, que a implantação do IT

LEISH[®], em serviços de atenção primária é factível e está indicada. Assim, espera-se em um futuro próximo, que o IT LEISH[®] esteja disponível nos serviços de atenção primária à saúde do Brasil, especialmente em municípios endêmicos.

De maneira geral, os resultados do presente estudo confirmaram que o IT LEISH[®] é teste útil e aplicável ao diagnóstico de pacientes não portadores de infecção pelo HIV e que sua utilização no diagnóstico de pacientes portadores de HIV é limitada, tendo em vista a baixa sensibilidade do teste neste grupo. Em coinfectados, um paciente com clínica sugestiva e IT LEISH[®] negativo não deveria ter o diagnóstico da LV excluído, devendo ser utilizada outra abordagem diagnóstica, para confirmar a ausência da doença.

No presente estudo, o Kalazar Detect[™] apresentou sensibilidade e especificidade de 92,5% e 95,0% para pacientes não portadores de HIV e de 47,4% e 97,4%, para pacientes portadores de HIV, respectivamente. Em outro estudo realizado no Brasil, este teste apresentou sensibilidade e especificidade de 72,4% e 99,6% para pacientes não portadores de HIV e 60% e 100% para portadores de HIV, respectivamente (Moura et al., 2013). A diferença observada no desempenho dos pacientes não portadores de HIV entre os estudos pode estar relacionada ao diferente critério utilizado como padrão de referência. No estudo de Moura et al. (2013), foram considerados como casos, pacientes com febre e esplenomegalia que apresentavam exame direto ou cultura positivos e/ou RIFI positiva, ou ainda que mesmo sem confirmação laboratorial, apresentavam resposta terapêutica favorável. Este amplo critério de definição de LV utilizado, pode estar relacionado a menor sensibilidade observada para o Kalazar Detect[™].

Os resultados obtidos para o Kalazar Detect[™] no presente estudo, corroboram com outros estudos realizados no Brasil, por Carvalho et al. (2003) e Cunningham et al. (2012), que relataram sensibilidade variando de 84,7 a 90% e especificidade variando de 96,8 a 100% para pacientes não portadores de HIV.

Entre os testes comerciais avaliados, o Kalazar Detect[™] foi o único que apresenta no manual de instrução estudo de desempenho realizado no Brasil. De acordo com fabricante, foram avaliados 128 pacientes com exame parasitológico positivo para LV e 59 com diagnóstico negativo. Nesta avaliação, o Kalazar Detect[™] apresentou sensibilidade de 89,8% e especificidade de 100%.

Assim como verificado para o IT LEISH[®], as diferenças geográficas também afetam o desempenho do Kalazar Detect[™] (Diro et al., 2007; Boelaert et al., 2008; Pattabhi et al., 2010; Canavate et al., 2011; Cunningham et al., 2012; El-Moamly et al., 2012; Bezuneh et al., 2014). Cunningham et al. (2012), avaliaram o Kalazar Detect[™] em diferentes regiões e

relatarem sensibilidade e especificidade de 67,6% e 90,8% no oeste da África, 84,7% e 96,8% no Brasil e 99,6% e 96,0% no subcontinente indiano, respectivamente. Como relatado anteriormente, esta diferença de desempenho pode ser atribuída à diversidade da região antigênica da cinesina entre as espécies dos parasitos e às diferenças nas concentrações do anticorpo anti-rK39, que por sua vez, podem estar ligadas a diferentes padrões de idade, resposta imunológica e ao estado nutricional do paciente (Cunningham et al., 2012; Abass et al., 2015).

Em estudo de revisão sistemática com metanálise realizado por Boelaert et al. (2014), os testes rápidos utilizando rK39 apresentaram sensibilidade de 91,9% e especificidade de 92,4%. Nesta revisão sistemática, foram analisados separadamente também os estudos que utilizaram o Kalazar Detect™ e o IT LEISH®, apresentando sensibilidade e especificidade de 91,3% e 91,2%, 86,4% e 94,4%, respectivamente. De acordo com os autores deve-se interpretar com cuidados esta diferença de desempenho, visto que foram incluídos nesta revisão sistemática 11 estudos que avaliaram o Kalazar Detect™ e apenas quatro estudos avaliando o IT LEISH®. No presente estudo, assim como relatado na revisão sistemática de Chappuis et al. (2006), a marca do teste rápido utilizado não influenciou significativamente o desempenho da técnica.

Na análise global realizada neste estudo, o IT LEISH® e o Kalazar Detect™ foram os testes que apresentaram maior concordância no diagnóstico de pacientes (Índice *Kappa* = 0,84). Este resultado possivelmente está relacionado a ambos os testes utilizarem plataformas semelhantes e o mesmo antígeno. Apesar do desempenho semelhante dos testes, um dos fatores que limita a utilização do Kalazar Detect™ é sua padronização apenas para uso em soro.

Tratando-se de uma doença como a LV, que atinge populações pobres que muitas vezes vivem em locais de difícil acesso, pouca infraestrutura e ainda com agravante de ser potencialmente letal, a obtenção do resultado do diagnóstico de forma imediata é essencial. Desta forma, testes imunocromatográficos que possam ser utilizados com sangue capilar digital, possibilitam maior descentralização, sendo um grande avanço para o diagnóstico e conseqüentemente para o controle da doença. No geral, assim como o IT LEISH®, o Kalazar Detect™ também apresentou satisfatório desempenho para o diagnóstico de pacientes não portadores de HIV, mas, não para pacientes portadores de HIV.

Importante mencionar que o Kalazar Detect™ foi disponibilizado no Brasil, de 2009 a 2014, mesmo possuindo registro vencido em 2010 na ANVISA e não dispondo de estudo de validação no país quando foi disponibilizado. O fato dos dois testes rápidos que já foram

disponibilizados no país, dependerem de importação, o IT LEISH[®] sendo produzido na França e o Kalazar Detect[™] nos Estados Unidos, evidencia também a necessidade de se incentivar a produção nacional de testes imunocromatográficos. Ressalta-se que, após vinte anos, a vigência do depósito usando o rK39 para o diagnóstico se encerrou em 2013, caindo em domínio público, o que possibilita a padronização e produção nacional de testes diagnósticos para LV utilizando este antígeno.

No presente estudo, o kit *Leishmania* ELISA IgG+IgM apresentou sensibilidade e especificidade de 80,0% e 93,7% respectivamente, para pacientes não portadores de HIV. Não foram encontrados estudos brasileiros avaliando este teste. Kiliç et al. (2008), na Turquia, relataram sensibilidade de 95,8% (23/24) e especificidade de 82,8% (29/35), quando o teste foi comparado ao exame parasitológico direto e a cultura. Mandal et al. (2008), na Índia, apresentaram 100% (16/16) de sensibilidade e 87% (40/46) de especificidade. A divergência entre os resultados aqui observados e os estudos mencionados pode estar relacionada ao pequeno tamanho amostral utilizado nos dois trabalhos citados.

De acordo com o manual de instrução do *Leishmania* ELISA IgG+IgM, este teste obteve sensibilidade e especificidade de 97% e 99%, respectivamente, em uma avaliação de 138 amostras de soro/plasma, sem distinção de quantos casos e controles e utilizando como padrão de referência um kit de RIFI. Apesar da falta de padrão ouro para estudos de avaliação de desempenho de testes diagnósticos para LV, chama atenção a utilização da RIFI como padrão, visto que a técnica apresenta desempenho insatisfatório. O maior desempenho demonstrado no manual, comparado com o resultado obtido neste estudo (sensibilidade de 80% e especificidade de 93,7%), pode estar relacionado tanto à seleção das amostras avaliadas, visto que não é especificado o número de casos e de controles, como ao padrão de referência empregado. Validar um teste sorológico comparando com outro de mesma metodologia e inferior desempenho é abordagem inadequada, pelo viés de seleção de amostras gerado. Desta forma, fica clara a necessidade de estabelecer requisitos mínimos necessários para estudos de avaliação de desempenho para kits diagnósticos a serem registrados no país.

O kit Ridascreen[®] *Leishmania* Ab, avaliado neste estudo, apresentou sensibilidade de 96,2% e especificidade de 75,9% para pacientes não portadores de HIV. Harizanov, et al. (2013), na Bulgária, obtiveram 87,5% (28/32) sensibilidade para este kit. Assim como observado para o kit *Leishmania* ELISA IgG+IgM, os estudos que avaliam o desempenho deste teste comercial também utilizam pequeno tamanho amostral, este fato pode estar

relacionado a diferença de desempenho observado entre o presente estudo e o trabalho apresentado.

O manual de instrução do Ridascreen® *Leishmania* Ab, relata sensibilidade de 87,5% e especificidade de 88,7%, sendo utilizado como padrão de referência outros dois ELISAs comerciais. Outras informações a respeito de como esta avaliação de desempenho foi realizada não são fornecidas pelo fabricante. O padrão de referência utilizado é inadequado e a falta de informação sobre o estudo realizado reforça a necessidade de melhor padronização para os estudos de desempenho descritos nos manuais de instrução dos kits diagnósticos registrados no país.

Para pacientes não portadores de HIV, verifica-se no presente estudo diferença de sensibilidade e especificidade significativa entre os dois ELISAs comerciais avaliados, e concordância classificada como moderada (Índice *Kappa* = 0,68). O Ridascreen® *Leishmania* Ab, apresenta maior sensibilidade (96,2%) em comparação com *Leishmania* ELISA IgG+IgM (80%), no entanto perde em termos de especificidade (78,9% × 93,7%, respectivamente). Em estudo de revisão sistemática com metanálise, Maia et al. (2012) avaliaram a técnica utilizando o antígeno rK39 e extrato bruto, e relataram sensibilidade e especificidade de 92%, 81% e 87% e 77%, respectivamente. No entanto, como os fabricantes dos ELISAs avaliados no presente estudo não informam qual o antígeno utilizado no teste, fica difícil fazer qualquer comparação.

Neste estudo, o *Leishmania* IFA IgG, apresentou sensibilidade de 78,8% e especificidade de 96,3%. Na literatura não foram encontrados estudos de avaliação de desempenho deste teste. No manual de instrução, o fabricante informa que em uma análise de 141 amostras de soro (não especificando quantos casos e controles), utilizando outro kit de RIFI como teste de referência, foi obtida sensibilidade e especificidade de 100% para o *Leishmania* IFA IgG. Assim como verificado nos manuais de instrução dos ELISAs comerciais descritos anteriormente, esta avaliação de desempenho apresentada pelo fabricante também é passível de questionamentos, visto o baixo desempenho observado pela técnica utilizada como padrão de referência e a falta de informação dos pacientes utilizados.

Em estudo de revisão sistemática avaliando o desempenho de técnicas diagnósticas em pacientes portadores da infecção pelo HIV, Cota et al. (2012) observaram para o ELISA (sem distinção do tipo de antígeno utilizado) sensibilidade e especificidade de 66% e 90% e para a RIFI, 51% e 93%. Estes resultados corroboram aos dados obtidos no presente estudo para este grupo de pacientes, em que o kit *Leishmania* ELISA IgG+IgM apresentou sensibilidade e especificidade de 64,9% e 97,4%, o Ridascreen® *Leishmania* Ab 78,9% e 89,7% e o

Leishmania IFA IgG 60,5% e 92,3%, respectivamente. A baixa sensibilidade dos testes sorológicos RIFI e ELISA para o diagnóstico de LV em pacientes coinfectados também foi confirmada por Medrano et al. (1998) em número limitado de amostras, relatando sensibilidade de 11% (2/18) para a RIFI e 22% (4/18) para o ELISA.

De maneira geral, os resultados do presente estudo demonstram que o *Leishmania* ELISA IgG+IgM, Ridascreen[®] *Leishmania* Ab e *Leishmania* IFA IgG, apresentam limitado desempenho para o diagnóstico de pacientes com suspeita de LV no Brasil, tanto na análise global, como na estratificada para pacientes portadores e não portadores de HIV.

No presente estudo, o DAT-LPC apresentou sensibilidade de 93,8% e especificidade de 97,5% para pacientes não portadores de HIV. Outros estudos brasileiros avaliando este teste apresentaram semelhante desempenho, com sensibilidade, variando de 90 a 100% e especificidade variando de 96 a 98,2% (Machado de Assis et al., 2011; Oliveira et al., 2011, 2013). Importante mencionar, que parte das amostras utilizadas no presente estudo estão sobrepostas com as usadas por Machado de Assis et al. 2011.

A sensibilidade do DAT estimada em estudo de revisão sistemática se aproxima à observada para o DAT-LPC no presente estudo, $94,2\% \times 93,8\%$, respectivamente. Já a especificidade apresentada na revisão sistemática foi inferior, $89,9\% \times 97,5\%$, respectivamente (Maia et al., 2012). Esta diferença de especificidade pode estar relacionada aos diferentes tipos de DATs utilizados nos estudos incluídos nesta revisão sistemática, visto que foram avaliados o DAT-LPC, DAT-ITM e DAT desenvolvido “*in house*” e também ao grupo amostral utilizado como controle nos estudos incluídos nesta revisão sistemática. Diversos estudos utilizam como grupo controle, pacientes que apresentam outras doenças ou pacientes saudáveis, e não os pacientes com clínica sugestiva de LV que de fato, na prática clínica, serão submetidos ao diagnóstico.

Para pacientes portadores de HIV, o DAT-LPC, apresentou sensibilidade de 89,5% e especificidade de 89,7%. Horst et al. (2009) também relataram semelhante sensibilidade para o DAT-KIT (88,6%) neste grupo de pacientes.

Importante mencionar que, para o diagnóstico da LV, não existe um consenso em termos de sensibilidade e especificidade mínima requerida para um teste diagnóstico. A definição de um “*Product Target Profile*” (“Perfil alvo do produto”), levando em conta o desempenho, custo-efetividade, autonomia nacional e acesso diagnóstico torna-se de extrema importância, a fim de garantir a qualidade da assistência ao paciente com suspeita de LV.

De acordo com Boelaert et al. (2007), para detecção de novos casos de LV, a sensibilidade e especificidade mínima exigida para um teste diagnóstico, seria $\geq 95\%$ e $\geq 98\%$,

respectivamente. Seguindo estes parâmetros, na análise global ou estratificada, nenhum dos testes diagnósticos avaliados no presente estudo apresenta desempenho ideal. Ao se considerar como desejável a acurácia diagnóstica mínima de 95%, apenas na análise estratificada para pacientes não portadores da infecção pelo HIV, o IT LEISH[®] (96,3%) e o DAT-LPC (95,6%), atingem o limiar desejado. Ao se considerar como desejável a acurácia diagnóstica mínima de 90%, na análise global o IT LEISH[®] (91,1%) e o DAT-LPC (93,7%) também apresentam o desempenho requerido, já na análise estratificada, para pacientes não portadores da infecção pelo HIV além dos testes mencionados, o Kalazar Detect[™] também apresenta acurácia de 93,8% neste grupo. Já para pacientes portadores da infecção pelo HIV, nenhum dos testes avaliados apresenta acurácia $\geq 90\%$, sendo o DAT-LPC, o teste que mais se aproxima (89,8%).

Do ponto de vista do desempenho dos testes diagnósticos avaliados, o DAT-LPC se mostrou o mais indicado para substituição da RIFI, como técnica diagnóstica para ser disponibilizada pelo MS no Brasil. Outros trabalhos publicados reforçam a necessidade de substituição da RIFI e apontam o DAT-LPC como um candidato potencial (Pedras et al., 2008; Cota et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Machado de Assis et al., 2016a).

Os benefícios do DAT-LPC vão além do bom desempenho, estão relacionados também à autonomia nacional de produção. Desta forma, o desenvolvimento do DAT-LPC mostra que é possível a produção nacional de um teste de elevada acurácia, robusto, de simples realização e ainda com a vantagem de permitir a descentralização do diagnóstico, aumentando o acesso dos pacientes. A substituição da RIFI pelo DAT-LPC é simples e viável e certamente aumentaria o acesso ao diagnóstico da doença no Brasil (Machado de Assis et al., 2015).

No geral, o DAT-LPC apresentou satisfatório desempenho para portadores e não portadores de HIV. A característica de estar indicado para uso em coinfectados pelo HIV o destaca de qualquer outro teste avaliado, visto que, é reconhecido que testes imunológicos apresentam elevado valor diagnóstico para pacientes imunocompetentes, mas, valor limitado para o diagnóstico de pacientes com HIV (Cota et al., 2013). Neste sentido, um teste diagnóstico que seja aplicado a este grupo de pacientes torna-se ainda mais valioso.

Uma das dificuldades encontradas em estudos de avaliação de desempenho de testes diagnósticos para LV é a ausência de um padrão-ouro ou teste-referência para classificação dos casos e controles, visto que o padrão utilizado afeta diretamente as taxas de sensibilidade e especificidade dos testes avaliados. Ao utilizar um padrão de referência que apresenta baixa sensibilidade, casos verdadeiramente positivos, podem ser classificados como não portadores

de LV, sendo então considerados como falsos-positivos quando avaliados por outros testes, que desta forma, terá sua especificidade reduzida.

No presente estudo, foi utilizado o exame parasitológico de aspirado de medula óssea como padrão de referência, por ser esta a técnica de confirmação clássica para o diagnóstico da LV. Apesar da alta especificidade, a sensibilidade da técnica é muitas vezes insuficiente, variando de 53% a 86% (WHO, 2010). Na tentativa de reduzir o viés acarretado pela baixa sensibilidade, todos os controles incluídos no presente estudo, apresentavam além de exame parasitológico negativo, confirmação de outra doença.

Uma recente iniciativa nacional poderá compensar o fato da ANVISA não ser exigente nos estudos de validação apresentados pelas empresas para registro dos testes diagnósticos comercializados. Considerado um avanço no país, a criação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec), tem por objetivo assessorar o MS nas atribuições relativas à incorporação, exclusão ou alteração de tecnologias em saúde pelo SUS. Com a criação da Conitec, através da lei nº12.401 de 28 de abril de 2011, para a incorporação de nova tecnologia no SUS passa a ser exigido estudo de avaliação econômica comparando a tecnologia solicitada com as tecnologias em saúde disponibilizadas. Ressalta-se, entretanto, que a comercialização para o mercado privado não está sujeita à avaliação pela Conitec e que ainda não estão disponíveis estudos da Conitec para diagnóstico da LV. Importante destacar que, a decisão de incorporar o IT LEISH[®] ao SUS em 2015 pelo MS não foi tomada levando em consideração recomendação produzida pela Conitec.

Devido à importância das avaliações econômicas em saúde para fornecer aos gestores, informações baseadas em evidências e desta forma auxiliar no processo decisório de incorporação de novas tecnologias, foi realizada neste estudo uma avaliação econômica parcial, através da estimativa dos custos diretos dos testes diagnósticos avaliados. Não foi objetivo do presente trabalho realizar análise de custo-efetividade, embora o presente grupo de pesquisa tenha previsto sua realização, em continuidade a este estudo.

Em um país como o Brasil, onde 75% da população dependente exclusivamente do sistema público de saúde, que prevê cobertura universal, a discussão econômica é especialmente importante (Brasil, 2009). Além da melhoria da atenção à saúde para o paciente, a incorporação de uma nova tecnologia, pode significar até mesmo economia de recursos quando o procedimento disponível e que será substituído é oneroso para o sistema.

No presente estudo, dos sete testes diagnósticos avaliados, o DAT-LPC foi o que apresentou menor custo direto, estimado em R\$ 15,47. Machado de Assis et al. (2015), estimaram o custo direto para este mesmo teste em US\$ 5,44 (R\$ 12,04), tendo como base o

ano de 2012 e apontaram a viabilidade da descentralização do DAT-LPC, a fim de aumentar o acesso ao diagnóstico da LV no país. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa estimou o custo direto do DAT-LPC em US\$ 4,92 (R\$ 12,3), ano base 2014. Na ocasião, foi também realizada uma análise de custo-efetividade de diferentes testes diagnósticos para LV (DAT-LPC; IT LEISH[®], Kalazar Detect[™], IFI Leishmaniose Visceral Humana, exame parasitológico direto e PCR), sendo o DAT-LPC considerado o teste mais custo-efetivo (Machado de Assis et al., 2016a).

A estimativa de custo direto do DAT-LPC deve ser interpretada com cautela, visto que este teste não está disponível comercialmente, portanto, no custo de uma reação não estão inclusos valores de embalagens, fretes e outros itens adicionais de produção. Atualmente, a Presidência da Fiocruz, Bio-Manguinhos e um laboratório privado de produção de kits diagnósticos estão em fase de transferência de tecnologia, buscando a produção nacional do DAT-LPC para o mercado público e privado.

Entre os kits comerciais avaliados neste estudo, as menores estimativas de custo direto foram dos testes imunocromatográficos, Kalazar Detect[™], estimado em R\$ 22,34 e IT LEISH[®] realizado em sangue capilar digital, estimado em R\$ 26,82. Já o IT LEISH[®], quando realizado em soro teve seu custo direto estimado em R\$ 32,27. Embora o custo do Kalazar Detect[™] seja inferior ao do IT LEISH[®], independente da amostra biológica utilizada, deve-se levar em consideração que neste estudo não foram considerados gastos com transporte de amostra biológica, do local que esta é coletada, ao laboratório que realiza o teste. Neste contexto, todas as estimativas de custo-direto realizadas, com exceção do IT LEISH[®] em sangue capilar digital, podem estar subestimadas.

Na análise de custo-efetividade conduzida por Machado de Assis et al. (2016a), quando comparou-se os dois testes rápidos, IT LEISH[®] × Kalazar Detect[™], o primeiro mostrou-se estratégia custo-efetiva. Na ocasião, o custo direto do IT LEISH[®], realizado em sangue capilar digital, foi de US\$ 6,57 (R\$ 16,5) e do Kalazar Detect[™] US\$ 7,45 (R\$ 18,7). A análise de sensibilidade mostrou que se o custo direto do Kalazar Detect[™] fosse reduzido até US\$ 6,33 (R\$ 15,89), este passaria a ser mais custo-efetivo.

A IFI Leishmaniose Humana, único teste comercialmente disponível que apresenta suficiência de produção nacional para o diagnóstico da LV no Brasil, foi o teste avaliado que apresentou menor custo de uma reação (R\$ 1,51), reforçando a necessidade de se incentivar a produção nacional de testes diagnósticos. Entretanto, o custo direto estimado para este kit (R\$ 34,11) ainda é superior ao do DAT-LPC (R\$ 15,47) e de outros testes comerciais, tais como o teste rápido Kalazar Detect[™] (R\$ 22,34) e o IT LEISH[®] em sangue (R\$ 26,82). Isso ocorre,

pois, a RIFI é uma técnica que requer elevada infraestrutura laboratorial, que consequentemente necessita de gastos com materiais de consumo e manutenção de equipamentos e tempo para realização do teste, elevando seu custo. Desta forma, assim como relatado por Machado de Assis et al. (2015), do ponto de vista econômico e considerando apenas o custo direto, a substituição da IFI Leishmaniose Humana pelo DAT-LPC também é recomendada no presente estudo.

Os testes comerciais que apresentaram maior custo direto foram *Leishmania* IFA IgG (R\$ 56,10), *Leishmania* ELISA IgG+IgM (R\$ 54,47) e o Ridascreen® *Leishmania* Ab (R\$ 41,57). Observa-se, no entanto, que o elevado custo destes testes, não foi compensado pelo desempenho apresentado neste estudo.

Dos testes avaliados, o IT LEISH® e o DAT-LPC foram os testes que forneceram resultados em menor tempo, estimados respectivamente em 30 e 50 minutos. Estes resultados, associados ao elevado desempenho e custo direto observado no presente estudo, reforçam a indicação de substituição da RIFI pelo DAT-LPC como perspectiva de curto a médio prazo e apoiam a decisão do MS de substituir o Kalazar Detect™ pelo IT LEISH® em 2015, ressaltando a viabilidade de utilização do IT LEISH® em sangue.

Um ponto forte da análise econômica realizada neste estudo, diz respeito à mensuração dos custos diretos através da técnica de microcusteio. Esta abordagem permite um elevado grau de detalhamento, pois são somados os valores de todos os procedimentos e processos individuais, para então gerar o custo direto total do teste diagnóstico avaliado (Frick, 2009). No entanto, tem-se como limitação do estudo, o fato das estimativas de custos terem sido calculadas a partir do pressuposto de que não são necessários novos investimentos financeiros significativos na infraestrutura laboratorial para realização dos testes.

Como perspectivas futuras destaca-se: preparação de recomendações e sugestões a serem enviadas a ANVISA, sobre o mecanismo de busca de produtos para saúde e a RDC nº 36 de 26 de agosto de 2016, que regulariza o registro de PDIV no país; avaliação da qualidade da informação disponível nos manuais de instrução de uso dos testes diagnósticos avaliados, visto que frequentemente foram encontrados erros de redação, informações desatualizadas e ambíguas, dificultando o correto entendimento; avaliação de desempenho do NovaLisa™ *Leishmania infantum* IgG, visto que a empresa Novatec Immundiagnostica GMBH, foi a única que não aceitou a proposta de parceria realizada e desta forma, este é o único teste diagnóstico comercialmente disponível para o diagnóstico de LV que não apresenta estudo de avaliação de desempenho no Brasil; desenvolvimento de algoritmos aplicados ao diagnóstico da doença e realização de análise de custo-efetividade e impacto-orçamentário, a fim de

fornecer uma avaliação econômica completa ao MS, de todos os testes diagnósticos disponíveis comercialmente para LV no Brasil.

7 CONCLUSÕES

Este estudo realizou avaliação de desempenho e estimativa de custo direto do DAT-LPC e de seis kits registrados na ANVISA para o diagnóstico da LV. Na análise global dos testes, apenas o DAT-LPC e o IT LEISH[®] apresentaram acurácia diagnóstica acima de 90%, sendo 93,7% e 91,1%, respectivamente. Na análise estratificada para pacientes não portadores de HIV, além dos testes citados, o Kalazar Detect[™] também apresentou acurácia superior à 90%. Já para pacientes portadores de HIV, nenhum teste apresentou acurácia maior que 90%, sendo o DAT-LPC, o teste que apresentou maior acurácia (89,8%) neste grupo de pacientes.

Além da elevada acurácia obtida para os testes imunocromatográficos neste estudo, o IT LEISH[®] e o Kalazar Detect[™] foram também os testes que apresentaram maior concordância no diagnóstico (Índice *Kappa* = 0,84). No entanto, o fato do IT LEISH[®] ser padronizado para uso em sangue capilar digital, permite maior descentralização do diagnóstico e conseqüentemente maior controle da LV.

Em relação aos custos diretos estimados para os testes avaliados, o DAT-LPC também foi o teste que apresentou menor custo (R\$ 15,47), seguido do Kalazar Detect[™] (R\$ 22,34) e do IT LEISH[®] em sangue (R\$ 26,82).

Os dados obtidos permitem recomendar o estabelecimento de critérios rigorosos para registro de testes para o diagnóstico da LV no país. O erro diagnóstico é agravado pela toxicidade dos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da doença, em caso de resultados falso-positivos e pelo atraso do início do tratamento e manutenção da elevada letalidade, em caso de resultados falso-negativos.

REFERÊNCIAS

- ABASS, E. et al. Validation of a [Beta]-ME ELISA for Detection of Anti *Leishmania donovani* Antibodies in Eastern Sudan. **Iranian Journal of Immunology**, v. 8, n. 3, p. 150, 2011.
- _____. rKLO8, a novel *Leishmania donovani*-derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2322, 2013.
- _____. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0116408, 2015.
- ABDALLAH, K. A. et al. Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. **Tropical Medicine & International Health**, v. 9, n. 10, p. 1127-1131, 2004.
- ADAMS, E. R. et al. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 4, p. 591-596, 2010.
- _____. Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 12, p. e1946, 2012.
- ADHIKARI, S. R.; MASKAY, N. M.; SHARMA, B. P. Paying for hospital-based care of Kala-azar in Nepal: assessing catastrophic, impoverishment and economic consequences. **Health policy and planning**, v. 24, n. 2, p. 129-139, 2009.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- AKMAN, L. et al. Multi-Site DNA Polymorphism Analyses of *Leishmania* Isolates Define their Genotypes Predicting Clinical Epidemiology of Leishmaniasis in a Specific Region. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 545-554, 2000.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci**, v. 112, n. 18, p. 2993-3002, 1999.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, n. 2, p. 276-280, 2005.
- ALLAIN, D. S.; KAGAN, I. G. A direct agglutination test for leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 24, n. 2, p. 232-236, 1975.

AL-NAHHAS, S. A.; AL-TAWEEL, A. A.; AL-TAWEEL, M. A. Assessment of the direct agglutination test, fast agglutination screening test, and rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Syria. **Saudi Med J**, v. 29, n. 9, p. 1250-4, 2008.

ALONSO, M. et al. Duodenal leishmaniasis diagnosed by biopsy in two HIV-positive patients. **Pathology-Research and Practice**, v. 193, n. 1, p. 43-47, 1997.

ALTÉS, J. et al. Visceral leishmaniasis: another HIV-associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of the literature. **Aids**, v. 5, n. 2, p. 201-208, 1991.

ALVAR, J. et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 2, p. 298-319, 1997.

_____. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.

_____. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

AMATO NETO, V. A. et al. False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 182-185, 2009.

ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 3, p. 191-199, 2008.

ARA, M. et al. Visceral leishmaniasis with cutaneous lesions in a patient infected with human immunodeficiency virus. **British Journal of Dermatology**, v. 139, n. 1, p. 114-117, 1998.

BADARO, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.

_____. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.

BARBOSA JUNIOR, W. L. et al. Rapid Tests and the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis and Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome Coinfection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 93, n. 5, p. 967-9, 2015.

BARRETO, M. L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **The lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, 2011.

BASSET, D. et al. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. **Microbes and infection**, v. 7, n. 13, p. 1370-1375, 2005.

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. Leishmania–host interactions: what has imaging taught us? **Cellular microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1659-1667, 2011.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BEZUNEH, A. et al. Comparison of point-of-care tests for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in East African patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 91, n. 6, p. 1109-15, 2014.

BOELAERT, M. et al. Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 1, p. 129-134, 1999a.

_____. Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 4, n. 1, p. 31-37, 1999b.

_____. Cost-effectiveness of competing diagnostic-therapeutic strategies for visceral leishmaniasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 8, p. 667-674, 1999c.

_____. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. S30-S39, 2007.

_____. 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**, v. 102, n. 1, p. 32-40, 2008.

_____. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. **The Cochrane Library**, 2014.

BOSCH, R. J. et al. Presence of *Leishmania* organisms in specific and non-specific skin lesions in HIV-infected individuals with visceral leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 41, n. 10, p. 670-675, 2002.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 set.1976.

_____. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento. Avaliação de tecnologias em saúde: ferramentas para a gestão do SUS. Série A. Normas e Manuais técnicos. Brasil, Brasília, DF, p110, 2009.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da

letalidade/Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasil, Brasília, DF, 2011.

_____. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana: Ministério da Saúde, Brasil, Brasília, DF, 2013.

_____. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Epidemiológica., M.. Brasil, Brasília: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasil, Brasília, DF, p. 120 2014a.

_____. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 29 de 2014 (CGDT/Devit/ SVS-MS). Brasil, Brasília, DF, 2014b.

_____. ANVISA. Resolução RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, em 27 ago 2015a.

_____. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 1.271, de 6 de junho de 2014. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, em 9 jun 2015b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. 1. ed., p.111. Ministério da Saúde, Brasil, Brasília, DF, 2015c.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Nota técnica Nº11/2016 /CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Brasil, Brasília, DF, 2016a

_____. ANVISA. Consulta a produtos para saúde registrados na ANVISA. Disponível em <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/consulta_correlato.asp>. Acesso em: 04 out. 2016b.

_____. ANVISA. Manual para regularização de produtos para diagnóstico *in vitro* na anvisa. Brasil, Brasília, DF, 2016c.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de informação sobre mortalidade. Disponível em <www.datasus.gov.br/DATASUS>. Acesso em: 20 jan. 2017.

BRAZ, R. F. 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. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 4, p. 344-348, 2002.

BURNS, J. M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.

CAKAN, H. et al. Patients with suspected visceral leishmaniasis in Istanbul. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 2, p. 103-109, 2010.

CANAVATE, C. 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**, v. 84, n. 1, p. 102-6, 2011.

CARVALHO, C. L. C.; MELLO, M. M.; JÚNIOR, S. M. A. Panorama mundial de patentes publicadas entre 2008 e 2012 com foco em leishmaniose. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 3, p. 459, 2015.

CARVALHO, S. F. G. et al. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 3, p. 321-324, 2003.

CASADO, J. L. et al. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 20, n. 3, p. 202-5, 2001.

CHAKRAVARTY, J. et al. Evaluation of rk39 immunochromatographic test with urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 9, p. 537-9, 2011.

CHAPPUIS, F. 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. **Tropical Medicine & International Health**, v. 8, n. 3, p. 277-285, 2003.

_____. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **Bmj**, v. 333, n. 7571, p. 723, 2006.

_____. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS (Medford, NY). Disponível em <<http://chembio.com/innovation/platforms/dual-path-platform>>. Acesso em: 09 dez. 2016.

CLEMENTE, W. T. et al. High prevalence of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area of Brazil. **American Journal of Transplantation**, v. 14, n. 1, p. 96-101, 2014.

CORTES, S. et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* sl-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.

COTA, G. F.; DE SOUSA, M. R.; RABELLO, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e1153, 2011.

_____. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1665, 2012.

_____. Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e2195, 2013.

CUNNINGHAM, J. et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 10, p. 1312-1319, 2012.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117-118, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DEANE, M.; DEANE, L. Infecção natural do Phlebotomus longipalpis por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em foco de calazar, no Ceará. **Hospital**, v. 45, p. 697-702, 1954.

DEREURE, J. et al. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients in the south of France. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 73, n. 2, p. 245, 1995.

DE RUITER, C. et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3147-3155, 2014.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. sup1, p. 3-15, 2003.

_____. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. **Indian journal of medical microbiology**, v. 24, n. 3, p. 165, 2006.

DIRO, E. et al. Field evaluation of FD-DAT, rK39 dipstick and KATEX (urine latex agglutination) for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 101, n. 9, p. 908-14, 2007.

_____. Atypical manifestations of visceral leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: a gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resource poor settings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 122-129, 2015.

DNDi America Latina. Centro de documentação. Descoberta: como o modelo PDP pode aperfeiçoar e acelerar o processo de P&D?. Notícias de interesse. 2014. Disponível em <<http://www.dndial.org/pt/centro-de-documentacao/noticias-interesse/602-descobertaviewpoint.html>> Acesso em: 10 dez. 2016

DOMÍNGUEZ, M. et al. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes and infection**, v. 5, n. 6, p. 507-513, 2003.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. **Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis**. DTIC Document.1964

EL HARITH, A. et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 583-586, 1986.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 961-972, 2014.

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**, v. 110, n. 1, p. 349-54, 2012.

EL TAI, N. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000

EVANS, T. G. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 5, p. 1124-1132, 1992.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of parasitology research**, 2012.

FRICK, K. D. Micro-costing quantity data collection methods. **Medical care**, v. 47, n. 7 Suppl 1, p. S76, 2009.

FUKUTANI, K. F. et al. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 2, p. 165-180, 1996.

GHOSH, P. et al. A comparative evaluation of the performance of commercially available rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 331, 2015.

- GOSWAMI, R. P.; RAHMAN, M.; GUHA, S. K. Utility of K39 strip test in visceral leishmaniasis (VL) and HIV co-infected patients: an early report from Eastern India. **J Assoc Physicians India**, v. 55, p. 154-5, 2007.
- _____. Testing urine samples with rK39 strip as the simplest non-invasive field diagnosis for visceral leishmaniasis: an early report from eastern India. **J Postgrad Med**, v. 58, n. 3, p. 180-4, 2012.
- GRASA, J. et al. [Nasal leishmaniasis in an HIV-positive patient]. **Acta otorrinolaringologica espanola**, v. 51, n. 2, p. 169-173, 2000.
- GUERBOUJ, S. et al. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? **Parasitology**, v. 122, n. 01, p. 25-35, 2001.
- GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286-1294, 2015.
- HAQUE, A. et al. Congenital visceral leishmaniasis. **Pak. J. Med. Sci**, v. 26, p. 485-487, 2010.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.
- HARIZANOV, R. N. et al. Clinical features, diagnostic tools, and treatment regimens for visceral leishmaniasis in Bulgaria. **Pathog Glob Health**, v. 107, n. 5, p. 260-6, 2013.
- HASNAIN, M. G. et al. An evaluation of the performance of direct agglutination test on filter paper blood sample for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 2, p. 342-344, 2014.
- HIDE, M. et al. A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. **Acta tropica**, v. 102, n. 3, p. 197-200, 2007.
- HO, M. et al. Immunosuppression in Kenyan visceral leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 51, n. 2, p. 207, 1983.
- HORST, R. et al. 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. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 6, p. 929-934, 2009.
- HOTEZ, P. J. et al. Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0003895, 2016.
- INBIOS INTERNATIONAL INC. Kalazar *Detect*[™] System for Visceral Leishmaniasis. Disponível em: < <http://www.inbios.com/kalazar-detect-elisa-system-for-visceral-leishmaniasis-intl/>>. Acesso em: 10 out. 2016.

ISLAM, M. Z. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay using urine samples. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 4, p. 789-794, 2002.

_____. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect urinary antibody against recombinant rKRP42 antigen made from *Leishmania donovani* for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 4, p. 599-604, 2008.

JACQUET, D. et al. Comparative evaluation of freeze-dried and liquid antigens in the direct agglutination test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis (ITMA-DAT/VL). **Tropical Medicine & International Health**, v. 11, n. 12, p. 1777-1784, 2006.

KILIÇ, S. et al. Evaluation of serological tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 38, n. 1, p. 13-19, 2008.

KHAN, M. G. M. et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 1, 2010.

_____. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

KUHLS, K. et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 334-343, 2007.

KUMAR, D. et al. Comparative evaluation of blood and serum samples in rapid immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 12, p. 3955-9, 2013.

KURKJIAN, K. et al. Application of an improved method for the recombinant K39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 12, p. 1410-1415, 2005.

LAGUNA, F. et al. Gastrointestinal leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients: report of five cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 48-53, 1994.

LAINSON, R. et al. *Leishmania* and leishmaniases. **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. v.1., p. 83-124, 1986.

_____. **Evolution, classification and geographical distribution**. Academic Press, 1987.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3136, 2014.

LOPES, U. G.; WIRTH, D. F. Identification of visceral *Leishmania* species with cloned sequences of kinetoplast DNA. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 20, n. 1, p. 77-84, 1986.

LOW, G.; COOKE, W. A congenital case of kala-azar. **The Lancet**, v. 208, n. 5389, p. 1209-1211, 1926.

LUZ, K. G. et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 57, n. 2, p. 168-171, 1997.

MAALEJ, I. A. et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 3, p. 312-320, 2003.

MACHADO DE ASSIS. et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 107-116, 2008.

_____. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 2, p. 81-5, 2011

_____. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, v. 17, n. 10, p. 1202-1207, 2012.

_____. Study of implementation and direct cost estimates for diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in an urban area in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 10, p. 2127-2136, 2015.

_____. Cost-effectiveness analysis of diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2016a.

_____. Acceptance and potential barriers to effective use of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in an urban area in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 241-244, 2016b.

MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1484, 2012.

MANDAL, J. et al. Evaluation of direct agglutination test, rk39 Test, and ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 79, n. 1, p. 76-8, Jul 2008.

MARTY, P. et al. [Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. Update on the utility of the IT-Leish and ID-Pagia leishmaniasis tests]. **Med Trop (Mars)**, v. 67, n. 1, p. 79-85, 2007.

MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 03, p. 237-246, 1999.

MAURYA, R. et al. Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing leishmania parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1932-1934, 2010.

MBUI, J. et al. Validation of two rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Kenya. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2441, 2013.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania. **Annual review of microbiology**, v. 6, p. 543-561, 2011.

MEDRANO, F. J. et al. The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 59, n. 1, p. 155-162, 1998.

MEINECKE, C. K. et al. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v. 104, n. 5, p. e65-e65, 1999.

MEREDITH, S. et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1742-1745, 1995.

MESTRA, L. et al. Transfusion-transmitted visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* in an immunocompromised patient: a case report. **Transfusion**, v. 51, n. 9, p. 1919-1923, 2011.

MIKAEILI, F. et al. Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. **Iran J Immunol**, v. 4, n. 2, p. 116-121, 2007.

MOHAMMADIHA, A. et al. Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary parasitology**, v. 192, n. 1, p. 83-90, 2013.

MOHAPATRA, T. M. et al. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 02, p. 114-117, 2009.

_____. Comparative Study of Serum, Urine and Saliva Using rk39 Strip for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Journal of arthropod-borne diseases**, v. 10, n. 1, p. 87, 2016.

MONDAL, D. et al. Visceral leishmaniasis elimination programme in India, Bangladesh, and Nepal: reshaping the case finding/case management strategy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 1, p. e355, 2009.

MONTALBAN, C. et al. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. **Journal of Infection**, v. 21, n. 3, p. 261-270, 1990.

MOURA, A. S. et al. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 589-593, 2013.

MUKHTAR, M. et al. Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 109, n. 9, p. 594-600, 2015.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. [21] Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

OLIVEIRA, E. et al. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 12, p. 1279-1281, 2009.

_____. Direct agglutination test (DAT): improvement of biosafety for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 7, p. 414-416, 2011.

_____. Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. trt004, 2013.

OLIVEIRA, V. V. G. D.; ALVES, L. C.; SILVA JUNIOR, V. A. D. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, n. AHEAD, p. 00-00, 2015.

ORSINI, M. et al. Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 259-262, 2002.

OSTYN, B. et al. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, p. e1284, 2011.

OTERO, A. et al. Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 62, n. 1, p. 128-131, 2000.

OZERDEM, D. et al. Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. **Parasitology research**, v. 106, n. 1, p. 197-200, 2009.

PAHO, P. A. H. O. **LEISHMANIOSES Epidemiological Report of the Americas**. July, 2016, p. 7. 2016

PATTABHI, S. et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 9, p. e822, 2010.

PCPP CPqRR/Fiocruz. Estudos Estratégicos para Inovação e Desenvolvimento Tecnológico em Diagnóstico e Terapêutica de Doenças Negligenciadas. **Relatório 1: Leishmaniose Visceral**, Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 2016.

- PEDRAS, M. J. et al. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 2, p. 172-178, 2008.
- PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MACHADO-DE-ASSIS, T. S.; RABELLO, A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 951-952, 2012.
- PINTADO, V. e LÓPEZ-VÉLEZ, R. HIV-associated visceral leishmaniasis. **Clinical microbiology and infection**, v. 7, n. 6, p. 291-300, 2001.
- PINTADO, V. et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients: a comparative study. **Medicine**, v. 80, n. 1, p. 54-73, 2001.
- RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. Supplement-1, p. 17-28, 2003.
- RANGEL, E.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Brasil, p. 368, 2003.
- REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.
- ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.
- ROMERO, G. A. S. O controle de leishmaniose visceral no Brasil: transformar é preciso. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.
- ROSENTHAL, E.; MARTY, P.; PESCE, A. *Leishmania* in bronchoalveolar lavage. **Annals of internal medicine**, v. 114, n. 12, p. 1064-1065, 1991.
- SAGHROUNI, F. et al. Immunochromatographic rK39 strip test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Tunisia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 12, p. 1273-8, Dec 2009.
- SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.
- SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, n. 1, p. 8, 2016.
- SARKARI, B. et al. A comparative study of antigen and antibody detection in visceral leishmaniasis using serum and urine-based ELISA. **Trop Biomed**, v. 25, n. 2, p. 96-99, 2008.
- SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 06, p. 588-596, 2015.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SHROUT P. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Statistical Methods in medical Research*; 7:301-317, 1998.

SIDDIG, M. et al. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 66-68, 1988.

SINGH, D. et al. Novel noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by rK39 testing of sputum samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2684-2685, 2009.

_____. In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of kala-azar. **J Health Popul Nutr**, v. 28, n. 3, p. 281-5, Jun 2010.

_____. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region of India. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 88, n. 2, p. 222-226, 2013.

SINGH, O. P. et al. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1424-1429, 2014.

SINGH, S.; CHAUDHRY, V.; WALI, J. Transfusion-transmitted kala-azar in India. **Transfusion**, v. 36, n. 9, p. 848-849, 1996.

SIVAKUMAR, R. et al. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. **Protein expression and purification**, v. 46, n. 1, p. 156-165, 2006.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology research**, v. 110, n. 3, p. 1065-1078, 2012.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

SUDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 80, n. 1, p. 40-42, 2014.

SYMMERS, W. S. C. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **The Lancet**, v. 275, n. 7116, p. 127-132, 1960.

TAKAGI, H. et al. Short report: production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 5, p. 902-5, 2007.

_____. Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 4, p. 578-582, 2009.

TERAN-ANGEL, G. et al. [Non invasive diagnostic tools for visceral leishmaniasis: a comparison of the immunoserological tests DAT, rK26 and rK39]. **Biomedica**, v. 30, n. 1, p. 39-45, 2010.

THE ROYAL TROPICAL INSTITUTE. Kit Biomedical Research, Rapid Diagnostics, Direct Agglutination Test for visceral leishmaniasis, december, 31, 2015.

THORNTON, S. J. et al. Barriers to treatment for visceral leishmaniasis in hyperendemic areas: India, Bangladesh, Nepal, Brazil and Sudan. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 36, n. 11, p. 1312-1319, 2010.

VAISH, M. et al. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 1, p. 81-5, 2012a.

_____. rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 4, p. 598-600, 2012b.

_____. Evaluation of two novel rapid rKE16 antigen-based tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in India. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 9, p. 3091-3092, 2012c.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VAN EYS G. J. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133-142, 1992.

VERMA, S. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 75, n. 4, p. 390-395, 2013.

WELCH, R. J.; ANDERSON, B. L.; LITWIN, C. M. Rapid immunochromatographic strip test for detection of anti-K39 immunoglobulin G antibodies for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 9, p. 1483-4, 2008.

WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? **Cad. saúde pública**, v. 32, n. 6, p. eED010616, 2016.

WHO, W. H. The use of visceral leishmaniasis rapid diagnostic tests. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2008

_____. Control of the leishmaniases. **World Health Organization Technical Report Series**, n. 949, p. xii, 2010.

_____. Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance. I Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2011.

_____. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015**. World Health Organization, 2015.

_____. Leishmaniasis Epidemiological situation. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 01 dez. 2016a.

_____. Leishmaniasis and HIV coinfection. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/>. Acesso em: 01 dez.2016b.

ZINCHUK, A.; NADRAGA, A. Congenital visceral leishmaniasis in Ukraine: case report. **Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health**, 2013.

ZUBEN, A. P. B. V.; DONALÍSIO, M. R. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control Program in large cities. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.